

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-502584

(P2005-502584A)

(43) 公表日 平成17年1月27日(2005.1.27)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/27	A 6 1 K 37/36	4 C O 8 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 175 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-555103 (P2002-555103)	(71) 出願人	501401582
(86) (22) 出願日	平成13年12月28日 (2001.12.28)		ザ ケネス エス. ウォーレン インステ
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月26日 (2003.6.26)		イテュート, インコーポレーテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/049479		アメリカ合衆国 1 0 5 6 2 ニューヨー
(87) 国際公開番号	W02002/053580		ク州, オッシニング キッチャワン ロー
(87) 国際公開日	平成14年7月11日 (2002.7.11)		ド 7 1 2
(31) 優先権主張番号	09/753, 132	(74) 代理人	100091096
(32) 優先日	平成12年12月29日 (2000.12.29)		弁理士 平木 祐輔
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100118773
(31) 優先権主張番号	60/259, 245		弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成12年12月29日 (2000.12.29)	(74) 代理人	100096183
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 石井 貞次
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 エリスロポエチン応答性細胞、組織及び器官の保護、回復ならびに増強

(57) 【要約】

エリスロポエチンや修飾型エリスロポエチン等のエリスロポエチン受容体活性化因子の全身もしくは局所投与によって、ヒトを含む哺乳動物のエリスロポエチン応答性細胞、組織、器官もしくは身体部分の機能又は生存力を in vivo、in situ または ex vivo で保護又は増強する方法及び組成物が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エリスロポエチン応答性哺乳動物細胞、ならびにそれらに関連する細胞、組織及び器官の機能もしくは生存力を保護、維持、増強もしくは回復する医薬組成物を調製するための以下のエリスロポエチンからなる群から選択されるエリスロポエチンの使用：

- i) 少なくともシアル酸成分を持たないエリスロポエチン、
- ii) 少なくともN結合型糖鎖もしくはO結合型糖鎖を持たないエリスロポエチン、
- iii) 天然エリスロポエチンを少なくとも1つのグリコシダーゼで処理することによって少なくとも糖鎖の含有量を低下させたエリスロポエチン、
- iv) 非哺乳動物細胞中で組換えエリスロポエチンを発現させることにより少なくとも非哺乳動物グリコシル化パターンを有する糖鎖部分を含む、エリスロポエチン、
- v) 化学的に還元することもできる少なくとも1つ以上の酸化糖鎖を有するエリスロポエチン、
- vi) 少なくとも1つ以上の修飾されたアルギニン残基を有するエリスロポエチン、
- vii) 少なくとも1つ以上の修飾されたリシン残基を有するもしくはエリスロポエチン分子のN末端アミノ基が修飾されたエリスロポエチン、
- viii) 少なくとも修飾されたチロシン残基を有するエリスロポエチン、
- ix) 少なくとも修飾されたアスパラギン酸もしくはグルタミン酸残基を有するエリスロポエチン、
- x) 少なくとも修飾されたトリプトファン残基を有するエリスロポエチン、
- xi) 少なくとも1つのアミノ基が除去されたエリスロポエチン、
- xii) エリスロポエチン分子中のシスチン結合の少なくとも1つの開裂を少なくとも有するエリスロポエチン、
- xiii) 少なくとも1つのアミノ酸の少なくとも1つの置換を有するエリスロポエチン、ならびに
- xiv) トランケート型エリスロポエチン。

【請求項 2】

前記エリスロポエチンがアシアロエリスロポエチンである、請求項 1 記載の使用。

【請求項 3】

前記アシアロエリスロポエチンがヒトアシアロエリスロポエチンである、請求項 2 記載の使用。 30

【請求項 4】

前記エリスロポエチンがN結合型糖鎖を持たない、請求項 1 記載の使用。

【請求項 5】

前記エリスロポエチンがO結合型糖鎖を持たない、請求項 1 記載の使用。

【請求項 6】

前記エリスロポエチンが少なくとも1つのグリコシダーゼで処理される、請求項 1 記載の使用。

【請求項 7】

前記エリスロポエチンが昆虫または植物細胞中で発現される、請求項 1 記載の使用。 40

【請求項 8】

前記エリスロポエチンが過ヨウ素酸により酸化されたエリスロポエチンである、請求項 1 記載の使用。

【請求項 9】

前記過ヨウ素酸により酸化されたエリスロポエチンがシアノ水素化ホウ素ナトリウムで化学的に還元される、請求項 8 記載の使用。

【請求項 10】

前記エリスロポエチンが1つ以上のアルギニン残基上にR-グリオキサール成分を含み、Rがアリールもしくはアルキル成分である、請求項 1 記載の使用。

【請求項 11】

前記エリスロポエチンがフェニルグリオキサル-エリスロポエチンである、請求項 1 0 記載の使用。

【請求項 1 2】

前記エリスロポエチンのアルギニン残基が、2,3-ブタンジオン及びシクロヘキサジオンからなる群より選択されるピシナルジケトンとの反応により修飾される、請求項 1 記載の使用。

【請求項 1 3】

前記エリスロポエチンのアルギニン残基を3-デオキシグルコソンと反応させる、請求項 1 記載の使用。

【請求項 1 4】

前記エリスロポエチン分子が少なくとも 1 つのビオチン化リシンまたはN末端アミノ基を有する、請求項 1 記載の使用。

【請求項 1 5】

前記エリスロポエチン分子がビオチン化エリスロポエチンである、請求項 1 4 記載の使用。

【請求項 1 6】

前記エリスロポエチンがグルシトリルリシンエリスロポエチン又はフルクトシルリシンエリスロポエチンである、請求項 1 記載の使用。

【請求項 1 7】

前記エリスロポエチンのリシン残基がカルバミル化されている、請求項 1 記載の使用。

【請求項 1 8】

前記エリスロポエチンのリシン残基がアシル化されている、請求項 1 記載の使用。

【請求項 1 9】

前記エリスロポエチンのリシン残基がアセチル化されている、請求項 1 8 記載の使用。

【請求項 2 0】

前記エリスロポエチンのリシン残基がサクシニル化されている、請求項 1 8 記載の使用。

【請求項 2 1】

前記エリスロポエチンのリシン残基が2,4,6トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム又はその他の塩により修飾されている、請求項 1 記載の使用。

【請求項 2 2】

前記エリスロポエチンのチロシン残基がニトロ化もしくはヨウ素化されている、請求項 1 記載の使用。

【請求項 2 3】

前記エリスロポエチンのアスパラギン酸もしくはグルタミン酸残基をカルボジイミドと反応させた後にアミンと反応させる、請求項 1 記載の使用。

【請求項 2 4】

前記アミンがグリシンアミドである、請求項 2 1 記載の使用。

【請求項 2 5】

エリスロポエチン応答性細胞もしくは組織が、神経、網膜、筋肉、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、副腎皮質、副腎髄質、毛細管内皮、精巣、卵巣もしくは子宮内膜の細胞又は組織である、請求項 1 記載の使用。

【請求項 2 6】

エリスロポエチン応答性細胞の保護、維持、増強もしくは回復するのに有効な量の、以下からなる群から選択されるエリスロポエチンを含む医薬組成物：

- i) 少なくともシアル酸成分を持たないエリスロポエチン、
- ii) 少なくともN結合型糖鎖またはO結合型糖鎖を持たないエリスロポエチン、
- iii) 天然エリスロポエチンを少なくとも 1 つのグリコシダーゼで処理することによって少なくとも糖鎖の含有量を低下させたエリスロポエチン、
- iv) 非哺乳動物細胞中で組換えエリスロポエチンを発現させることにより少なくとも非哺乳動物グリコシル化パターンを有する糖鎖部分を含む、エリスロポエチン、

10

20

30

40

50

- v) 化学的に還元することもできる少なくとも1つ以上の酸化糖鎖を有するエリスロポエチン、
- vi) 少なくとも1つ以上の修飾されたアルギニン残基を有するエリスロポエチン、
- vii) 少なくとも1つ以上の修飾されたリシン残基を有するまたはエリスロポエチン分子のN末端アミノ基が修飾されたエリスロポエチン、
- viii) 少なくとも修飾されたチロシン残基を有するエリスロポエチン、
- ix) 少なくとも修飾されたアスパラギン酸もしくはグルタミン酸残基を有するエリスロポエチン、
- x) 少なくとも修飾されたトリプトファン残基を有するエリスロポエチン、
- xi) 少なくとも1つのアミノ基が除去されたエリスロポエチン、
- xii) エリスロポエチン分子中のシスチン結合の少なくとも1つの開裂を少なくとも有するエリスロポエチン、
- xiii) 少なくとも1つのアミノ酸の少なくとも1つの置換を有するエリスロポエチン、ならびに
- xiv) トランケート型エリスロポエチン。

10

【請求項27】

前記エリスロポエチンがアシアロエリスロポエチン又はフェニルグリオキサール-エリスロポエチンである、請求項26記載の医薬組成物。

【請求項28】

エリスロポエチン応答性細胞又はそれらに関連する細胞、組織もしくは器官の機能又は生存力を保護、維持、増強もしくは回復する医薬組成物を調製するためのエリスロポエチンの使用であって、前記細胞、組織もしくは器官が興奮性細胞、組織もしくは器官ではない、又は興奮性細胞もしくは組織を主として含むものではないことを特徴とする、上記使用。

20

【請求項29】

前記エリスロポエチンが、エリスロポエチンもしくは天然エリスロポエチン、又はエリスロポエチン類似体、エリスロポエチン模倣体、及びエリスロポエチン断片、ハイブリッドエリスロポエチン分子、エリスロポエチン受容体結合性分子、エリスロポエチンアゴニスト、腎エリスロポエチン、脳エリスロポエチン、そのオリゴマー、その多量体、その突然変異蛋白質、その同属種、その天然発生形態、その合形成態、その組換え形態、そのグリコシル化変異体、その脱グリコシル化変異体、又はその組合せである、請求項28記載の使用。

30

【請求項30】

前記エリスロポエチンがフェニルグリオキサール-エリスロポエチンである、請求項28記載の使用。

【請求項31】

哺乳動物の身体から単離した細胞、組織もしくは器官の生存力を保護、維持又は増強する方法であって、エリスロポエチンを含む医薬組成物に前記細胞、組織もしくは器官を曝露することを含む上記方法。

【請求項32】

前記エリスロポエチンが、エリスロポエチンもしくは天然エリスロポエチン、又はエリスロポエチン類似体、エリスロポエチン模倣体、及びエリスロポエチン断片、ハイブリッドエリスロポエチン分子、エリスロポエチン受容体結合性分子、エリスロポエチンアゴニスト、腎エリスロポエチン、脳エリスロポエチン、そのオリゴマー、その多量体、その突然変異蛋白質、その同属種、その天然発生形態、その合形成態、その組換え形態、そのグリコシル化変異体、その脱グリコシル化変異体、又はその組合せである、請求項31記載の方法。

40

【請求項33】

前記エリスロポエチンが、

- i) 少なくともシアル酸成分を持たないエリスロポエチン、

50

- ii) 少なくともN結合型糖鎖もしくはO結合型糖鎖を持たないエリスロポエチン、
 - iii) 天然エリスロポエチンを少なくとも1つのグリコシダーゼで処理することによって少なくとも糖鎖の含有量を低下させたエリスロポエチン、
 - iv) 非哺乳動物細胞中で組換えエリスロポエチンを発現させることにより少なくとも非哺乳動物グリコシル化パターンを有する糖鎖部分を含む、エリスロポエチン、
 - v) 化学的に還元することもできる少なくとも1つ以上の酸化糖鎖を有するエリスロポエチン、
 - vi) 少なくとも1つ以上の修飾されたアルギニン残基を有するエリスロポエチン、
 - vii) 少なくとも1つ以上の修飾されたリシン残基を有するもしくはエリスロポエチン分子のN末端アミノ基が修飾されたエリスロポエチン、
 - viii) 少なくとも修飾されたチロシン残基を有するエリスロポエチン、
 - ix) 少なくとも修飾されたアスパラギン酸もしくはグルタミン酸残基を有するエリスロポエチン、
 - x) 少なくとも修飾されたトリプトファン残基を有するエリスロポエチン、
 - xi) 少なくとも1つのアミノ基が除去されたエリスロポエチン、
 - xii) エリスロポエチン分子中のシスチン結合の少なくとも1つの開裂を少なくとも有するエリスロポエチン、
 - xiii) 少なくとも1つのアミノ酸の少なくとも1つの置換を有するエリスロポエチン、又は
 - xiv) トランケート型エリスロポエチン
- である、請求項32記載の方法。

10

20

【請求項34】

前記エリスロポエチンがヒトエリスロポエチンである、請求項31記載の方法。

【請求項35】

前記エリスロポエチンがフェニルグリオキサール-エリスロポエチンである、請求項31記載の方法。

【請求項36】

哺乳動物における認知機能障害の回復のための医薬組成物を調製するための、エリスロポエチンもしくは天然エリスロポエチン、又はエリスロポエチン類似体、エリスロポエチン模倣体、及びエリスロポエチン断片、ハイブリッドエリスロポエチン分子、エリスロポエチン受容体結合性分子、エリスロポエチンアゴニスト、腎エリスロポエチン、脳エリスロポエチン、そのオリゴマー、その多量体、その突然変異蛋白質、その同属種、その天然発生形態、その合形成態、その組換え形態、そのグリコシル化変異体、その脱グリコシル化変異体、又はその組合せからなる群より選択されるエリスロポエチンの使用。

30

【請求項37】

認知機能障害が、痙攣障害、多発性硬化症、発作、低血圧症、心停止、虚血、心筋梗塞、炎症、老化による認知機能の低下、放射線障害、脳性麻痺、神経変性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、リー病、AIDS痴呆、記憶喪失、筋萎縮性側索硬化症、アルコール中毒症、気分障害、不安障害、注意欠陥障害、自閉症、クロイツフェルト-ヤコブ病、脳脊髄の損傷もしくは虚血、心肺バイパス、慢性心不全、黄斑変性、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、緑内障、網膜虚血、又は網膜損傷により引き起こされる損傷の結果生じるものである、請求項36記載の使用。

40

【請求項38】

前記エリスロポエチンがフェニルグリオキサール-エリスロポエチンである、請求項36記載の使用。

【請求項39】

前記エリスロポエチンが、

- i) 少なくともシアル酸成分を持たないエリスロポエチン、
- ii) 少なくともN結合型糖鎖もしくはO結合型糖鎖を持たないエリスロポエチン、
- iii) 天然エリスロポエチンを少なくとも1つのグリコシダーゼで処理することによって

50

- 少なくとも糖鎖の含有量を低下させたエリスロポエチン、
- iv) 非哺乳動物細胞中で組換えエリスロポエチンを発現させることにより少なくとも非哺乳動物グリコシル化パターンを有する糖鎖部分を含む、エリスロポエチン、
- v) 化学的に還元することもできる少なくとも1つ以上の酸化糖鎖を有するエリスロポエチン、
- vi) 少なくとも1つ以上の修飾されたアルギニン残基を有するエリスロポエチン、
- vii) 少なくとも1つ以上の修飾されたリシン残基を有するもしくはエリスロポエチン分子のN末端アミノ基が修飾されたエリスロポエチン、
- viii) 少なくとも修飾されたチロシン残基を有するエリスロポエチン、
- ix) 少なくとも修飾されたアスパラギン酸もしくはグルタミン酸残基を有するエリスロポエチン、
- x) 少なくとも修飾されたトリプトファン残基を有するエリスロポエチン、
- xi) 少なくとも1つのアミノ基が除去されたエリスロポエチン、
- xii) エリスロポエチン分子中のシスチン結合の少なくとも1つの開裂を少なくとも有するエリスロポエチン、
- xiii) 少なくとも1つのアミノ酸の少なくとも1つの置換を有するエリスロポエチン、又は
- xiv) トランケート型エリスロポエチン
- である、請求項36記載の使用。

【請求項40】

- 哺乳動物において内皮細胞バリアを介する分子のトランスサイトーシスを容易にする方法であって、以下のエリスロポエチンからなる群より選択されるエリスロポエチンに、前記分子を会合させたものを含む組成物を、前記哺乳動物に投与することを含む上記方法：
- i) 少なくともシアル酸成分を持たないエリスロポエチン、
- ii) 少なくともN結合型糖鎖もしくはO結合型糖鎖を持たないエリスロポエチン、
- iii) 天然エリスロポエチンを少なくとも1つのグリコシダーゼで処理することによって少なくとも糖鎖の含有量を低下させたエリスロポエチン、
- iv) 非哺乳動物細胞中で組換えエリスロポエチンを発現させることにより少なくとも非哺乳動物グリコシル化パターンを有する糖鎖部分を含む、エリスロポエチン、
- v) 化学的に還元することもできる少なくとも1つ以上の酸化糖鎖を有するエリスロポエチン、
- vi) 少なくとも1つ以上の修飾されたアルギニン残基を有するエリスロポエチン、
- vii) 少なくとも1つ以上の修飾されたリシン残基を有するもしくはエリスロポエチン分子のN末端アミノ基が修飾されたエリスロポエチン、
- viii) 少なくとも修飾されたチロシン残基を有するエリスロポエチン、
- ix) 少なくとも修飾されたアスパラギン酸もしくはグルタミン酸残基を有するエリスロポエチン、
- x) 少なくとも修飾されたトリプトファン残基を有するエリスロポエチン、
- xi) 少なくとも1つのアミノ基が除去されたエリスロポエチン、
- xii) エリスロポエチン分子中のシスチン結合の少なくとも1つの開裂を少なくとも有するエリスロポエチン、
- xiii) 少なくとも1つのアミノ酸の少なくとも1つの置換を有するエリスロポエチン、及び
- xiv) トランケート型エリスロポエチン。

【請求項41】

前記会合が、前記分子に対する結合部位との不安定な共有結合、安定な共有結合、または非共有結合である、請求項40記載の方法。

【請求項42】

前記内皮細胞バリアが、血液脳関門、血液眼関門、血液精巣障壁、血液卵巢関門、及び血液胎盤関門からなる群より選択される、請求項40記載の方法。

【請求項 4 3】

前記分子が、受容体アゴニストもしくはアンタゴニストホルモン、神経栄養因子、抗菌物質、放射性医薬品、アンチセンスオリゴヌクレオチド、抗体、免疫抑制薬、又は抗癌薬である、請求項 4 0 記載の方法。

【請求項 4 4】

内皮細胞バリアを介するトランスサイトシスにより分子を輸送する組成物であって、以下のエリスロポエチンからなる群より選択されるエリスロポエチンに、前記分子を会合させたものを含む上記組成物：

- i) 少なくともシアル酸成分を持たないエリスロポエチン、
- ii) 少なくともN結合型糖鎖もしくはO結合型糖鎖を持たないエリスロポエチン、
- iii) 天然エリスロポエチンを少なくとも1つのグリコシダーゼで処理することによって少なくとも糖鎖の含有量を低下させたエリスロポエチン、
- iv) 非哺乳動物細胞中で組換えエリスロポエチンを発現させることにより少なくとも非哺乳動物グリコシル化パターンを有する糖鎖部分を含む、エリスロポエチン、
- v) 化学的に還元することもできる少なくとも1つ以上の酸化糖鎖を有するエリスロポエチン、
- vi) 少なくとも1つ以上の修飾されたアルギニン残基を有するエリスロポエチン、
- vii) 少なくとも1つ以上の修飾されたリシン残基を有するもしくはエリスロポエチン分子のN末端アミノ基が修飾されたエリスロポエチン、
- viii) 少なくとも修飾されたチロシン残基を有するエリスロポエチン、
- ix) 少なくとも修飾されたアスパラギン酸もしくはグルタミン酸残基を有するエリスロポエチン、
- x) 少なくとも修飾されたトリプトファン残基を有するエリスロポエチン、
- xi) 少なくとも1つのアミノ基が除去されたエリスロポエチン、
- xii) エリスロポエチン分子中のシスチン結合の少なくとも1つの開裂を少なくとも有するエリスロポエチン、
- xiii) 少なくとも1つのアミノ酸の少なくとも1つの置換を有するエリスロポエチン、及び
- xiv) トランケート型エリスロポエチン。

【請求項 4 5】

前記会合が、前記分子に対する結合部位との不安定な共有結合、安定な共有結合、または非共有結合である、請求項 4 4 記載の組成物。

【請求項 4 6】

前記分子が、受容体アゴニストもしくはアンタゴニストホルモン、神経栄養因子、抗菌物質、放射性医薬品、アンチセンスオリゴヌクレオチド、抗体、免疫抑制薬、又は抗癌薬である、請求項 4 4 記載の組成物。

【請求項 4 7】

内皮細胞バリアを介したトランスサイトシスにより分子を輸送するための医薬組成物を調製するための、前記分子に会合させた以下のエリスロポエチンからなる群より選択されるエリスロポエチンの使用：

- i) 少なくともシアル酸成分を持たないエリスロポエチン、
- ii) 少なくともN結合型糖鎖もしくはO結合型糖鎖を持たないエリスロポエチン、
- iii) 天然エリスロポエチンを少なくとも1つのグリコシダーゼで処理することによって少なくとも糖鎖の含有量を低下させたエリスロポエチン、
- iv) 非哺乳動物細胞中で組換えエリスロポエチンを発現させることにより少なくとも非哺乳動物グリコシル化パターンを有する糖鎖部分を含む、エリスロポエチン、
- v) 化学的に還元することもできる少なくとも1つ以上の酸化糖鎖を有するエリスロポエチン、
- vi) 少なくとも1つ以上の修飾されたアルギニン残基を有するエリスロポエチン、
- vii) 少なくとも1つ以上の修飾されたリシン残基を有するもしくはエリスロポエチン分

子のN末端アミノ基が修飾されたエリスロポエチン、
viii) 少なくとも修飾されたチロシン残基を有するエリスロポエチン、
ix) 少なくとも修飾されたアスパラギン酸もしくはグルタミン酸残基を有するエリスロポエチン、
x) 少なくとも修飾されたトリプトファン残基を有するエリスロポエチン、
xi) 少なくとも1つのアミノ基が除去されたエリスロポエチン、
xii) エリスロポエチン分子中のシスチン結合の少なくとも1つの開裂を少なくとも有するエリスロポエチン、
xiii) 少なくとも1つのアミノ酸の少なくとも1つの置換を有するエリスロポエチン、及び
トランケート型エリスロポエチン。

10

【請求項48】

前記会合が、前記分子に対する結合部位との不安定な共有結合、安定な共有結合、または非共有結合である、請求項47記載の使用。

【請求項49】

前記分子が、受容体アゴニストもしくはアンタゴニストホルモン、神経栄養因子、抗菌物質、放射性医薬品、アンチセンスオリゴヌクレオチド、抗体、免疫抑制薬、又は抗癌薬である、請求項47記載の組成物。

【請求項50】

過ヨウ素酸塩により酸化されたエリスロポエチンを含む組成物。

【請求項51】

20

グルシトリルリシンエリスロポエチンを含む組成物。

【請求項52】

フルクトシルリシンエリスロポエチンを含む組成物。

【請求項53】

3-デオキシグルコソニエリスロポエチンを含む組成物。

【請求項54】

カルバミル化アシアロエリスロポエチンを含む組成物。

【請求項55】

ビオチン化アシアロエリスロポエチンを含む組成物。

【請求項56】

30

サクシニル化アシアロエリスロポエチンを含む組成物。

【請求項57】

アセチル化アシアロエリスロポエチンを含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

米国特許法の下に、2000年12月29に出願された米国仮出願番号第60/259,245号（本明細書中に参考として全て組み込まれる）に基づいて優先権を主張する。

【0002】

発明の背景

40

長年の間、唯一明らかであったエリスロポエチンの生理学的役割は、赤血球細胞産生の制御のみであった。最近になって、エリスロポエチンは、サイトカインのスーパーファミリーのメンバーとして、エリスロポエチン受容体（エリスロポエチン-R）との相互作用により媒介される他の重要な生理学的機能を果たすことを示す幾つかの証拠が得られた。これらの作用としては、有糸分裂誘発、平滑筋細胞及び神経細胞内へのカルシウム流入の調節、ならびに中間代謝への影響が挙げられる。エリスロポエチンは、低酸素性の細胞内ミクロ環境（hypoxic cellular microenvironment）を改善し及び代謝ストレスにより引き起こされるプログラム細胞死を調節する代償性反応をもたらすと考えられている。研究により、頭蓋内に投与されたエリスロポエチンは低酸素性神経損傷からニューロンを守ることが立証されたが、頭蓋内投与は、（特に正常な個体への）治療的用途での投与経路

50

としては実用的ではなく受け入れがたいものである。さらに、エリスロポエチンを与えた貧血患者の過去の研究により、末梢投与されたエリスロポエチンは脳内に輸送されないという結論が出された (Martiら, 1997, *Kidney Int.* 51:416-8; Juulら, 1999, *Pediatr. Res.* 46:543-547; Buemiら, 2000, *Nephrol. Dial. Transplant.* 15:422-433.)。

【0003】

エリスロポエチンの赤血球産生作用を改良する活動とともに、エリスロポエチンの様々な修飾形態がこれまで記載されてきた：例えば、米国特許第5,457,089号及び米国特許第4,835,260号に記載されたカルボキシ末端のアミノ酸が修飾されたもの；米国特許第5,856,292号に記載されたもの等の、1分子あたり様々な数のシアル酸残基を有するエリスロポエチンのアイソフォーム；米国特許第4,703,008号に記載されたポリペプチド；米国特許第5,767,078号に記載されたアゴニスト；米国特許第5,773,569号及び第5,830,851号に記載されたエリスロポエチン受容体に結合するペプチド；ならびに米国特許第5,835,382号に記載された小分子模倣体等がある。

10

【0004】

技術分野

本発明は、エリスロポエチン応答性細胞、それらに関連する細胞、組織及び器官を *in situ* 及び *ex vivo* で保護、維持、増強もしくは回復するためのエリスロポエチンの使用、ならびに脈管構造の遠位にある (*distal to the vasculature*) エリスロポエチン応答性細胞、それらに関連する細胞、組織及び器官を保護及び増強するための内皮細胞バリアを介したエリスロポエチンの送達、即ち本発明に係る関連分子の運搬に関する。

20

【発明の開示】

【0005】

発明の概要

1つの態様において、本発明は、エリスロポエチン応答性哺乳動物細胞、それらに関連する細胞、組織、及び器官の機能もしくは生存力を保護、維持、増強又は回復する医薬組成物を調製するためのエリスロポエチンの使用に関する。1つの具体的な態様において、エリスロポエチン応答性哺乳動物細胞、それらに関連する細胞、組織又は器官は、接着内皮細胞バリアの存在によって脈管構造の遠位にある。他の具体的な態様において、これらの細胞、組織、器官、又は他の身体部分は、哺乳動物の身体から単離されたもの（例えば移植用のもの等）である。非限定的な例として、エリスロポエチン応答性細胞又は組織は、神経、網膜、筋肉、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、副腎皮質、副腎髄質、毛細管内皮、精巢、卵巣、脾臓もしくは子宮内膜の細胞又は組織であってもよい。エリスロポエチン応答性細胞のこれらの例は単に例示的なものである。1つの態様において、エリスロポエチン応答性細胞、それらに関連する細胞、組織又は器官は、興奮性細胞、組織もしくは器官ではない、又は主に興奮性細胞もしくは組織を含まない。特定の実施形態において、上記エリスロポエチン誘導体を用いる対象となる哺乳動物の細胞、組織もしくは器官は、その細胞、組織又は器官の生存力に対して有害な少なくとも1つの条件下に一定時間置いたもしくはこれから置くものである。このような条件としては、外傷性の *in-situ* での低酸素性もしくは代謝性機能不全、外科手術により誘導された *in-situ* での低酸素性もしくは代謝性機能不全、又は *in-situ* での毒素への曝露が挙げられる。 *in-situ* での毒素への曝露は、化学療法又は放射線療法に係るものである。1つの実施形態において、有害条件は、ある種の外科手術で使用されるような心肺バイパス（人工心肺装置）によりもたらされる。

30

40

【0006】

エリスロポエチンは、眼の疾患、心臓血管疾患、心肺疾患、呼吸器疾患、腎臓疾患、尿路疾患、生殖器疾患、胃腸疾患、ならびに内分泌性及び代謝性異常だけでなく、主に神経的もしくは精神的な症状を有する CNS 又は末梢神経系のヒト疾患の治療又は予防にも有用である。

【0007】

また本発明は、哺乳動物、特にヒトに投与するための特定のエリスロポエチン誘導体を含む医薬組成物にも関する。このような医薬組成物は、経口、鼻腔内、もしくは非経口投与

50

用に、又は、細胞、組織もしくは器官の生存力をex vivoで維持するための灌流溶液として、製剤化することができる。

【0008】

上記目的に有用なエリスロポエチン誘導体は、天然エリスロポエチン、エリスロポエチン類似体、エリスロポエチン模倣体、エリスロポエチンフラグメント、ハイブリッドエリスロポエチン分子、エリスロポエチン受容体結合性分子、エリスロポエチンアゴニスト、腎エリスロポエチン、脳エリスロポエチン、そのオリゴマー、その多量体、その突然変異蛋白質、その同属種、その天然発生形態、その合形成態、その組換え形態、そのグリコシル化変異体、その脱グリコシル化変異体、又はその組合せであってもよい。エリスロポエチン応答性細胞に恩恵をもたらすことができるあらゆる形態のエリスロポエチンは、本発明のこの態様に包含される。

10

【0009】

上記目的に有用な他のエリスロポエチン誘導体及び医薬組成物は、天然エリスロポエチンだけでなく、天然エリスロポエチン（好ましくは天然ヒトエリスロポエチン）に少なくとも1つの修飾を行うことによって改変したエリスロポエチンも含む。少なくとも1つの修飾とは、エリスロポエチン分子の少なくとも1つのアミノ酸の修飾であっても、エリスロポエチン分子の少なくとも1つの糖鎖の修飾であってもよい。もちろん、本明細書中に記載される目的に有用なエリスロポエチン分子は、天然分子に複数の修飾を加えたもの、例えば該分子のアミノ酸部分に複数の修飾を加えたもの、該分子の糖鎖部分に複数の修飾を加えたもの、又は該分子のアミノ酸部分に少なくとも1つの修飾と該分子の糖鎖部分の少なくとも1つに修飾とを加えたものであってもよい。修飾型エリスロポエチン分子は、天然分子と比較して、エリスロポエチン応答性哺乳動物細胞の機能もしくは生存力を保護、維持、増強又は回復する能力を維持しており、且つ上記望ましい特徴に関係のないエリスロポエチン分子の他の特性がないものである。好適な実施形態において、エリスロポエチン誘導体は赤血球産生作用を持たない。

20

【0010】

1つの実施形態において、本発明のエリスロポエチンは、少なくともシアル酸成分を持たない。好適な実施形態において、修飾型エリスロポエチンはアシアロエリスロポエチンであり、最も好適には、ヒトアシアロエリスロポエチンである。他の実施形態において、修飾型エリスロポエチンは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12又は13個のシアル酸成分を有する。

30

【0011】

第2の実施形態において、修飾型エリスロポエチンは、少なくともN結合型もしくはO結合型糖鎖を持たない。

【0012】

第3の実施形態において、修飾型エリスロポエチンは、天然糖鎖を有するエリスロポエチンを少なくとも1つのグリコシダーゼで処理することによって少なくとも糖鎖含有量が低下している。

【0013】

第4の実施形態において、修飾型エリスロポエチン分子の糖鎖部分は、非哺乳動物細胞中で組換えエリスロポエチンを発現させることによって少なくとも非哺乳動物のグリコシル化パターンを有する。好適な実施形態において、修飾型エリスロポエチンは、昆虫細胞又は植物細胞内で発現される。

40

【0014】

第5の実施形態において、修飾型エリスロポエチンは、化学的に還元することもできる少なくとも1つ以上の酸化された糖鎖を有する。好適な実施形態において、修飾型エリスロポエチンは、過ヨウ素酸塩酸化型エリスロポエチンであり、他の好適な実施形態において、過ヨウ素酸塩酸化型エリスロポエチンは、水素化ホウ素ナトリウム又はシアノ水素化ホウ素ナトリウム等の水素化ホウ素塩で化学的に還元される。

【0015】

50

第6の実施形態において、上記使用のための修飾型エリスロポエチンは、少なくとも1つ以上の修飾されたアルギニン残基を有する。1つの実施形態において、修飾型エリスロポエチンは、その1つ以上のアルギニン残基上にグリオキサール成分（例えばアリアルグリオキサール又はアルキルグリオキサール成分）を含む。他の実施形態において、少なくとも1つのアルギニン残基は、2,3-ブタンジオン又はシクロヘキサジオン等（ただしこれらに限定されない）のピシナルジケトンとの反応により修飾される。

【0016】

第7の実施形態において、修飾型エリスロポエチンは、少なくとも1つ以上の修飾されたリシン残基を含むもの、又はエリスロポエチン分子のN末端アミノ基が修飾されたもの、例えばリシン残基もしくはN末端アミノ基とアミノ基修飾剤との反応により得られたもの等である。修飾されたリシン残基はさらに、化学的に還元することができる。1つの好適な実施形態において、エリスロポエチンは、1つ以上のリシン基を介してビオチン化もしくはカルバミル化される。他の好適な実施形態において、リシンをアルデヒドもしくは還元糖と反応させてイミンを形成させ、このイミンをシアノ水素化ホウ素ナトリウム等を用いた還元により安定化させてN-アルキル化リシン（グルシトリルリシン（glucitoyl lysine）等）を形成させたり、または還元糖の場合は該イミンをアマドリ転位又はヘインズ転位（Heyns rearrangement）により安定化させて、 α -デオキシ- β -フルクトシルリシン等の α -デオキシ- β -アミノ糖を形成してもよい。他の好適な実施形態において、リシン基は、例えばシアナートイオンとの反応によりカルバミル化（カルバモイル化）されたり、またはアルキル-イソシアナート、アリアル-イソシアナート、もしくはアリアル-イソチオシアナートによりそれぞれアルキル-カルバミル化、アリアル-カルバミル化、又はアリアル-チオカルバミル化されるか、または反応性アルキルカルボン酸もしくはアリアルカルボン酸誘導体により（例えば無水酢酸、無水コハク酸又は無水フタル酸との反応等により）アシル化されたりしてもよい。また少なくとも1つのリシン基を、トリニトロベンゼンスルホン酸又は好ましくはその塩との反応によりトリニトロフェニル修飾させてもよい。他の実施形態において、リシン残基は、グリオキサール誘導体との反応により（例えばグリオキサール、メチルグリオキサール又は3-デオキシグルコソンとの反応等により）修飾して、対応する α -カルボキシアルキル誘導体を形成してもよい。

【0017】

第8の実施形態において、エリスロポエチンの少なくとも1つのチロシン残基が、求電子試薬により、例えばニトロ化又はヨウ素化されることによって、芳香環位置で修飾されていてもよい。

【0018】

第9の実施形態において、エリスロポエチンの少なくともアスパラギン酸もしくはグルタミン酸残基が、例えばカルボジイミドと反応させた後、グリシンアミド等（ただしこれに限定されない）のアミンと反応させることにより、修飾されていてもよい。

【0019】

第10の実施形態において、エリスロポエチンの少なくともトリプトファン残基が、n-ブロモスクシンイミド又はn-クロロスクシンイミドとの反応等により修飾されていてもよい。

【0020】

第11の実施形態において、例えばニンヒドリンと反応させた後に得られたカルボニル基を水素化ホウ素と反応させること等によって、エリスロポエチンの少なくとも1つのアミノ基が除去された修飾型エリスロポエチン分子が提供される。

【0021】

第12の実施形態において、ジチオトレイトール等の還元剤と反応させた後に続くスルフヒドリルをヨードアセトアミド、ヨード酢酸又は他の求電子試薬と反応させてジスルフィド結合の再形成を防ぐことによって、エリスロポエチン分子の中のシスチン結合の少なくとも1つの開裂を少なくとも有する修飾型エリスロポエチンが提供される。

【0022】

10

20

30

40

50

第13の実施形態において、分子生物学的技法を用いて、リシン、アルギニン、トリプトファン、チロシン、又はシステイン残基のうちの少なくとも1つによる沢山のアミノ酸のうちのいずれか一つの（ロイシン等）の少なくとも1つの置換を有する修飾型エリスロポエチンが提供される。

【0023】

第14の実施形態において、例えばトリプトファン残基の後ろを切断するために、修飾型エリスロポエチンを特定の残基を標的とする限定的な化学的蛋白分解（limited chemical proteolysis）にかける。このようにして得られたエリスロポエチンフラグメントは本明細書中に包含される。

【0024】

上記のように、本明細書中に記載された目的に有用なエリスロポエチンは、上記修飾のうちの少なくとも1つを有するものであってもよいが、上記修飾のうちの2つ以上を有するものであってもよい。エリスロポエチン分子の糖鎖部分に1つの修飾とアミノ酸部分に1つの修飾とを有する修飾型エリスロポエチンの例として、修飾型エリスロポエチンはアシアロエリスロポエチンであり、そのリシン残基がピオチン化もしくはカルバミル化されている。また本発明は、上記エリスロポエチンの1つ以上を含む組成物（医薬組成物等）も包含する。

【0025】

本発明の他の態様において、上記エリスロポエチンのうちの1つ以上を有効量投与することによって、エリスロポエチン応答性哺乳動物細胞、ならびにそれらに関連する細胞、組織及び器官の機能もしくは生存力を保護、維持、増強又は回復する方法が提供される。この方法の1つの特定の態様において、エリスロポエチン応答性哺乳動物細胞、ならびにそれらに関連する細胞、組織もしくは器官は、接着内皮細胞バリアの存在によって脈管構造の遠位にある。他の特定の態様において、細胞、組織、器官又は他の身体部分は哺乳動物の身体から単離されたもの（例えば移植手術用のもの等）である。非限定的な例として、エリスロポエチン応答性細胞又は組織は、神経、網膜、筋肉、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、副腎皮質、副腎髄質、毛細管内皮、精巣、卵巣もしくは子宮内膜の細胞又は組織であってもよい。エリスロポエチン応答性細胞のこれらの例は単に例示的なものである。特定の実施形態において、エリスロポエチン応答性細胞、又はそれに関連する細胞、組織もしくは器官は、興奮性の細胞、組織もしくは器官ではない、又は主に興奮性細胞もしくは組織を含むものではない。他の特定の実施形態において、上記エリスロポエチン誘導体が投与される哺乳動物の細胞、組織もしくは器官は、その細胞、組織又は器官の生存力に対して有害な少なくとも1つの条件下に一定時間置いた、もしくはこれから置くものである。このような条件としては、外傷性のin-situでの低酸素性もしくは代謝性機能不全、外科手術により誘導されたin-situでの低酸素性もしくは代謝性機能不全、又はin-situでの毒素への曝露が挙げられる。in-situでの毒素への曝露は、化学療法又は放射線療法に係るものであってもよい。1つの実施形態において、本発明は、心肺バイパスにより生じる有害な状態から守る。

【0026】

本発明の他の態様において、上記エリスロポエチン及び天然ヒトエリスロポエチンを含む他の任意のエリスロポエチン分子は、エリスロポエチン応答性哺乳動物細胞、ならびにそれらに関連する細胞、組織及び器官の機能又は生存力を保護、維持、増強又は回復するための細胞、組織及び器官のex-vivo治療のための医薬組成物の調製で使用する事ができる。このようなex-vivo治療は、例えば移植（自己移植または異個体間移植（xenotransplant））用の細胞、組織又は器官の保存に有用である。細胞、組織又は器官がドナー又は受容者の脈管構造と一体化されない間、細胞の機能を維持するためには、エリスロポエチンを含む溶液中に細胞、組織又は器官を入れたり、脈管構造もしくは他の手段を介して灌流液を器官の中に徐々に入れたりしてもよい。灌流液の投与は、回収された器官及び受容者に行うだけでなく、器官を回収する前にドナーに行っても良い。さらに、任意のエリスロポエチンの上記使用は、個体の脈管構造から細胞、組織又は器官を単離して一定時間に

10

20

30

40

50

渡って、主にex vivoで存在するときにはいつでも有用である。ここで、「単離された」というという用語は、細胞、組織、器官もしくは身体部分又はその脈管構造を拘束したり又は締めつけたりすること（特に心-肺バイパス手術等の外科手術中に行われるもの等）、細胞、組織、器官又は身体部分の脈管構造をバイパスすること、細胞、組織、器官又は身体部分を哺乳動物の身体から取り出すこと（異個体間移植の前又は自己移植の前及び自己移植中に行われるもの等）、あるいは細胞、組織、器官又は身体部分の外傷性切断を指す。このように、本発明のこの態様は、in situ及びex vivoの両方でのエリスロポエチンを用いた灌流に関する。ex vivoにおいて、エリスロポエチンは細胞、組織又は器官の保存溶液中に提供されてもよい。いずれの態様の場合であっても、連続的灌流、拍動性灌流、注入、浴（bathing）、注射、又はカテーテルによって曝露を行うことができる。

10

【0027】

さらに他の態様において、本発明は、エリスロポエチン応答性細胞もしくは組織を含む、哺乳動物の身体から単離された哺乳動物細胞、組織、器官又は身体部分の生存力を保護、維持、増強又は回復する方法に関する。この方法は、上記生存力を保護、維持、増強又は回復するのに効果的な時間に渡って、単離した哺乳動物細胞、組織、器官又は身体部分を一定量のエリスロポエチンに曝露する工程を少なくとも含む。非限定的な例において、「単離された」とは、細胞、組織、器官もしくは身体部分の脈管構造を拘束したり又は締めつけたりすること（特に心-肺バイパス手術等の外科手術中に行われるもの等）、細胞、組織、器官又は身体部分の脈管構造をバイパスすること、細胞、組織、器官又は身体部分を哺乳動物の身体から取り出すこと（異個体間移植の前又は自己移植の前及び自己移植中に行われるもの等）、あるいは細胞、組織、器官又は身体部分の外傷性切断を指す。このように、本発明のこの態様は、in situ及びex vivoの両方におけるエリスロポエチンを用いた灌流に関する。ex vivoにおいて、エリスロポエチンは細胞、組織又は器官の保存溶液中に提供される。いずれの態様の場合であっても、連続的灌流、拍動性灌流、注入、浴、注射又はカテーテルによって曝露を行うことができる。

20

【0028】

上記の単離またはex-vivoにおける実施形態において、有用なエリスロポエチンは、天然エリスロポエチン、エリスロポエチン類似体、エリスロポエチン模倣体、エリスロポエチンフラグメント、ハイブリッドエリスロポエチン分子、エリスロポエチン受容体結合性分子、エリスロポエチンアゴニスト、腎エリスロポエチン、脳エリスロポエチン、そのオリゴマー、その多量体、その突然変異蛋白質、その同属種、その天然発生形態、その合形成態、その組換え形態、そのグリコシル化変異体、その脱グリコシル化変異体、又はその組合せを含む上記エリスロポエチンのいずれであってもよい。エリスロポエチン応答性細胞に恩恵をもたらすことができるあらゆる形態のエリスロポエチンは、本発明のこの態様に包含される。他のエリスロポエチンとしては、本明細書中の教示に基づき幾つか代表的な（ただし非限定的な）例を挙げると、アシアロエリスロポエチン、N-脱グリコシル化エリスロポエチン、O-脱グリコシル化エリスロポエチン、糖鎖含有量の低いエリスロポエチン、グリコシル化パターンを改変したエリスロポエチン、糖鎖が酸化された後に還元されたエリスロポエチン、アリールグリオキサル修飾型エリスロポエチン、アルキルグリオキサル修飾型エリスロポエチン、2,3-ブタンジオン修飾型エリスロポエチン、シクロヘキサジオン修飾型エリスロポエチン、ピオチン化エリスロポエチン、N-アルキル化-リシル-エリスロポエチン、グルシトリルリシンエリスロポエチン、-デオキシ-フルクトシルリシン-エリスロポエチン、カルバミル化エリスロポエチン、アセチル化エリスロポエチン、サクシニル化エリスロポエチン、-カルボキシアルキルエリスロポエチン、ニトロ化エリスロポエチン、ヨード化エリスロポエチンが挙げられるがこれらに限定されない。ヒトエリスロポエチンが好ましく、天然ヒトエリスロポエチンが最も好ましい。他の実施形態において、ヒトアシアロエリスロポエチンが好ましい。他の実施形態において、ヒトフェニルグリオキサルエリスロポエチンが好ましい。

30

40

【0029】

非限定的な例として、上記ex-vivoエリスロポエチン応答性細胞もしくは組織は、神経、

50

網膜、筋肉、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、副腎皮質、副腎髄質、毛細管内皮、精巢、卵巣もしくは子宮内膜の細胞又は組織である、またはこれらを含むものであってもよい。エリスロポエチン応答性細胞のこれらの例は、単に例示的なものである。

【0030】

上記方法及び使用の全ては好ましくは人間にも適用可能であるが、あらゆる哺乳動物（ペット動物、家畜動物、牧畜及び動物園の動物等が挙げられるがこれらに限定されない）にも有用である。上記医薬組成物の投与経路としては、経口、静脈内、鼻腔内、局所、腔内、吸入又は非経口投与が挙げられ、非経口投与としては、静脈内、動脈内、皮下、筋肉内、腹腔内、粘膜下又は皮内が挙げられる。ex-vivoで使用する場合、灌流液又は浴液（bathtub solution）が好ましい。これは、in situでの脈管構造の単離された部分の還流（perfusion）を含む。

【0031】

本発明のさらに他の態様において、機能不全の一因となる症状又は疾患の発症後に投与したときにその機能不全細胞、組織もしくは器官を回復させる医薬組成物の調製において、上記エリスロポエチンのいずれもが有用である。非限定的な例として、エリスロポエチンを含む医薬組成物の投与は、過去に脳に外傷を負った動物において、その外傷がおさまってからしばらく経った後（例えば3日、5日、1週間、1ヶ月又はそれ以上）に投与された場合であっても、認知機能を回復させる。このような用途に有用なエリスロポエチンは、具体的な上記エリスロポエチン、天然エリスロポエチン、エリスロポエチン類似体、エリスロポエチン模倣体、エリスロポエチンフラグメント、ハイブリッドエリスロポエチン分子、エリスロポエチン受容体結合性分子、エリスロポエチンアゴニスト、腎エリスロポエチン、脳エリスロポエチン、そのオリゴマー、その多量体、その突然変異蛋白質、その同属種、その天然発生形態、その合形成態、その組換え形態、そのグリコシル化変異体、その脱グリコシル化変異体、又はその組合せのいずれであってもよい。エリスロポエチン応答性細胞に恩恵をもたらすことができるあらゆる形態のエリスロポエチンは、本発明のこの態様に包含される。上記目的に有用な他のエリスロポエチン誘導体及び医薬組成物は、天然エリスロポエチンだけでなく、天然エリスロポエチン（好ましくは天然ヒトエリスロポエチン）に少なくとも1つの修飾を行うことによって改変されたエリスロポエチンも含む。少なくとも1つの修飾とは、エリスロポエチン分子の少なくとも1つのアミノ酸の修飾であっても、エリスロポエチン分子の少なくとも1つの糖鎖の修飾であってもよい。もちろん、本明細書中に記載された目的に有用なエリスロポエチン分子は、天然分子に複数の修飾（例えば該分子のアミノ酸部分に複数の修飾、該分子の糖鎖部分に複数の修飾、又は該分子のアミノ酸部分に少なくとも1つの修飾と該分子の糖鎖部分に少なくとも1つの修飾）を加えたものであってもよい。修飾型エリスロポエチン分子は、天然分子と比較して、エリスロポエチン応答性哺乳動物細胞の機能もしくは生存力を保護、維持、増強又は回復する能力を維持しており、且つ上記望ましい特徴に関係のないエリスロポエチン分子の他の特性がないものである。ヒトエリスロポエチンが好ましく、天然ヒトエリスロポエチンが最も好ましい。他の実施形態において、ヒトアジアロエリスロポエチンが好ましい。

【0032】

さらに他の実施形態において、本発明は、機能不全の一因となる症状又は疾患の発症後に投与したときにその機能不全細胞、組織もしくは器官を回復させるための上記エリスロポエチンの使用方法を提供する。非限定的な例として、エリスロポエチンを含む医薬組成物の投与方法は、過去に脳に外傷を負った動物において、その外傷がおさまってからしばらく経った後（例えば3日、5日、1週間、1ヶ月又はそれ以上）に投与された場合であっても、認知機能を回復させる。このような方法に有用なエリスロポエチンは、特定の上記エリスロポエチン、天然エリスロポエチン、エリスロポエチン類似体、エリスロポエチン模倣体、エリスロポエチンフラグメント、ハイブリッドエリスロポエチン分子、エリスロポエチン受容体結合性分子、エリスロポエチンアゴニスト、腎エリスロポエチン、脳エリスロポエチン、そのオリゴマー、その多量体、その突然変異蛋白質、その同属種、その天然発生形態、その合形成態、その組換え形態、そのグリコシル化変異体、その脱グリコシル化

変異体、又はその組合せのいずれであってもよい。エリスロポエチン応答性細胞に恩恵をもたらすことができるあらゆる形態のエリスロポエチンは、本発明のこの態様に包含される。上記目的に有用な他のエリスロポエチン誘導体及び医薬組成物は、天然エリスロポエチン、及び天然エリスロポエチン（好ましくは天然ヒトエリスロポエチン）に少なくとも1つの修飾を行うことによって改変したエリスロポエチンの両方を含む。少なくとも1つの修飾とは、エリスロポエチン分子の少なくとも1つのアミノ酸の修飾であっても、エリスロポエチン分子の少なくとも1つの糖鎖の修飾であってもよい。もちろん、本明細書中に記載された目的に有用なエリスロポエチン分子は、天然分子に複数の修飾（例えば該分子のアミノ酸部分に複数の修飾、該分子の糖鎖部分に複数の修飾、又は該分子のアミノ酸部分に少なくとも1つの修飾と該分子の糖鎖部分に少なくとも1つの修飾と）を加えたものであってもよい。修飾型エリスロポエチン分子は、天然分子と比較して、エリスロポエチン応答性哺乳動物細胞の機能もしくは生存力を保護、維持、増強又は回復する能力を維持しており、且つ上記望ましい特徴に関係のないエリスロポエチン分子の他の特性がないものである。ヒトエリスロポエチンが好ましく、天然ヒトエリスロポエチンが最も好ましい。他の実施形態において、ヒトアジアロエリスロポエチンが好ましい。

10

【0033】

本発明のさらに他の態様において、以下に挙げるエリスロポエチンに分子を会合させた組成物を投与することによって、哺乳動物において内皮細胞バリアを介する分子のトランスサイトシスを容易にする方法が提供される：少なくともシアル酸成分を持たないエリスロポエチン；少なくともN結合型糖鎖もしくはO結合型糖鎖を持たないエリスロポエチン；天然エリスロポエチンを少なくとも1つのグリコシダーゼで処理することによって少なくとも糖鎖の含有量を低下させたエリスロポエチン；非哺乳動物細胞中で組換えエリスロポエチンを発現させることによってエリスロポエチン分子の糖鎖部分が少なくとも非哺乳動物グリコシル化パターンを有するエリスロポエチン；化学的に還元することもできる少なくとも1つ以上の酸化糖鎖を有するエリスロポエチン；少なくとも1つ以上の修飾されたアルギニン残基を有するエリスロポエチン；少なくとも1つ以上の修飾されたリシン残基を有するもしくはエリスロポエチン分子のN末端アミノ基が修飾されたエリスロポエチン；少なくとも修飾されたチロシン残基を有するエリスロポエチン；少なくとも修飾されたアスパラギン酸もしくはグルタミン酸残基を有するエリスロポエチン；少なくとも修飾されたトリプトファン残基を有するエリスロポエチン；少なくとも1つのアミノ基が除去されたエリスロポエチン；エリスロポエチン分子中のシスチン結合の少なくとも1つの開裂を少なくとも有するエリスロポエチン；少なくとも1つのアミノ酸の少なくとも1つの置換を有するエリスロポエチン；又はランケート型エリスロポエチン。

20

30

【0034】

輸送しようとする分子とエリスロポエチンとの間の会合は、例えば前記分子に対する結合部位との不安定な共有結合、安定な共有結合、または非共有結合であってもよい。内皮細胞バリアが、血液脳関門、血液眼関門、血液精巣障壁、血液卵巣関門（blood-ovary barrier）、及び血液胎盤関門であってもよい。本発明の方法により輸送するのに適した分子としては、成長ホルモン等のホルモン、抗生物質及び抗癌薬が挙げられる。

【0035】

本発明のさらなる態様は、哺乳動物において内皮細胞バリアを介する分子のトランスサイトシスを容易にする組成物を提供することである。前記組成物は、前記分子を以下に挙げるようなエリスロポエチンと会合させたものを含む：少なくともシアル酸成分を持たないエリスロポエチン；少なくともN結合型糖鎖もしくはO結合型糖鎖を持たないエリスロポエチン；天然エリスロポエチンを少なくとも1つのグリコシダーゼで処理することによって少なくとも糖鎖の含有量を低下させたエリスロポエチン；非哺乳動物細胞中で組換えエリスロポエチンを発現させることによって修飾型エリスロポエチン分子の糖鎖部分が少なくとも非哺乳動物グリコシル化パターンを有するエリスロポエチン；化学的に還元することもできる少なくとも1つ以上の酸化糖鎖を有するエリスロポエチン；少なくとも1つ以上の修飾されたアルギニン残基を有するエリスロポエチン；少なくとも1つ以上の修飾さ

40

50

れたリシン残基を有するもしくはエリスロポエチン分子のN末端アミノ基が修飾されたエリスロポエチン；少なくとも修飾されたチロシン残基を有するエリスロポエチン；少なくとも修飾されたアスパラギン酸もしくはグルタミン酸残基を有するエリスロポエチン；少なくとも修飾されたトリプトファン残基を有するエリスロポエチン；少なくとも1つのアミノ基が除去されたエリスロポエチン；エリスロポエチン分子中のシスチン結合の少なくとも1つの開裂を少なくとも有するエリスロポエチン；少なくとも1つのアミノ酸の少なくとも1つの置換を有するエリスロポエチン；又はトランケート型エリスロポエチン。

【0036】

会合は、例えば前記分子に対する結合性部位との不安定な共有結合、安定な共有結合、または非共有結合であってもよい。内皮細胞バリアが、血液脳関門、血液眼関門、血液精巢障壁、血液卵巣関門、及び血液胎盤関門であってもよい。本発明の方法により輸送するのに適した分子としては、成長ホルモン等のホルモン、抗生物質及び抗癌薬が挙げられる。

10

【0037】

本発明のさらに他の態様において、哺乳動物における内皮細胞バリアを介する分子のトランスサイトーシスを容易にする医薬組成物の調製において、上記エリスロポエチンのどれもが有用である。前記組成物は、前記分子が以下に挙げるようなエリスロポエチンと会合したものを含む：少なくともシアル酸成分を持たないエリスロポエチン；少なくともN結合型糖鎖もしくはO結合型糖鎖を持たないエリスロポエチン；天然エリスロポエチンを少なくとも1つのグリコシダーゼで処理することによって少なくとも糖鎖の含有量を低下させたエリスロポエチン；非哺乳動物細胞中で組換えエリスロポエチンを発現させることによって修飾型エリスロポエチン分子の糖鎖部分が少なくとも非哺乳動物グリコシル化パターンを有するエリスロポエチン；化学的に還元することもできる少なくとも1つ以上の酸化糖鎖を有するエリスロポエチン；少なくとも1つ以上の修飾されたアルギニン残基を有するエリスロポエチン；少なくとも1つ以上の修飾されたリシン残基を有するもしくはエリスロポエチン分子のN末端アミノ基が修飾されたエリスロポエチン；少なくとも修飾されたチロシン残基を有するエリスロポエチン；少なくとも修飾されたアスパラギン酸もしくはグルタミン酸残基を有するエリスロポエチン；少なくとも修飾されたトリプトファン残基を有するエリスロポエチン；少なくとも1つのアミノ基が除去されたエリスロポエチン；エリスロポエチン分子中のシスチン結合の少なくとも1つの開裂を少なくとも有するエリスロポエチン；少なくとも1つのアミノ酸の少なくとも1つの置換を有するエリスロポエチン；又はトランケート型エリスロポエチン。

20

30

【0038】

会合は、例えば前記分子に対する結合性部位との不安定な共有結合、安定な共有結合、または非共有結合であってもよい。内皮細胞バリアは、血液脳関門、血液眼関門、血液精巢障壁、血液卵巣関門、及び血液胎盤関門であってもよい。本発明の方法により輸送するのに適した分子としては、成長ホルモン等のホルモン、抗生物質及び抗癌薬が挙げられる。

【0039】

本発明のこれらの態様及び他の態様は、添付の図面及び以下の詳細な説明を参照することによりさらに良く理解されよう。

【0040】

40

発明の詳細な説明

「エリスロポエチン応答性細胞」とは、エリスロポエチンへの曝露によりその機能又は生存力が維持、促進、増強もしくは再生される又は何らかの他の恩恵をこうむる哺乳動物細胞を指す。このような細胞の非限定的な例としては、神経、網膜、筋肉、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、副腎皮質、副腎髄質、毛細管内皮、精巢、卵巣、及び子宮内膜の細胞が挙げられる。さらに、このようなエリスロポエチン応答性細胞及びエリスロポエチンによりそれらにもたらされる恩恵は、直接的にはエリスロポエチン応答性ではない他の細胞又はこのような非エリスロポエチン応答性細胞を含む組織もしくは器官の細胞を間接的に保護又は増強することまで拡大することができる。エリスロポエチン応答性細胞の増強により間接的に恩恵をこうむるこれらの他の細胞、組織もしくは器官は、その細胞、組織もしくは

50

は器官の一部として、「会合した」細胞、組織及び器官として存在する。このように、組織又は器官（例えばこのような組織の中に存在する興奮性もしくは神経性組織）の中、又はテストステロンを作る精巢のライジッヒ細胞の中に少数もしくは小さな割合のエリスロポエチン応答性細胞が存在する結果として、本明細書中に記載されるエリスロポエチンの恩恵がもたらされ得る。1つの態様において、エリスロポエチン応答性細胞又はそれに関連する細胞、組織、又は器官は、興奮性の細胞、組織もしくは器官ではないか、又は興奮性細胞もしくは組織を主に含むものではない。

【0041】

本発明の方法は、様々な正常な条件および有害条件の下に、哺乳動物の体内において細胞、組織及び器官を局所的にもしくは全身的に防御又は増強する、あるいは、他の哺乳動物に移植されようとする細胞、組織及び器官を保護する。さらに、機能不全の回復又は再生ももたらされる。上記に記載したように、接着内皮細胞バリアを通過して脈管構造の遠位にあるエリスロポエチン応答性細胞（及び他のタイプの細胞）に対してプラスの影響を発揮するエリスロポエチンの能力は、動物（ヒトを含む）において細胞及び組織に大きなダメージを引き起こし得る様々な症状及び疾患を治療及び予防する可能性を提供し、さらに、伝統的に利益よりも危険の方が高かったこれまで企てられたことがない外科手術を成功させるものである。最終的な恩恵のために誘導される意図的な有害条件の継続時間及び程度（例えば高線量化学療法、放射線療法、長時間のex-vivo移植生存性、及び手術により誘導される長時間の虚血等）は、本明細書中に記載される発明を利用することによって実施することができる。しかし本発明は、1つの態様として、標的となるエリスロポエチン応答性細胞が内皮細胞バリア又は内皮の密着帯（tight junction）の存在により脈管構造の遠位に位置する場合の方法又は組成物を含むものであるが、これらに限定はされない。本発明は一般に、エリスロポエチンに曝露することにより恩恵を得ることができるエリスロポエチン応答性細胞ならびにそれに関連する細胞、組織及び器官に関する。さらに、細胞、組織又は器官の機能不全は、急な損傷（外傷等）を負った後、エリスロポエチンへの曝露によって回復又は再生させることができる。

【0042】

従って本発明は、細胞機能が維持される、促進される、増強される、再生される、又は他の恩恵を得られる、上記目的のための医薬組成物を調製するためのエリスロポエチンの使用に一般に関する。また本発明は、本明細書中に記載される有効量のエリスロポエチンを哺乳動物に投与することによって細胞機能を維持、増強、促進又は再生する方法にも関する。本発明はさらに、細胞、組織又は器官をエリスロポエチンに曝露することによって、ex vivoで細胞機能を維持、促進、増強又は再生する方法に関する。また本発明は、器官又は組織の保存で使用するための、エリスロポエチンを含む灌流組成物に関する。

【0043】

本発明の種々の方法は、少なくとも有効量のエリスロポエチンを含む医薬組成物を特定の経路及び曝露時間にて利用して、哺乳動物の体内にある又は哺乳動物の身体から取り出したエリスロポエチン応答性細胞に対してプラスの影響又は恩恵を発揮するものである。意図する治療の標的となる細胞、組織又は器官が、内皮細胞バリアを介してエリスロポエチンを輸送する必要がある場合、医薬組成物は、内皮細胞バリアを通過した後にエリスロポエチン応答性細胞に対して望ましい影響を及ぼすことができる濃度のエリスロポエチンを含む。エリスロポエチン受容体と相互作用して該受容体の活性を調節することができる分子（本明細書中エリスロポエチンもしくはエリスロポエチン受容体活性調節因子と呼ぶ）は、本発明の文脈において有用である。これらの分子は、例えば、上記記載のエリスロポエチン分子の天然発生形態、合形成態もしくは組換え形態、又は、本明細書中に記載されるようにエリスロポエチン応答性細胞活性を調節すること以外は何らかの形でエリスロポエチンに必ずしも似ているわけではない他の分子である。

【0044】

エリスロポエチンは、ヒトにおいて約34kDaの分子量を有する糖蛋白ホルモンである。成熟タンパク質は165アミノ酸を含み、グリコシル残基はその分子量の約40%を占める。本

10

20

30

40

50

発明の実施において有用なエリスロポエチンの形態は、以下に挙げるヒト及び他の哺乳動物のエリスロポエチン関連分子の天然発生形態、合形成態、及び組換え形態を包含する：エリスロポエチン、アシアロエリスロポエチン、脱グリコシル化エリスロポエチン、エリスロポエチン類似体、エリスロポエチン模倣体、エリスロポエチンフラグメント、ハイブリッドエリスロポエチン分子、エリスロポエチン受容体結合性分子、エリスロポエチンアゴニスト、腎エリスロポエチン、脳エリスロポエチン、そのオリゴマー及び多量体、その突然変異蛋白質、ならびにその同属種を包含する。さらに、本発明の実施において有用なエリスロポエチン形態としては、機能的に同等な遺伝子産物を表すタンパク質が挙げられる。このような同等なエリスロポエチン遺伝子産物としては、内部欠失を含む欠失、融合タンパク質を生じさせる付加を含む付加、又はアミノ酸配列の中及び/又はそれに隣接するアミノ酸残基の保存的置換（置換により機能的に同等なエリスロポエチンが生じる「サイレント」変化をもたらす）を含み得る突然変異型エリスロポエチンが挙げられる。このようなアミノ酸置換は、関与する残基の極性、電荷、可溶度、疎水性、親水性、及び/又は両親媒性における類似性に基づいて行うことができる。例えば非極性（疎水性）アミノ酸としてはアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、及びメチオニンが挙げられ、極性中性アミノ酸としてはグリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン及びグルタミンが挙げられ、正電荷を持つ（塩基性）アミノ酸としてはアルギニン、リシン及びヒスチジンが挙げられ、そして負電荷を持つ（酸性）アミノ酸としてはアスパラギン酸及びグルタミン酸が挙げられる。あるいは、非保存的アミノ酸変化、ならびに大きな挿入及び欠失を用いて、機能的に修飾されたエリスロポエチン突然変異体を作製することができる。このような突然変異体を用いて、望み通りにエリスロポエチン特性を変更することができる。例えば、1つの実施形態において、本発明の実施に有用なエリスロポエチンは、受容体結合に影響を及ぼすエリスロポエチンの4つの機能的ドメインVLQRY及び/又はTKVNFYAW及び/又はSGLRSLTTL及び/又はSNFLRGの中の1つ以上のアミノ酸に変化が起こった突然変異型エリスロポエチンであってもよい。他の実施形態において、その分子の動態又は受容体結合特性に影響を及ぼす該分子の周辺領域の中に突然変異を含むエリスロポエチンを用いることができる。

10

20

30

40

【0045】

「エリスロポエチン」及び「あるエリスロポエチン」という用語は、交換可能又は連結的（conjunctively）に用いられ、上記の様々な類似体、フラグメント、ハイブリッド分子、アゴニスト、突然変異蛋白質及び他の形態は、エリスロポエチンのグリコシル化の長さ及び部位が異なる変異体（エリスロポエチンの天然のグリコシル化形態、アシル化形態及び他の一部グリコシル化形態）を包含する。このような変異体の非限定的な例は、Tsudaら、1990、Eur. J. Biochem. 188:405-411（本明細書中に参考として記載される）に記載されている。細菌、酵母、昆虫、植物、哺乳動物（ヒトを含む）。さらに、組換えエリスロポエチンを発現及び産生させるために、細菌、酵母、昆虫、植物及び哺乳動物（ヒトを含む）の細胞系を含む（ただしこれらに限定されない）様々な宿主系を用いることができる。例えば、エリスロポエチンの非グリコシル化形態を作製するために、細菌内で産生された組換えエリスロポエチン（該生成物をグリコシル化もしくはシアル化しない）を用いることができるであろう。あるいは、例えば植物をグリコシル化する他の系（ヒト細胞を含む）の中で組替えエリスロポエチンを作製することができる。

【0046】

上記のように、本明細書中に記載される発明は、その分子とエリスロポエチンとの構造的関係のいかんにかかわらず、エリスロポエチン応答性細胞に対してプラスの作用を発揮することができるあらゆる全てのエリスロポエチン受容体活性調節分子を包含する。

【0047】

さらに、エリスロポエチン自体を修飾して、1つ以上の特定の組織に対するその活性を調整することができる。この所望の組織特異性を達成するために行うことができる幾つかの非限定的戦略としては、循環半減期を短くすることによりエリスロポエチンが赤血球前駆体と相互作用することができる時間を少なくする修飾、又はエリスロポエチン分子の一次

50

構造の修飾が挙げられる。循環半減期を短くする1つのアプローチは、グリコシル化成分（エリスロポエチンは3つのN結合型グリコシル化成分と1つのO結合型グリコシル化成分とを有する）を削除又は修飾するものである。このようなグリコシル化エリスロポエチンの変異体は、様々な方法で作成することができる。例えば、糖鎖の端部をしめくくるシアル酸は、シアル酸を該糖鎖に結合する化学結合に応じて、特定のシアリダーゼによって除去することができる。あるいは、グリコシル化構造は、特定の結合を切断する他の酵素を用いることによって様々な様式で解体することができる。一次構造を修飾する技法は無数にあり、例えば特定のアミノ酸の置換、アミノ酸の化学的修飾、又はエリスロポエチンとその受容体のいずれかとの相互作用を妨げる他の構造の付加等が挙げられる。このような形態のエリスロポエチンの使用は全て本明細書中に包含される。好適な実施形態において、本発明の非赤血球生成性エリスロポエチンの半減期は、天然エリスロポエチンに比べて約90%低減される。

10

【0048】

にもかかわらずこれらの分子の幾つかは、他の組織又は器官の中でエリスロポエチン自体の機能と似た機能を発揮する。例えば、天然エリスロポエチンの31位～47位のアミノ酸配列を含む17量体は、赤血球生成について不活性であるが、*in vitro*では神経細胞に対して完全に活性である（Campana & O'Brien, 1998: *Int. J. Mol. Med.* 1:235-41）。

【0049】

さらに、本明細書中に記載される用途に望ましいエリスロポエチン誘導体分子は、グアニジン化（guanidination）、アミジン化（amidination）、カルバミル化（カルバモイル化）、トリニトロフェニル化、アセチル化、サクシニル化、ニトロ化、あるいは、アルギニン、リシン、チロシン、トリプトファンもしくはシステイン残基又はカルボニル基の修飾によって、特に例えば限定的蛋白分解、アミノ基の除去、及び/又は分子生物学的技法によるアルギニン、リシン、チロシン、トリプトファンもしくはシステイン残基の突然変異的置換によって、特定の器官及び組織に対する適度な活性レベルを維持し且つ他の器官及び組織（赤血球等）に対して活性を持たないエリスロポエチンを生成することにより、作製することができる（例えばSatakeら；1990, *Biochim. Biophys. Acta* 1038: 125-9；本明細書中に参考として全て組み込まれる）。以下に記載するような1つの非限定的な例は、フェニルグリオキサール等のグリオキサールとの反応によるエリスロポエチンのアルギニン残基の修飾である（Takahashi, 1977, *J. Biochem.* 81:395-402のプロトコールに従う）。以下に記載されるように、このようなエリスロポエチン分子はその神経栄養効果を完全に保持している。このようなエリスロポエチン分子は、本明細書中に記載される様々な用途及び組成物について全て包含される。

20

30

【0050】

脳エリスロポエチン及び腎エリスロポエチン等の合成分子及び組換え分子、エリスロポエチンの組換え哺乳動物形態、ならびにその天然発生形態、腫瘍誘導型形態、及び組換えアイソフォーム（例えば組換えにより発現させた分子及び相同的組換えにより調製されたもの等）が本明細書中において提供される。さらに本発明は、エリスロポエチン受容体に結合するペプチドを含む分子、エリスロポエチンの構造的及び/もしくは生物学的特性の一部又は全てを保有する組換え構築物又は他の分子（エリスロポエチンのフラグメント及び多量体又はそのフラグメントを含む）を含む。本明細書中に記載されるエリスロポエチン又はエリスロポエチン受容体結合活性が改変された分子（好ましくは受容体親和性が高まったもの）を包含し、特に、内皮細胞バリアを介する輸送の増強に関する。グリコシル化部位の数が増加もしくは減少した分子を含む突然変異蛋白質は本明細書中に含まれる。上記のように、他の用語と同様に、「エリスロポエチン」及び「模倣体」という用語は、本明細書中において、エリスロポエチン応答性細胞を保護及び増強するエリスロポエチン関連分子及び内皮細胞バリアを通過することができるエリスロポエチン関連分子を指すために、交換可能に用いられる。

40

【0051】

さらに、トランスジェニック動物によって産生される分子も本明細書中に包含される。本

50

明細書中に包含されるエリスロポエチンは、本明細書中に記載されるような、エリスロポエチン受容体と相互作用する能力、又はエリスロポエチン受容体活性を調節するもしくはエリスロポエチンにより活性化されたシグナル伝達カスケードを活性化する能力以外は、構造的又は他の形でエリスロポエチン分子に必ずしも似ている必要はないことに留意されたい。

【0052】

非限定的な例としては、本発明の実施で有用なエリスロポエチンの形態としては、米国特許第5,457,089号及び米国特許第4,835,260号に記載されたカルボキシ末端のアミノ酸が修飾されたもの等のエリスロポエチン突然変異蛋白質；米国特許第5,856,298号に記載されたもの等の、1分子あたり様々な数のシアル酸残基を有するエリスロポエチンアイソフォーム及びアシアロエリスロポエチン；米国特許第4,703,008号に記載されたポリペプチド；米国特許第5,767,078号に記載されたアゴニスト；米国特許第5,773,569号及び第5,830,851号に記載されたエリスロポエチン受容体に結合するペプチド；米国特許第5,835,382号に記載されたもの等のエリスロポエチン受容体を活性化する小分子模倣体；ならびに国際特許出願公開番号第W09505465号、W09718318号、及びW09818926号に記載されたエリスロポエチン類似体等がある。上記引用文献の全ては、このような開示内容が、本発明のエリスロポエチンの様々な代替形態又はこのような形態を調製するためのプロセスの参考となる程度に、本明細書中に組み込まれる。

10

【0053】

エリスロポエチンは、例えばPROCRT (Ortho Biotech Inc., Raritan, NJ) 及びEPOGEN (Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA) という商品名で市販されている。

20

【0054】

エリスロポエチン (エリスロポエチン) 及びエリスロポエチン様分子の活性 (単位: unit) は、伝統的には、げっ歯類モデルにおける赤血球細胞産生の刺激におけるその効力に基づいて (及びエリスロポエチンの国際標準によって) 定義される。通常のエリスロポエチン (分子量およそ34,000) の1 unit (U) は、タンパク質約8ngである (タンパク質1mgはおよそ125,000Uである)。しかし、赤血球産生に対する効果は、本明細書中の所望の活性の二次的なものであり、本発明のエリスロポエチンの幾つかについては検出可能な特性である必要はないため、赤血球産生活性に基いて活性を定義するのは適当ではない。従って、本明細書中で使用されるエリスロポエチン又はエリスロポエチン関連分子の活性単位は、神経細胞系又は他のエリスロポエチン応答性細胞系において、WHO国際標準エリスロポエチンによって誘発される活性と同じ活性を同じ系の中で誘発するのに必要なタンパク質の量として定義される。当業者であれば、本明細書中に示されるガイダンスに従って、非赤血球産生性エリスロポエチン又は関連分子の単位を簡単に決定することができるであろう。

30

【0055】

本明細書中で有用な上記エリスロポエチン修飾に加えて、以下の記載は本発明の様々なエリスロポエチンに範囲を広げて説明している。

【0056】

本発明のエリスロポエチンは、少なくともシアル成分を持たない (アシアロエリスロポエチンと呼ばれる) ものもであってもよい。好ましくは、本発明のエリスロポエチンは、ヒトアシアロエリスロポエチンである。他の実施形態において、本発明のエリスロポエチンは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12又は13個のシアル酸残基を有するものである。これは、シアリダーゼを用いて、例えばProZyme Inc. (San Leandro, California) のシアリダーゼAの該製造業社のパッケージングに記載されるように、エリスロポエチンを脱シアリル化 (desialylate) することによって調製することができる。典型的には、PROZYME (登録商標) GLYCOPRO (登録商標) の配列決定等級の (sequencing-grade) シアリダーゼA (商品名) (N-アセチルノイラミン酸 (N-acetylneuraminate) グリコヒドロラーゼ、EC3.2.1.18) を用いて、複合体糖鎖及び糖蛋白 (エリスロポエチン等) から全ての非還元末端シアル酸残基を切断する。このようにシアリダーゼAは、(内

40

50

部残基に結合した)分岐状シアル酸を切断する。シアリダーゼAは、アルトロバクター属 *Arthrobacter ureafaciens* のクローンから単離される。

【0057】

エリスロポエチンは、少なくともN結合型糖鎖の数が減少したものであってもよい。N結合型糖鎖を除去するために、例えば、Hermentinら(1996, *Glycobiology* 6(2): 217-30)により記載された方法に従って、エリスロポエチンをヒドラジンで処理することができる。上記のように、エリスロポエチンは3つのN結合型糖鎖成分を持つ。本発明は、N結合型糖鎖を2つもしくは1つ持つ又は1つも持たないこれらのエリスロポエチンを包含する。

【0058】

本発明のエリスロポエチンは、天然エリスロポエチンを少なくとも1つのグリコシダーゼで処理することにより少なくとも糖鎖の含有量が低下したものであってもよい。例えば、Chen及びEvangelista, 1998, *Electrophoresis* 19(15): 2639-44の手法に従ってもよい。さらに、O結合型糖鎖の除去は、Hokkeら, 1995, *Eur. J. Biochem.* 228(3):981-1008に記載される方法に従って行ってもよい。

【0059】

エリスロポエチン分子の糖鎖部分は、組換えエリスロポエチンを非哺乳動物細胞中で発現させることによって非哺乳動物のグリコシル化パターンを少なくとも有していてもよい。好ましくは、エリスロポエチンは昆虫もしくは植物細胞の中で発現される。非限定的な例として、バキュロウイルス発現系を用いた昆虫細胞内でのエリスロポエチンの発現は、Quelleら, 1989, *Blood* 74(2):652-657に従って行うことができる。他の方法は、米国特許第5,637,477号に記載されている。植物細胞系中での発現は、Matsumotoら, 1993, *Bioscience, Biotech. Biochem.* 57(8): 1249-1252の方法に従って行うことができる。あるいは、細菌中で発現させると、非グリコシル化形態のエリスロポエチンが得られる。これらは単に、本発明のエリスロポエチンの生成に有用な方法の例であり、限定的なものではない。

【0060】

本発明のエリスロポエチンは、化学的に還元することもできる少なくとも1つ以上の酸化糖鎖を有するものであってもよい。例えば、エリスロポエチンは、過ヨウ素酸により酸化されたエリスロポエチンであってもよい。過ヨウ素酸により酸化されたエリスロポエチンもまた、水素化ホウ素ナトリウムやシアノ水素化ホウ素ナトリウム等の水素化ホウ素塩で化学的に還元することができる。過ヨウ素酸によるエリスロポエチンの酸化は、例えばLinsleyら, 1994, *Anal. Biochem.* 219(2):207-17により記載された方法によって実行することができる。過ヨウ素酸による酸化の後の化学的な還元は、Tonilli及びMeints, 1978, *J. Supramol. Struct.* 8(1):67-78の方法に従って実行することができる。

【0061】

上記用途のためのエリスロポエチンは、少なくとも1つ以上の修飾されたアルギニン残基を有するものであってもよい。例えば、修飾型エリスロポエチンは、1つ以上のアルギニン残基上にR-グリオキサール成分(ここでRはアリール、ヘテロアリール、低級アルキル、低級アルコキシもしくはシクロアルキル基、または -デオキシグリシトリル基であってもよい)を含むものであってもよい。本明細書中で使用される低級「アルキル」という用語は、直鎖状もしくは分岐鎖状の飽和脂肪族炭化水素基(好ましくは1~6個の炭素原子を含むもの)を意味する。このような基の代表的なものとしては、メチル、エチル、イソプロピル、イソブチル、ブチル、ペンチル、ヘキシル等が挙げられる。「アルコキシ」という用語は、酸素によって該分子の残りの部分に結合された上記定義の低級アルキル基を意味する。アルコキシの例としては、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ等が挙げられる。「シクロアルキル」という用語は、3個~約8個の炭素を有する環状アルキル基(例えばシクロプロピル、シクロブチル、シクロヘキシル等を含む)を指す。アリールという用語は、フェニル基及びナフチル基を指す。ヘテロアリールという用語は、酸素、窒素及び硫黄からなる群より選択される1~3個のヘテロ原子を含む4~10員のヘテロ環状基を指す。例としては、イソオキサゾリル(isoxazolyl)、フェニルイソオキサゾリル、フリル、ピリミジニル、キノリル、テトラヒドロキノリル、ピリジル、イミダゾリル

、ピロリジニル、1,2,4-トリアゾリル (triazolyl)、チアゾリル、チエニル等が挙げられるがこれらに限定されない。R基は置換されたもの、例えば3-デオキシグルコソンの4-トリヒドロキシブチル基等であってもよい。R-グリオキサル化合物の典型的な例は、グリオキサル、メチルグリオキサル、3-デオキシグルコソン、及びフェニルグリオキサルである。好適なR-グリオキサル化合物は、メチルグリオキサルまたはフェニルグリオキサルである。このような修飾方法の例は、Werberら, 1975, Isr. J. Med. Sci. 11(11); 1169-70 (フェニルグリオキサルを用いるもの) に記載されている。

【0062】

更なる例において、少なくとも1つのアルギニン残基は、好ましくはおよそ50mmolのホウ酸塩緩衝液 (pH8~9) 中において、2,3-ブタンジオン又はシクロヘキサンジオン等のピシナルジケトンとの反応により修飾することができる。2,3-ブタンジオンを用いた後者の修飾を行うための手法は、Riordan, 1973, Biochemistry 12(20):3915-3923に従って行うことができる。また、シクロヘキサノンを用いた手法は、Patthyら, 1975, J. Biol. Chem 250(2):565-9に従って行うことができる。

10

【0063】

本発明のエリスロポエチンは、少なくとも1つ以上の修飾されたリシン残基を含むものもしくはエリスロポエチン分子のN末端アミノ基が修飾されたものであってもよく、このような修飾としては、リシン残基をアミノ基修飾剤と反応させて得られるものがある。他の実施形態において、リシン残基は、グリオキサル誘導体との反応 (例えばグリオキサル、メチルグリオキサル及び3-デオキシグルコソンとの反応) によって修飾し、-カルボキシアルキル誘導体を形成することができる。例としては、Glomb及びMonnier, 1995, J. Biol. Chem. 270(17): 10017-26に記載されるようなグリオキサルとの反応によりカルボキシメチルリシンを形成させるもの、又は、Degenhardtら, 1998, Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand) 44(7):1139-45に記載されるようなメチルグリオキサルとの反応により (1-カルボキシエチル) リシンを形成させるものが挙げられる。修飾されたリシン残基をさらに化学的に還元してもよい。例えば、実施例5に記載される方法等に従ってリシン基によりエリスロポエチンをビオチン化してもよい。実施例5では、D-ビオチノイル-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルをエリスロポエチンと反応させた後、Wojchowski及びCaslake, 1989, Blood 74(3):952-8により記載されたようにセントリコン (Centricon) 10カラムでのゲル濾過により未反応ビオチンを除去した。上記報告書において著者等は、エリスロポエチンをビオチン化する3つの異なる方法を使用しており、本明細書中に記載された用途で用いるエリスロポエチンを調製するためには、これらの方法のどれでも用いることもできる。ビオチンは、(1) シアル酸成分、(2) カルボキシラート基又は(3) アミノ基に付加することができる。

20

30

【0064】

他の好適な実施形態では、リシンをアルデヒド又は還元糖と反応させてイミンを形成させ、このイミンを、シアノ水素化ホウ素ナトリウム等を用いた還元により安定化させて、グルシトリルリシン等のN-アルキル化リシンを形成してもよいし、又は還元糖を用いる場合は該イミンをアマドリ転位又はヘインズ転位により安定化させて、-デオキシ-フルクトシルリシン等の-デオキシ-アミノ糖を形成してもよい。例として、リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) 中の0.5Mグルコースと一緒に60日間インキュベートすることによるフルクトシルリシン修飾型タンパク質の調製は、Makitaら, 1992, J. Biol. Chem. 267:5133-5138により記載されている。他の例において、リシン基は、シアナートイオンとの反応等によってカルバミル化されてもよいし、アルキル-イソシアナート、アリアル-イソシアナート、アルキル-イソチオシアナート又はアリアル-イソチオシアナートとの反応によって、アルキル-カルバミル化、アリアル-カルバミル化、アルキル-カルバモイル化又はアリアル-カルバモイル化されてもよい。あるいは、リシン基は、反応性のアルキル-もしくはアリアル-カルボン酸誘導体によって (例えば無水酢酸、無水コハク酸、又は無水フタル酸との反応等により) アシル化されてもよい。例としては、4-スルホフェニルイソチオシアナート又は無水酢酸を用いたリシン基の修飾が挙げられる (これらはいずれもGa

40

50

oら, 1994, Proc. Natl Acad Sci USA 91(25):12027-30に記載されている)。またリシン基は、トリニトロベンゼンスルホン酸又は好ましくはその塩との反応によって、トリニトロフェニル修飾されてもよい。このような方法は、以下の実施例5に記載されている。

【0065】

エリスロポエチンの少なくとも1つのチロシン残基は、求電子試薬によって、例えばニトロ化又はヨウ素化等によって、芳香環位置で修飾することができる。非限定的な例として、エリスロポエチンは、テトラニトロメタンと反応させても(Nestlerら, 1985, J. Biol. Chem. 260(12):7316-21)、又は実施例5に記載されるようにヨウ素化されてもよい。

【0066】

カルボジイミドとの反応等を行った後にグリシンアミド等(ただしこれに限定されない)のアミンと反応させることにより、エリスロポエチンの少なくともアスパラギン酸もしくはグルタミン酸残基を修飾することができる。このような修飾の例は実施例5に記載されている。

【0067】

他の例において、n-ブロモスクシンイミド又はn-クロロスクシンイミドとの反応等の後に、Josserら, Chem Biol Interact 1999 May 14;119-120に記載されたような方法を行うことによって、エリスロポエチンのトリプトファン残基を修飾することができる。

【0068】

さらに他の実施例において、エリスロポエチン分子は、例えば、ニンヒドリンと反応させた後に、その結果生じるカルボニル基を水素化ホウ素との反応によって還元すること等により、少なくとも1つのアミノ基を除去することによって、調製することができる。

【0069】

さらに他の例では、ジチオトレイトール等の還元剤と反応させた後に、その結果生じるスルフィド結合の再形成を防ぐことにより、エリスロポエチン分子中のシスチン結合のうちの少なくとも1つの開裂を少なくとも有するエリスロポエチンが提供される。

【0070】

エリスロポエチンの沢山のアミノ酸のうちの少なくともいずれか1つ(例えばロイシン等)が、分子生物学的技法を用いてリシン、アルギニン、トリプトファン、チロシン又はシステイン残基の少なくとも1つで置換された、エリスロポエチンが提供される。

【0071】

エリスロポエチンを、例えばトリプトファン残基の後で切断するために特定の残基を標的とする限定的な化学的蛋白分解にかけることにより、修飾型エリスロポエチンを調製することができる。このように得られたエリスロポエチンフラグメントは本明細書中に包含される。

【0072】

上記のように、本明細書中に記載された目的のために有用なエリスロポエチンは、上記修飾のうちの少なくとも1つを有するものであってもよいが、上記修飾のうち2つ以上を有するものであってもよい。分子の糖鎖部分に1つの修飾とアミノ酸部分に1つの修飾とを有する修飾型エリスロポエチンの例として、修飾型エリスロポエチンはアシアロエリスロポエチンであってもよく、そのリシン残基はビオチン化もしくはカルバミル化されている。

【0073】

このように、本明細書中に記載される用途のための種々のエリスロポエチン分子及びこれらを含む医薬組成物が包含される。このようなエリスロポエチン分子としては、本明細書中の教示に基づいて幾つか代表的な例(ただし非限定的な例)を挙げると、アシアロエリスロポエチン、N-脱グリコシル化エリスロポエチン、O-脱グリコシル化エリスロポエチン、糖鎖の含有量が低下したエリスロポエチン、グリコシル化パターンが変更されたエリスロポエチン、酸化された後に還元された糖鎖を有するエリスロポエチン、アリールグリオキサール修飾型エリスロポエチン、アルキルグリオキサール修飾型エリスロポエチン、2,3-ブタンジオン修飾型エリスロポエチン、シクロヘキサジオン修飾型エリスロポエチン

、ピオチン化エリスロポエチン、N-アルキル化-リシル-エリスロポエチン、グルシトリルリシンエリスロポエチン、-デオキシ-フルクトシルリシン-エリスロポエチン、カルバミル化エリスロポエチン、アセチル化エリスロポエチン、サクシニル化エリスロポエチン、-カルボキシアルキルエリスロポエチン、ニトロ化エリスロポエチン、ヨウ素化エリスロポエチンが挙げられるが、これらに限定されない。好ましいのはヒトエリスロポエチンをベースとした上記修飾形態である。

【0074】

さらに、上記エリスロポエチンのうちの幾つかは新規なものであり、本発明は、このような化合物ならびにこれらを含む医薬組成物に関する。非限定的な例として、このような新しいエリスロポエチンとしては、過ヨウ素酸塩酸化型エリスロポエチン、グルシトリルリシンエリスロポエチン、フルクトシルリシンエリスロポエチン、3-デオキシグルコソニエリスロポエチン、及びカルバミル化アシアロエリスロポエチンが挙げられる。

10

【0075】

様々な宿主発現ベクター系を利用して、本発明のエリスロポエチン及びエリスロポエチン関連分子を作製することができる。このような宿主発現系は、目的のエリスロポエチンを作製した後に精製するために用いる媒介手段を代表するものであるが、適当な塩基コード配列で形質転換もしくはトランスフェクトしたときに *in situ* で修飾型エリスロポエチン遺伝子産物を示し得る細胞でもある。これらとしては、以下に挙げる細菌、昆虫、植物、及び哺乳動物（ヒトを含む）宿主系が挙げられるがこれらに限定されない：例えば修飾型エリスロポエチン産物をコードする配列を含むバキュロウイルス等の組換えウイルス発現ベクターに感染させた昆虫細胞系等；カリフラワーモザイクウイルスCaMVやタバコモザイクウイルスTMV等の組換えウイルス発現ベクターに感染させた植物細胞系、又はエリスロポエチン関連分子をコードする配列を含むTiプラスミド等の組換えプラスミド発現ベクターで形質転換した植物細胞系；あるいは、哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えばメタロチオネインプロモーター等）もしくは哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター（例えばアデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター等）を含む組換え発現構築物を宿している、ヒト細胞系を含む哺乳動物細胞系（例えばHT1080、COS、CHO、BHK、293、3T3）。

20

【0076】

さらに、挿入された配列の発現を調節する宿主細胞株、又は、望み通りの特定の仕様で遺伝子産物を修飾及びプロセッシングする宿主細胞株を選択することができる。タンパク質産物のこのような修飾（例えばグリコシル化）及びプロセッシング（例えば切断）は、タンパク質の機能にとって重要である。異なる宿主細胞は、タンパク質及び遺伝子産物の翻訳後のプロセッシング及び修飾の特徴的且つ独特なメカニズムを有する。発現される外来タンパク質の正しい修飾及びプロセッシングを行うために、適当な細胞系又は宿主系を選択することができる。このために、一次転写産物の適切なプロセッシング、グリコシル化、及び遺伝子産物のリン酸化のための細胞内装置（cellular machinery）を有する真核宿主細胞を用いることができる。このような哺乳動物宿主細胞（ヒト宿主細胞を含む）としては、HT1080、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3及びWI38が挙げられるがこれらに限定されない。

30

40

【0077】

組換えタンパク質の長期的な高収率産生のためには、安定な発現が好ましい。例えば、エリスロポエチン関連分子の遺伝子産物を安定に発現する細胞系を遺伝子操作により作製することができる。ウイルス複製起点を含む発現ベクターを用いるのではなく、適当な発現制御エレメント（例えばプロモーター、エンハンサー、配列、転写終結因子、ポリアデニル化部位等）により制御されるDNA及び選択マーカーを用いて宿主細胞を形質転換することができる。外来DNAを導入した後、遺伝子操作した細胞を濃縮培地中で1～2日間増殖させたあと、選択培地に移し替える。組換えプラスミド中の選択マーカーは、その選択に対する耐性を与え、細胞の染色体の中にプラスミドが安定に組み込まれてこれらの細胞がフォーカスを形成できるようにし、これらのフォーカスは、クローニングして細胞系へと拡

50

大させることができる。この方法は、エリスロポエチン関連分子の遺伝子産物を発現する細胞系を遺伝子操作するために、都合よく使用することができる。このような遺伝子操作された細胞系は特に、エリスロポエチン関連分子の遺伝子産物の内因活性に影響を及ぼす化合物のスクリーニング及び評価において有用である。

【0078】

あるいは、細胞系又は微生物内での内因性エリスロポエチン遺伝子の発現特性は、異種DNA調節エレメントを、挿入された調節エレメントが内因性エリスロポエチン遺伝子に機能的に影響し得る形で結合されるように、安定な細胞系もしくはクローニングされた微生物のゲノム中に挿入することにより、改変することができる。例えば、通常は「転写的に不活動な(transcriptionally silent)」内因性エリスロポエチン遺伝子(すなわち細胞系の中では通常は全く又は非常に低レベルでしか発現されないエリスロポエチン遺伝子)は、その細胞系又は微生物の中で通常は発現されない遺伝子産物の発現を促進することができる調節エレメントを挿入することによって、活性化することができる。あるいは、転写的に不活動な内因性エリスロポエチン遺伝子は、細胞型を問わず機能する無差別な調節エレメントを挿入することによって活性化することができる。

10

【0079】

当業者に周知である、及びフランス特許第2646438号(パスツール研究所)、米国特許第4,215,051号(Chappel)、米国特許第5,578,461号(Sherwinら)、国際特許出願第PCT/US92/09627号(W093/09222号)(Seldenら)、及び国際特許出願第PCT/US90/06436号(W091/06667号)(Skoultchira)(これらはそれぞれ本明細書中に参考として全て組み込まれる)に記載されているターゲッティング式相同的組換え等の技法を用いて、異種調節エレメントを、該エレメントが内因性エリスロポエチン遺伝子に機能的に影響し得る形で結合されるように、安定な細胞系又はクローニングされた微生物の中に挿入することができる。

20

【0080】

本発明の1つの実施形態において、シアル酸残基が少ないか又はシアル酸残基を全く持たないエリスロポエチン関連分子を、哺乳動物細胞(ヒト細胞を含む)内で作製することができる。このような細胞は、シアル酸を付加する酵素(すなわち -ガラクトシド 2,3シアリルトランスフェラーゼ「2,3シアリルトランスフェラーゼ」及び -ガラクトシド 2,6シアリルトランスフェラーゼ「2,6シアリルトランスフェラーゼ」活性)に欠陥があるように又は該酵素を持たないように遺伝子操作される。1つの実施形態において、2,3シアリルトランスフェラーゼ遺伝子及び/もしくは2,6シアリルトランスフェラーゼ遺伝子のいずれか又は両方が欠失した哺乳動物細胞を用いる。このような欠失は、当分野で周知である遺伝子ノックアウト技法を用いて構築することができる。他の実施形態において、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)欠陥チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を、組換えエリスロポエチン関連分子を産生するための宿主細胞として使用する。CHO細胞は酵素2,6シアリルトランスフェラーゼを発現しないので、これらの細胞内で産生される糖蛋白のN結合型オリゴ糖への2,6結合中にシアル酸を付加しない。その結果、CHO細胞内で産生された組換えタンパク質は、ガラクトースへの2,6結合中にシアル酸を持たない(Sasakiら, (1987); Takeuchiら(前掲)、Mutsaersら, Eur. J. Biochem. 156, 651(1986); Takeuchiら, J. Chromatogr. 400, 207(1987)。1つの実施形態において、アシアロ-エリスロポエチンを産生するための宿主細胞を作成するために、CHO細胞内の2,3シアリルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を欠失させる。このような2,3シアリルトランスフェラーゼノックアウトCHO細胞はシアリルトランスフェラーゼ活性を全く持たないため、アシアロ-エリスロポエチンの組換え発現及び産生に有用である。

30

40

【0081】

他の実施形態において、アシアロ糖蛋白は、ゴルジ体内へのシアル酸の輸送を妨げることによって作製することができる(例えばEckhardtら, 1998, J. Biol. Chem. 273:20189-95)。当業者に周知である方法(例えばOelmannら, 2001, J. Biol. Chem. 276:26291-300)を用いて、ヌクレオチド糖CMP-シアル酸トランスポーターの突然変異誘発を起こして、チャイニーズハムスター卵巣細胞の突然変異体を作製することができる。これらの細胞は

50

、エリスロポエチン等の糖蛋白にシアル酸残基を付加することができないので、アシアロエリスロポエチンのみを産生する。エリスロポエチンを産生するトランスフェクトされた哺乳動物細胞は、培養培地中に漏れ出した場合に効率良くシアロエリスロポエチンを分解する細胞質ゾルシアリダーゼも産生する（例えば、Gramerら、1995 Biotechnology 13:692-698）。（例えばFerrariら、1994, Glycobiology 4:367-373に記載された情報から）当業者に周知である方法を用いて、細胞系をトランスフェクトしたり、突然変異させたり、又は他の方法で、シアリダーゼを構成的に産生するようにさせることができる。このように、アシアロエリスロポエチンは、アシアロエリスロポエチンの製造中に作製することができる。

【0082】

本発明の1つの態様の実施において、エリスロポエチンを含む上記医薬組成物は、脈管構造内に十分なレベルのエリスロポエチンをもたらして、内皮細胞バリアを介したトランスロケーションを可能にし、エリスロポエチン応答性細胞に対して有益な影響をもたらす任意の経路により、哺乳動物に投与することができるものである。組織又は器官を灌流するために使用する場合、同様の結果が望ましい。エリスロポエチンをex-vivo灌流で使用する場合、エリスロポエチンは、上記エリスロポエチン等（ただしこれらに限定されない）の任意の形態のエリスロポエチンであってもよく、ヒトエリスロポエチン等の天然エリスロポエチンを含み得る。細胞又は組織が血管新生されていない場合及び/又は投与が細胞もしくは組織を本発明の組成物に浸すものである場合、医薬組成物は、エリスロポエチン応答性細胞に有益な有効量のエリスロポエチンを提供する。エリスロポエチンがトランスロケートする時に通る内皮細胞バリアとしては、哺乳動物の体内に存在する密着帯、有孔接合部（perforated junction）、有窓接合部（fenestrated junction）、及び他のタイプの内皮バリアが挙げられる。好適なバリアは、内皮細胞密着帯であるが、本発明はそれ

10

20

【0083】

上記エリスロポエチンは一般に、主に神経症状又は精神医学的症状を有する、中枢神経系又は末梢神経系のヒト疾患、眼の疾患、心臓血管疾患、心肺疾患、呼吸器疾患、腎臓疾患、尿路疾患、生殖器系疾患、胃腸疾患、内分泌性異常及び代謝性異常の治療的もしくは予防的処置において有用である。特に、このような症状及び疾患としては、低酸素状態が挙げられる。低酸素状態は、中枢神経系組織、抹消神経系組織、心臓組織又は網膜組織（例えば脳、心臓、又は網膜/眼等）内の興奮性組織等の興奮性組織に悪影響を及ぼす。従って本発明は、種々の症状及び状況における低酸素状態により生じる興奮性組織へのダメージを治療又は予防するために用いることができる。このような症状及び状況の非限定的な例を、以下の表に記載する。

30

【0084】

本発明に従って治療することができる神経組織の病理の保護の例において、このような病理には、神経組織への酸素供給量の低下により生じるものが含まれる。神経組織への酸素の利用可能性を低下させるあらゆる条件（ストレス、ダメージ、そして最終的には神経細胞死をもたらす）は、本発明の方法によって治療することができる。一般に低酸素症及び/又は虚血に関して、これらの条件は、卒中、血管閉塞、出生前もしくは生後の酸素欠乏、窒息、気道内閉塞、溺水（near drowning）、一酸化炭素中毒、煙吸入、外傷（外科手術及び放射線療法を含む）、仮死、癲癇、低血糖症、慢性閉塞性肺疾患、気腫、成人呼吸促進症候群、低血圧性ショック、敗血症性ショック、アナフィラキシーショック、インスリンショック、鎌状赤血球発症、心拍停止、律動異常、室索性ナルコーシス、及び心肺バイパス手術により引き起こされる神経性欠損等（ただしこれらに限定されない）を含む又はこれらから生じる。

40

【0085】

1つの実施形態において、例えば腫瘍切除又は動脈瘤の修復等の外科手術中に傷害又は組織ダメージの危険から生じる傷害又は組織ダメージを防ぐために、例えば特定のEP0組成物を投与することができる。低血糖症により引き起こされる又は低血糖症から生じる他の

50

病理であって、本明細書中に記載される方法によって治療可能なものとしては、インスリンの過剰投与（医原性高インスリン血症とも呼ばれる）、インスリノーマ、成長ホルモン欠陥、低副腎皮質機能、薬物の過剰投与、及びある種の腫瘍が挙げられる。

【0086】

興奮性神経組織のダメージにより発生する他の病理としては、発作障害（癲癇、痙攣、又は慢性発作障害等）が挙げられる。他の治療可能な症状及び疾患としては、卒中、多発性硬化症、低血圧症、心拍停止、アルツハイマー病、パーキンソン病、脳性小児麻痺、脳脊髄の外傷、AIDS痴呆、老化による認知機能の低下、記憶喪失（memory loss）、筋萎縮性側索硬化症、発作障害、アルコール中毒症、網膜虚血、緑内障により生じる視神経のダメージ、及びニューロン減少などの疾患が挙げられる。

10

【0087】

本発明の特定の組成物及び方法を用いて、網膜組織の症状及び網膜組織へのダメージを治療することができる。このような障害としては、網膜虚血、黄斑変性、網膜剥離、色素性網膜炎、動脈硬化性網膜症、高血圧性網膜症、網膜動脈閉塞（blockage）、網膜静脈閉塞、低血圧症、及び糖尿病性網膜症が挙げられるがこれらに限定されない。

【0088】

他の実施形態において、本発明の方法の原則は、放射線による興奮性組織へのダメージから生じる損傷を保護又は治療するために使用することができる。本発明の方法の他の用途は、神経毒中毒症（例えばドウモイ酸（domoic acid）による貝中毒、神経ラシリズム（neurolathyrism）及びGuam疾患等）、筋萎縮性側索硬化症、及びパーキンソン病の治療に

20

【0089】

上記のように、本発明は、上記のようなエリスロポエチンの末梢投与により哺乳動物における興奮性組織の機能を強化する方法にも関する。この方法を用いた治療により、種々の疾患及び症状を治療することができ、さらにこの方法は、何の症状も疾患もない場合に認知機能を増強するのに有用である。本発明のこれらの使用（ヒト及び非ヒト哺乳動物の両方における学習及び訓練の増強を含む）について、以下にさらに詳しく記載する。

【0090】

本発明のこの態様の方法によって治療することができる中枢神経系に関係する症状及び疾患としては、気分障害、不安障害、うつ病、自閉症、注意欠陥過活動性障害、及び認知機能障害が挙げられるが、これらに限定されない。これらの症状は神経機能の増強により恩恵を得る。本発明の教示に従って治療することができる他の障害には、睡眠障害（例えば睡眠時無呼吸及び旅行に係る障害等）、クモ膜下及び動脈瘤出血、低血圧性ショック、振とう症傷害、敗血症性ショック、アナフィラキシーショック、及び種々の脳炎及び髄膜炎（例えば狼瘡等の結合組織に係る脳炎）の続発症が含まれる。他の用途としては、神経毒による中毒（例えばドウモイ酸による貝中毒、神経ラシリズム及びGuam疾患等）、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、塞栓性もしくは虚血性傷害の術後の処置、全脳放射線照射、鎌状赤血球発症、ならびに子癇の予防又はこれらからの保護が挙げられる。

30

【0091】

本発明の方法によって治療することができる更なる症状群としては、遺伝性もしくは後天性のミトコンドリア機能障害（神経の損傷及び死を典型とする様々な神経疾患の原因となる）が挙げられる。例えば、リー病（亜急性壊死性脳障害）は、ニューロン脱落による視力低下の進行と脳障害及び筋障害を特徴とする。これらの場合、不完全なミトコンドリア代謝により、興奮性細胞の代謝の燃料となる高エネルギー物質を十分供給することができない。エリスロポエチン受容体活性調節因子は、様々なミトコンドリア疾患において弱まった機能を最適にする。上記のように、低酸素状態は、興奮性組織に悪影響を及ぼす。興奮性組織としては、中枢神経系組織、末梢神経系組織、及び心臓組織が挙げられるがこれらに限定されない。上記症状に加えて、本発明の方法は、一酸化炭素および煙の吸入などの吸入中毒、重度の喘息、成人呼吸促進症候群、ならびに窒息及び溺水の治療において有用である。低酸素状態を引き起こす又は何らかにより興奮性組織のダメージを誘導する更な

40

50

る症状としては、インスリンの不適切な投与において生じ得る又はインスリン産生新生物（インスリノーマ）を有する低血糖症が挙げられる。

【0092】

興奮性組織のダメージが原因であると考えられている様々な神経心理学的障害は、本発明の方法によって治療可能である。本発明による治療が提供される神経のダメージが関与している慢性疾患には、中枢神経系及び/又は末梢神経系に関係する障害（老化による認知機能の低下及び老人性痴呆、慢性発作障害、アルツハイマー病、パーキンソン病、痴呆、記憶喪失、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、結節硬化症、ウィルソン病脳及び進行性核上性麻痺、Guam疾患、レーヴィ小体痴呆、プリオン疾患（例えばクロイツフェルト-ヤコブ病、ハンティングトン病、筋緊張性ジストロフィー、フリートライヒ運動失調及び他の運動失調等の海綿状脳障害）、ジル・ド・ラ・ツレット症候群、癲癇等の発作障害及び慢性発作障害、卒中、脳もしくは脊髄の外傷、AIDS痴呆、アルコール中毒症、自閉症、網膜虚血、緑内障、高血圧症や睡眠障害等の自立神経機能障害、ならびに神経精神障害（精神分裂病、分裂情動性障害、注意欠陥障害、気分変調性障害、大うつ病、躁病、強迫性障害、精神活性物質使用障害、不安、パニック障害、一極性及び双極性情動障害を含むがこれらに限定されない）が含まれる。更なる神経精神障害及び神経変性障害としては、例えば、米国精神医学協会（American Psychiatric Association）の精神障害の診断及び統計マニュアル（Diagnostic and Statistical manual of Mental Disorders, DSM）に記載されているものがあり、最新バージョンは、本明細書中に参考として全て組み込まれる。

10

【0093】

他の実施形態において、エリスロポエチンを含む組換えキメラ毒素分子は、癌等の増殖性障害又は亜急性硬化性汎脳炎等のウイルス性障害を治療するための、毒素の治療的送達のために用いることができる。

20

【0094】

以下の表は、上記エリスロポエチンによって治療することができる様々な症状及び疾患の追加的な例の非限定的適応症を列挙している。

【表1】

細胞、組織又は器官	機能障害又は病理	症状又は疾患	タイプ
心臓	虚血	冠状動脈疾患	急性、慢性、安定、不安定
		心筋梗塞	ドレスラー症候群
		アングナ	
		先天性心疾患	弁膜性、心筋症
		プリンスメタル型狭心症	
		心臓破裂	動脈瘤性 鼻中隔穿孔
		血管炎	
	不整脈	頻脈、徐脈不整脈、 上室性、心室性、 伝導異常	安定、不安定、 過敏性頸動脈洞節
	うっ血性心不全	左心室、右心室、両心室	心筋症（特発性家族性、感染性、代謝性の、沈着症、不全症、結合組織障害、浸潤及び肉芽腫、神経血管性等）
		心筋炎	自己免疫性、感染性、突発性
		肺性心	
	鈍傷及び穿通損傷		
	毒素	コカイン	

10

20

【表 2】

細胞、組織又は器官	機能障害又は病理	症状又は疾患	タイプ
血管	高血圧症	原発性、続発性	
	潜函病		
	線維筋過形成		
	動脈瘤	解離性、破裂性、拡大性	
肺	閉塞	喘息、慢性気管支炎、気腫及び気道閉塞	
	虚血性肺疾患	肺動脈塞栓症、肺動脈血栓症、脂肪塞栓症	
	環境肺疾患		
	虚血性肺疾患	肺動脈塞栓症、肺動脈血栓症	
	間質性肺疾患	特発性肺線維症	
	先天性	嚢胞性線維症	
	肺性心		
	外傷		
	肺炎及び肺実質炎	感染性、寄生性、毒性、外傷性、火傷、吸引	
	サルコイドーシス		
脾臓	内分泌	真性糖尿病Ⅰ型及びⅡ型	ベータ細胞の不全、機能障害、糖尿病性神経障害
		脾臓の他の内分泌細胞不全	
	外分泌	脾臓外分泌不全	脾炎
骨	オステオペニア	原発性、続発性	性腺機能低下症、不動化

10

20

30

【表 3】

細胞、組織又は器官	機能障害又は病理	症状又は疾患	タイプ
			閉経後の 老化による 上皮小体機能亢進症 甲状腺機能亢進症 カルシウム、マグネシウム、リン及び/又は ビタミン D 欠乏
	骨髓炎		
	無血管性壊死		
	外傷		
	パジェット病		
皮膚	脱毛症	限局性 全体性	原発性 続発性 男性型禿頭症
	白斑	限局性 広汎性	原発性 続発性
	糖尿病性潰瘍化		
	末梢血管疾患		
	火傷		
自己免疫障害	狼瘡 紅斑 シェーグレン 慢性関節リウマチ 糸球体腎炎 血管炎		
	ランゲルハンス組織球 増殖症		
眼	視神経炎		
	鈍傷及び穿通損傷、 感染症、サルコイド、 鎌状赤血球症、網 膜剥離、側頭動脈炎		
胚及び胎児障害	仮死		
	虚血		

10

20

30

40

【表 4】

細胞、組織又は器官	機能障害又は病理	症状又は疾患	タイプ
CNS	慢性疲労症候群、 急性及び慢性の低浸透及び高浸透症候群、AIDS 痴呆、感電死		
	脳炎	狂犬病、疱疹	
	髄膜炎		
	硬膜下血腫		
	ニコチン中毒		
	薬物の乱用及び禁断症状	コカイン、ヘロイン、クラック、マリファナ、LSD、PCP、多重薬物乱用、エクスタシー、オピオイド、催眠鎮静薬、アンフェタミン、カフェイン	
	強迫性障害		
	脊髄狭窄症、 横断脊髄炎、 ギヤン-パレー症、 外傷、 神経根圧迫症、 腫瘍状圧迫症 心臓発作		
ENT	耳鳴 ムニエ症候群 (Meuniere syndrome) 聴覚障害		
	外傷性損傷、 気圧障害		
腎臓	腎不全	急性、慢性	血管性/虚血性、腸管疾患、糖尿病性腎臓疾患、ネフローゼ症候群、感染症
	ヘーノホ-シェーンライン紫斑病		
横紋筋	自己免疫障害	重症筋無力症 皮膚筋炎 多発性筋炎	

10

20

30

40

【表 5】

細胞、組織又は器官	機能障害又は病理	症状又は疾患	タイプ
	筋障害	遺伝性代謝性、内分泌性及び毒性、	
	心臓発作		
	挫滅傷		
	横紋筋融解 (Rhabdomyolysis)		
	ミトコンドリア疾患		
	感染症	壊死性筋膜炎	
性機能障害	中枢及び末梢	薬物投与に二次的な不能症	
肝臓	肝炎	ウイルス性、細菌性、寄生性	
	虚血性疾患		
	肝硬変、脂肪肝		
	浸潤性/代謝性疾患		
胃腸	虚血性腸疾患		
	炎症性腸疾患		
	壊死性腸炎		
器官移植	ドナー及び受容者の治療		
生殖道	不妊症	血管 自己免疫 子宮異常 体内移植障害	
内分泌	腺の機能亢進及び機能低下		

10

20

30

上記の通り、これらの疾患、障害又は症状は、本発明のエリスロポエチンによって提供される恩恵の範囲の単なる例示である。従って本発明は一般に、機械的な外傷又はヒト疾患の結果生じる不調の治療的もしくは予防的処置を提供する。CNS及び/又は末梢神経系の疾患、障害または症状の治療的もしくは予防的処置が好ましい。精神医学的要素を有する疾患、障害または症状の治療的もしくは予防的処置が提供される。眼、心血管、心肺、呼吸器系、腎臓、尿道、生殖器、胃腸、内分泌性又は代謝性の要素を持つもの等（ただしこれらに限定されない）の疾患、障害または症状の治療的もしくは予防的処置が提供される。

40

【0095】

1つの実施形態において、エリスロポエチンのこのような医薬組成物は、標的細胞、組織又は器官を保護又は増強するために全身に投与することができる。このような投与は、非経口、吸入、又は粘膜経由で行われる（例えば口内、鼻腔内、直腸内、膣内、舌下、粘膜下、又は経皮投与等）。好ましくは、投与は、例えば静脈内もしくは腹腔内注射等による非経口経由であり、例えば動脈内、筋肉内、皮内及び皮下投与が挙げられるがこれらに限定されない。

【0096】

灌流液の使用、器官内への注射又は他の局所投与等による他の投与経路の場合、上記と同様のレベルのエリスロポエチンをもたらす医薬組成物が提供される。約15pM～30nMのレベ

50

ルが好ましい。

【0097】

本発明の医薬組成物は、治療的有効量の化合物及び薬学的に許容可能な担体を含み得る。特定の実施形態において、「薬学的に許容可能な」という用語は、動物（特にヒト）への使用が、連邦政府又は州政府の取締機関により認証されていること、又は米国薬局方もしくは他の一般に認識されている外国薬局方に記載されていることを意味する。「担体」という用語は、治療剤と一緒に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、又はビヒクルを指す。このような医薬担体は、無菌液（例えば生理食塩水、又は石油、動物、植物もしくは合成起源の油等（例えば落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油等を含む））であってもよい。医薬組成物を静脈内投与する場合、生理食塩水が好適な担体である。特に注射用溶液の場合、生理食塩水、デキストロース水溶液及びグリセロール水溶液を液体担体として使用することもできる。好適な医薬賦形剤としては、澱粉、ブドウ糖、乳糖、ショ糖、ゼラチン、麦芽、米、コムギ、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセリン、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水及びエタノール等が挙げられる。望ましい場合、組成物は、少量の湿潤剤、乳化剤、又はpH緩衝剤を含むこともできる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、乳液、錠剤、丸剤、カプセル、粉剤、及び持続放出性製剤等であってもよい。この組成物は、伝統的な結合剤及び担体（トリグリセリド等）と一緒に坐剤として製剤化することができる。本発明の組成物は、中性のもの又は塩として製剤化することができる。薬学的に許容可能な塩としては、遊離アミノ基と共に形成されたもの（塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸及び酒石酸等から誘導されたもの等）、ならびに遊離カルボキシル基と共に形成されたもの（ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第2鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等から誘導されたもの等）が挙げられる。好適な医薬担体の例は、"Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martinに記載されている。このような組成物は、治療上有効な量の該化合物（好ましくは純粋な形態）を、患者への投与に適した形状にするために適量の担体と一緒に含む。製剤は、投与方法に見合ったものでなければならない。

10

20

【0098】

経口投与用の医薬組成物は、カプセル剤もしくは錠剤として、粉剤もしくは顆粒剤として、（水性もしくは非水性液体中の）溶液、シロップもしくは懸濁剤として、食用泡沫もしくはホイップとして、又は乳剤として提供されてもよい。錠剤もしくは硬ゼラチンカプセルは、乳糖、澱粉もしくはその誘導体、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウム糖（sodium saccharine）、セルロース、炭酸マグネシウム、ステアリン酸もしくはその塩等を含む得る。軟ゼラチンカプセルは、植物油、ろう、脂肪、半固体もしくは液体ポリオール等を含み得る。溶液及びシロップ剤は、水、ポリオール及び糖類を含み得る。

30

【0099】

経口投与のための有効成分は、胃腸管内での該有効成分の分解及び/又は吸収を遅らせる物質でコーティングしたりこのような物質と混合したりしてもよい。例えばモノステアリン酸グリセリン又はジステアリン酸グリセリン等を使用してもよい。このように、有効成分の持続性放出は、何時間もの間行っても良いし、必要であれば、有効成分は胃の中で分解されないようにすることができる。経口投与用の医薬組成物は、特定のpH又は酵素条件によって胃腸内の特定の位置で有効成分の放出を促進するよう製剤化してもよい。

40

【0100】

経皮投与用の医薬組成物は、受容者の表皮に長時間密着させるための独立型のパッチとして提供されてもよい。局所投与用の医薬組成物は、軟膏、クリーム、懸濁液、ローション、粉末、溶液、パスタ剤、ゲル、スプレー、エアロゾル又はオイルとして提供されてもよい。皮膚、口、眼又は他の外部組織への局所投与用には、表面塗布用の軟膏又はクリームが好ましくは使用される。軟膏として製剤化される場合、有効成分は、パラフィン系もしくは水混和性の軟膏基剤と一緒に使用することができる。あるいは、有効成分は、水中油基剤又は油中水基剤を用いてクリームとして製剤化することができる。眼への局所投与用の

50

医薬組成物としては、点眼剤が挙げられる。これらの組成物中において、有効成分は、適当な担体の中（例えば水性溶剤の中）に溶解もしくは懸濁させることができる。口内への局所投与用の医薬組成物としては、トローチ剤、香錠及びマウスウォッシュが挙げられる。

【0101】

鼻腔内及び肺投与用の医薬組成物は、粉末（好ましくは20～500ミクロンの粒径を有するもの）などの固体担体を含み得る。粉末は、鼻でかぐようにして（すなわち鼻の近くに保持された粉末の容器から鼻でさっと吸入することにより）投与することができる。あるいは、鼻腔内投与用の組成物は、液体担体を含み得る（例えば鼻内スプレー又は点鼻剤等）。あるいは、深く吸入したり又はマウスピースを介して咽頭口腔部に装置を据え付けることによって、肺への直接吸入を行ってもよい。これらの組成物は、有効成分の水性もしくは油性溶液を含み得る。吸入による投与用の組成物は、所定用量の有効成分を提供するように構築することができる専用デバイス（加圧エアロゾル、ネブライザー、又は注入器を含むがこれらに限定されない）に入れて供給される。好適な実施形態において、本発明の医薬組成物は、鼻腔内に直接、又は鼻腔もしくは咽頭口腔部を介して肺へと投与される。

10

【0102】

直腸投与用の医薬組成物は、坐剤又は浣腸剤として提供することができる。腔内投与用の医薬組成物は、ペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、パスタ剤、泡沫剤又はスプレー製剤として提供することができる。

【0103】

非経口投与用の医薬組成物としては、水性及び非水性の無菌注射用溶液もしくは懸濁液が挙げられ、これらは、酸化防止剤、緩衝剤、静菌薬、及び投与を受ける受容者の血液と該組成物とがほぼ等張となるようにする溶質を含み得る。このような組成物中に含まれ得る他の成分としては、例えば水、アルコール、ポリオール、グリセリン及び植物油が挙げられる。非経口投与用組成物は、単位服用量もしくは複数分の服用量の容器（例えば密閉アンプル及びバイアル）に入れて提供され、使用直前に無菌液体担体（例えば注射用無菌生理食塩溶液等）を加えるだけですむように、冷凍乾燥（凍結乾燥）状態で保存することができる。即時調合注射用溶液及び懸濁液は、無菌粉剤、顆粒剤及び錠剤から調製することができる。1つの実施形態において、救急車、救急室、及び戦場といった状況下での緊急時の使用のために、また、家庭内状況における自己投与のために（特に、例えば芝狩機の不注意な使用等による外傷性切断の可能性が生じ得る場合）、エリスロポエチンの注射用溶液を含む自己注射器が提供される。切断された身体部分の複数の部位にエリスロポエチンをできるだけ早く投与することによって、たとえ現場に医師が到着する前もしくは足指が切断された患者が運ばれて救急室に到着する前であっても、切断された足又は足指の中の細胞及び組織が再び取りつけた後に生き残る可能性を高くすることができる。

20

30

【0104】

好適な実施形態において、組成物は、ヒトへの静脈内投与用の医薬組成物と同様の常套手法に従って製剤化される。典型的には、静脈内投与用の組成物は、無菌等張水性緩衝液中の溶液である。必要であれば、組成物は、可溶化剤及び注射部位の痛みを和らげるリドカイン等の局部麻酔も含み得る。一般的に、これらの成分は別々に又は単位剤形の中に一緒に混合して（例えば有効成分の量を示すアンプルやサッシェ（sachette）等の気密封止容器に入れた凍結乾燥粉末又は無水濃縮物として）供給される。組成物を注入により投与する場合、医薬品質の無菌水もしくは生理食塩水を含む注入ボトルを用いて投薬することができる。組成物を注射により投与する場合、投与前に成分を混合することができるように、無菌食塩水の入ったアンプルを提供することができる。

40

【0105】

一般に坐剤は有効成分を0.5～10重量%含み、経口投与用製剤は好ましくは有効成分を10%～95%含む。

【0106】

in situ灌流用の移植器官浴（transplanted organ bath）で使用するため、又は器官を回

50

収する前に器官ドナーの脈管に投与するための、灌流液組成物を提供することができる。このような医薬組成物は、個体への急性もしくは慢性の局部投与又は全身投与には適さないレベルもしくは形態のエリスロポエチンを含み得るが、死体、器官浴、器官灌流液、又はin situ灌流液において本明細書中で意図される機能を果たすものであり、その後、処理した器官又は組織を正常な循環にさすもしくは戻す前に、その中に含まれるエリスロポエチンのレベルを除去する又は低下させる。本発明のこの態様のためのエリスロポエチンは、非限定的な例として、ヒトエリスロポエチン等の天然発生形態等の任意のエリスロポエチン、又はアシアロエリスロポエチン及びフェニルグリオキサールエリスロポエチン等の上記エリスロポエチンのいずれであってもよい。

【0107】

10

また本発明は、本発明の医薬組成物の成分のうちの1つ以上を充填した1つ以上の容器を含む医薬パックもしくはキットも提供する。場合により、このような容器に、医薬品もしくは生物学的製剤の製造、使用又は販売を規制する政府機関により規定されたフォームで書かれた注意書き（この注意書きはヒト投与のための製造、使用又は販売を規制する管轄機関による認可を反映する）を添えることができる。

【0108】

例えば1つの実施形態において、エリスロポエチンは放出制御系で送達することができる。例えば、静脈内注入、移植可能浸透圧ポンプ、経皮パッチ、リポソーム、又は他の投与方法を用いてポリペプチドを投与することができる。1つの実施形態においては、ポンプを使用することができる（以下の文献を参照されたい：Langer（前掲）；Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwaldら, 1980, Surgery 88:507; Saudekら, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574）。他の実施形態において、化合物は小胞（特にリポソーム）内に入れて送達することができる（以下の文献を参照されたい：Langer, Science 249:1527-1533(1990)；Treatら, in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein及びFidler（編）, Liss New York, pp.353-365(1989)；国際特許出願公開番号第W091/04014；米国特許第4,704,355号；Lopez-Berestein, 同書, pp.317-327；一般に同書を参照されたい）。1つの実施形態において、ポリマー系材料を用いることができる（以下の文献を参照されたい：Medical Applications of Controlled Release, Langer及びWise(編), CRC Press; Boca Raton, Florida, 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball(編), Wiley: New York (1984)；Ranger及びPappas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61, 1953；また以下の文献も参照されたい：Levyら, 1985, Science 228:190; Duringら, 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howardら, 1989, J. Neurosurg. 71:105）。

20

30

【0109】

さらに他の実施形態において、制御型放出系を治療標的（即ち標的細胞、組織又は器官）の近傍に設置することができる。こうすることにより、全身投与で必要とされる用量に比べて少ない用量しか必要としなくなる（例えばGoodson, pp.115-138 in Medical Applications of Controlled Release, Vol. 2(前掲), 1984を参照されたい）。他の制御型放出系は、Langerによる概説（1990, Science 249:1527-1533）に記載されている。

【0110】

40

他の実施形態において、適切に製剤化されたエリスロポエチンは、鼻腔内、口内、直腸内、膣内、又は舌下投与により投与することができる。

【0111】

特定の実施形態において、治療を必要とする領域に本発明のエリスロポエチン組成物を局所投与することが望ましい。これは、例えば（ただし限定する訳ではない）外科手術中の局所注入により、局所投与（例えば外科手術後の創傷包帯と組み合わせた投与）、注射により、カテーテルにより、坐剤により、又はインプラントを用いて、行うことができる。インプラントは、多孔性、非多孔性、又はゼラチン状の材料（シラスチック膜等の膜又は繊維を含む）からできている。

【0112】

50

好適な有効用量の選択は、当業者に公知である幾つかの要因の考慮に基づいて専門家により決定される。このような要因としては、エリスロポエチンの具体的な形態、ならびに医薬化合物の規制認可を得る際に一般に使用される一般開発手続き (usual development procedure) 中に確立されているであろうその薬物動態パラメータ (例えばバイオアベイラビリティ、代謝、半減期等) が挙げられる。用量決定の際に考慮される更なる要因としては、治療される症状もしくは疾患、または正常な個体において得られるべき恩恵、患者の体重、投与経路 (投与は急性もしくは慢性的なものであってもよい)、併用薬物の適用の有無、及び投与された薬学的物質の効力に影響を及ぼす周知の他の要因が挙げられる。このように正確な投薬量は、標準的な臨床技法に従って、医師の判断及び各患者の状況に従って (例えば個々の患者の体調及び免疫状態等に応じて) 決定されるべきである。

10

【0113】

本発明の他の態様において、移植用器官の還流及び保存のための灌流液又は還流溶液が提供される。還流溶液は、エリスロポエチン応答性細胞及び関連する細胞、組織もしくは器官を保護するのに有効な量のエリスロポエチンを含む。移植には、器官 (細胞、組織又は他の身体部分を含む) をあるドナーから回収して異なる受容者に移植する異個体間移植 (xenotransplantation)、及び、身体の一部から器官を取り出して他の部位に移植する自己移植 (例えば腫瘍除去等のために器官を取り出し、ex vivoで切除、修復又は処理した後、元の場所に戻すベンチ外科手術を含む) が含まれるがこれらに限定されない。1つの実施形態において、還流溶液は、約1~約25U/mlエリスロポエチン、5%ヒドロキシエチル澱粉 (分子量約200,000~約300,000であり、エチレングリコール、エチレンクロロヒドリン、塩化ナトリウム及びアセトンを実質的に含まない)、25mM KH_2PO_4 、3mMグルタチオン、5mMアデノシン、10mMグルコース、10mM HEPES緩衝液、5mMグルコン酸マグネシウム、1.5mM CaCl_2 、105mMグルコン酸ナトリウム、200,000unitのペニシリン、40unitのインスリン、16mgのデキサメタゾン、12mgのフェノールレッドを含む、pH7.4~7.5、重量モル浸透圧約320mOsm/lの、ウィスコンシン大学 (the University of Wisconsin, UW) 溶液 (米国特許第4,798,824号) である。この溶液は、移植前に死体の腎臓及び脾臓を維持するために用いられる。この溶液を用いると、死体の腎臓保存に推奨される制限時間30時間を超える長い時間保存することができる。この特定の灌流液は、有効量のエリスロポエチンを含むことによって本発明の用途に適合させることができる多くのこのような溶液のうちの単なる例である。さらなる実施形態において、灌流溶液は、約5~約35U/mlエリスロポエチン又は約10~約30U/mlエリスロポエチンを含む。上記のように、本発明のこの態様において任意の形態のエリスロポエチンを使用することができる。

20

30

【0114】

本明細書中を通じて記載される目的のためのエリスロポエチンの好適な受容者はヒトであるが、本明細書中に記載される方法は、他の哺乳動物 (特に飼養動物、家畜動物、ペット及び動物園の動物) に同様に適用することができる。しかし、本発明はそれらの動物に限定されず、恩恵はあらゆる哺乳動物に適用することができる。

【0115】

ex-vivoでの本発明のさらなる態様において、上記エリスロポエチン (ただしそれらに限定されない)、天然エリスロポエチン、それらの類似体、エリスロポエチン模倣体、エリスロポエチンフラグメント、ハイブリッドエリスロポエチン分子、エリスロポエチン受容体結合性分子、エリスロポエチンアゴニスト、腎エリスロポエチン、脳エリスロポエチン、そのオリゴマー、その多量体、その突然変異蛋白質、その同属種、その天然発生形態、その合形成態、その組換え形態、そのグリコシル化変異体、その脱グリコシル化変異体、又はその組合せ等を含むどのエリスロポエチンであってもよい。

40

【0116】

本発明の他の態様において、内皮細胞バリアにより脈管構造から隔離されていない細胞、組織又は器官の生存力を増強する方法及び組成物は、エリスロポエチンを含む医薬組成物にその細胞、組織もしくは器官を直接曝露することにより、又はその組織もしくは器官の脈管構造にエリスロポエチン含有医薬組成物を投与するもしくは接触させることにより、

50

提供される。処理した組織又は器官の中のエリスロポエチン応答性細胞の活性の増強は、発揮されるプラスの効果の原因となる。

【0117】

上記のように、本発明は、エリスロポエチン分子が、管腔表面から、例えば脳、網膜、及び精巣を含む内皮細胞の密着帯を有する器官の毛管の内皮細胞の基底膜表面へと輸送されることができる、という発見に一部基づく。このように、バリアを通過するエリスロポエチン応答性細胞は、エリスロポエチンの有益な影響を受け易い標的であり、その中にエリスロポエチン応答性細胞を含み且つそれらに全てもしくは一部依存する他の細胞型、組織又は器官は、本発明の方法の標的である。特定の理論に限定するわけではないが、エリスロポエチンのトランスサイトーシスの後、エリスロポエチンは、例えば神経、網膜、筋肉、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、副腎皮質、副腎髄質、毛細管内皮、精巣、卵巣もしくは子宮内膜等のエリスロポエチン応答性細胞上のエリスロポエチン受容体と相互作用することができる。そして受容体に結合することにより、エリスロポエチン応答性細胞もしくは組織の中の遺伝子発現プログラムを活性化して、毒素、化学療法剤、放射線療法、低酸素症等のダメージから細胞、組織もしくは器官を保護するシグナル伝達カスケードを始動することができる。このように、損傷又は低酸素性ストレスからエリスロポエチン応答性細胞を含む組織を保護し及びこのような組織の機能を増強する方法について、以下に詳細に説明する。

10

【0118】

本発明の1つの実施形態の実施にあたり、哺乳動物患者に、神経、肺、心臓、卵巣又は精巣へのダメージ等の副作用を一般に有する癌治療のための全身化学療法（放射線治療を含む）を受けさせる。上記のようなエリスロポエチンを含む医薬組成物の投与は、化学療法及び/又は放射線療法を行う前または行っている間に、化学療法剤によるダメージから様々な組織及び器官を保護するために（例えば精巣を保護するために）実施される。治療は、化学療法剤の循環レベルが哺乳動物の身体に危険を及ぼす可能性のあるレベル未満に下がるまで続けることができる。

20

【0119】

本発明の他の実施形態の実施にあたり、交通事故犠牲者から複数の受容者に移植するために様々な器官を回収するように計画し、これらの器官のうちの幾つかは長距離及び長時間の輸送が必要であった。器官回収の前に、本明細書記載のエリスロポエチンを含む医薬組成物を犠牲者に注入した。出荷用の回収器官を、本明細書記載のエリスロポエチンを含む灌流液で灌流させ、エリスロポエチンを含む浴の中に保存した。ある器官は、本発明のエリスロポエチンを含む灌流液を利用した拍動性灌流装置を用いて連続的に灌流した。in situでの輸送中、移植時、及び器官の再灌流時の器官機能の劣化は最小限に食い止められた。

30

【0120】

本発明の他の実施形態において、心臓弁を修復するための外科手術で、一時的な心停止及び動脈閉塞が必要であった。外科手術前に、患者に体重1kgあたり500Uエリスロポエチンを注入した。このような治療は、特に再灌流後に、低酸素性虚血による細胞ダメージを防いだ。

40

【0121】

本発明の他の実施形態において、任意の外科手術（例えば心肺バイパス手術等）において、天然発生形態のエリスロポエチン又は本発明の任意のエリスロポエチンを用いることができる。1つの実施形態において、脳、心臓、及び他の器官の機能を保護するために、上記エリスロポエチンを含む医薬組成物の投与は、バイパス手術を行う前、行っている間、及び/又は行った後に行われる。

【0122】

天然エリスロポエチンを含む本発明のエリスロポエチンをex-vivo用途で使用する上記例において、または神経組織、網膜組織、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、副腎皮質、副腎髄質、毛細管内皮、精巣、卵巣もしくは子宮内膜の細胞又は組織等のエリスロポエチン応答

50

性細胞を治療するために、本発明は、脈管構造の遠位にあるエリスロポエチン応答性細胞、組織もしくは器官の保護又は増強に適応させた単位剤形としての医薬組成物を提供する。この医薬組成物は、剤形1つあたり、約50,000~500,000 Unit、60,000~500,000 Unit、70,000~500,000 Unit、80,000~500,000 Unit、90,000~500,000 Unit、100,000~500,000 Unit、150,000~500,000 Unit、200,000~500,000 Unit、250,000~500,000 Unit、300,000~500,000 Unit、350,000~500,000 Unit、400,000~500,000 Unit、又は450,000~500,000 Unitの範囲の有効な非毒性量のエリスロポエチン、エリスロポエチン受容体活性化因子、又はエリスロポエチン活性化型受容体調節因子、ならびに薬学的に許容可能な担体を含む。好適な実施形態において、エリスロポエチンの有効な非毒性量は、約50,000~500,000 Unitの範囲内である。好適な実施形態において、上記組成物中のエリスロポエチンは、非赤血球産生性である。

10

【0123】

本発明のさらなる態様において、エリスロポエチンの投与は、脳に外傷を負った動物の認知機能を回復させることが分かった。5日又は30日遅れた後でも、エリスロポエチンの投与はなお、擬似手術を行った動物と比較して機能を回復させることができた。これは、脳の活性を再生もしくは回復させるエリスロポエチンの能力を示している。このように、本発明は、脳の外傷又は他の認知機能障害の治療（損傷後、例えば3日後、5日後、1週間後、1ヶ月後またはそれ以上の治療も含む）のための医薬組成物を調製するためのエリスロポエチンの使用にも関する。また本発明は、有効量のエリスロポエチンを投与することによる、損傷後の認知機能障害の治療方法にも関する。本発明のこの態様では、本明細書中に記載されるどのエリスロポエチンを使用してもよい。

20

【0124】

さらに、本発明のこの機能回復の態様は、治療がその機能障害の原因となる最初の傷害の後及びしばらくたった後に開始される場合の、細胞、組織もしくは器官の機能不全を回復させる医薬組成物の調製のための本明細書中に記載されるエリスロポエチンのいずれかの使用に関する。さらに、本発明のエリスロポエチンを用いた治療は、急性期及び慢性期の疾患又は症状の過程を通して行うことができる。

【0125】

好適な実施形態において、本発明のエリスロポエチンが赤血球産生作用を有する場合、エリスロポエチンは、一回の投与あたり、約300~約10,000 Unit/kg体重、好ましくは約500~5,000 Unit/kg体重、最も好ましくは約1,000 Unit/kg体重の用量で全身投与され得る。この有効用量は、エリスロポエチンを投与した後に、エリスロポエチンの血清レベルを血清1mlあたり約10,000、15,000又は20,000mUを超えるレベルとするために十分な量でなければならない。このような血清レベルは、投与後約1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10時間経過後に達成されるものであってもよい。このような投薬は必要に応じて繰り返すことができる。例えば投薬は、臨床的に必要である限り毎日繰り返してもよいし、適当な間隔をもうけて（例えば1週間~12週間毎、好ましくは1~3週間毎に）繰り返してもよい。1つの実施形態において、有効量のエリスロポエチン及び薬学的に許容可能な担体を1回分服用量のバイアル又は他の容器の中にパッケージングすることができる。他の実施形態において、本明細書中に記載される目的に有用なエリスロポエチンは非赤血球産生性である、すなわち本明細書中に記載される活性を発揮することができるがヘモグロビン濃度またはヘマトクリットの上昇を引き起こすものではない。このような非赤血球産生性形態のエリスロポエチンは、本発明の方法を長期的に提供する場合に好適である。他の実施形態において、エリスロポエチンは、赤血球産生を最大限に刺激するのに必要な量を超える量で与えられる。上記のように、本発明のエリスロポエチンは、赤血球産生作用を必ずしも持っている必要がないので、赤血球産生単位（Unit）で表された上記用量は単に赤血球産生性エリスロポエチンの場合の例であり、どのエリスロポエチンにも適用可能な上記モル当量の投薬量が提供される。

30

40

【0126】

本発明はさらに、上記エリスロポエチンに会合させた特定の分子を含む組成物を投与する

50

ことによって哺乳動物の体内の内皮細胞バリアを介する分子の輸送を容易にする方法に関する。上記のように、体内のある器官の中の内皮細胞同士の間密着帯は、ある種の分子の侵入を防ぐバリアを生成する。バリア機能に守られた器官の中の種々の症状を治療するために、薬物の通過を促進する手段が望ましい。本発明のエリスロポエチンは、血液脳関門及び同様のバリアを介して他の分子を送達するための担体として有用である。エリスロポエチンと共にバリアを通過させたい分子を含む組成物を調製し、その組成物を末梢投与すると、バリアを介する該組成物のトランスサイトーシスが得られる。バリアを通過させたい分子とエリスロポエチンとの会合は、不安定な共有結合であってもよく、この場合は、バリアを通過した後に該分子がエリスロポエチンと会合した状態から解放される。該分子の所望の薬理学的活性がエリスロポエチンとの会合により維持されるか又は会合により影響を受けない場合、このような複合体を投与することができる。

10

【0127】

当業者であれば、分子を本発明のエリスロポエチン及び上記他の物質と共有結合、非共有結合および他の手段により会合させる様々な手段を思いつくことができるであろう。さらに、実験システムにおける組成物の効力の評価法を簡単に決定することもできるであろう。エリスロポエチンと分子との会合は、様々な手段（不安定な共有結合、架橋等を含む）によって行ってもよい。ビオチンとアビジンとの相互作用を用いることもできる。上記のように、組換えもしくは合成手段によって、例えばその分子の所望の薬理活性を有するドメイン及びエリスロポエチン受容体活性化調節を担うドメインの両方を含むハイブリッド分子を調製してもよい。

20

【0128】

多官能性分子（すなわち多官能性架橋剤）を介して分子をエリスロポエチンに結合させることができる。本明細書中で使用される「多官能性分子」という用語は、連続して2回以上反応することができる1つの官能基を有する分子（ホルムアルデヒド等）及び2つ以上の反応性基を有する分子を包含する。本明細書中で使用される「反応性基」という用語は、ある分子（例えば内皮細胞バリアを介して送達しようとするペプチド、タンパク質、炭水化物、核酸、特にホルモン、抗生物質、又は抗癌剤）上の官能基と反応する架橋剤上の官能性基であって、反応すると架橋剤と分子との間に共有結合を形成する官能基を指す。「官能基」という用語は、有機化学におけるその標準的な意味を持つ。使用することができる多官能性分子は、好ましくは成体適合性リンカーである（すなわちこれらは *in vivo* において非発癌性、非毒性であり、実質的に非免疫原性である）。当分野で公知であるものや本明細書中に記載されるもの等の多官能性架橋剤は、これらの生態適合性を決定するために動物モデルで簡単にテストすることができる。多官能性分子は好ましくは二官能性である。本明細書中で使用される「二官能性分子」とは、2つの反応性基を有する分子を指す。二官能性分子は、ヘテロ二官能性であってもホモ二官能性であってもよい。ヘテロ二官能性架橋剤により、有向性接合（vectorial conjugation）が可能となる。架橋反応を水溶液（pH6~8に緩衝された水溶液等）の中で生じさせるには多官能性分子が十分な水溶性を有すること、及びより効果的な生体内分布を得るためには得られる接合体が水溶性のままであることが特に好ましい。典型的には、多官能性分子はアミノもしくはスルフィド官能基に共有結合する。しかし、他の官能基（例えばカルボン酸又はヒドロキシル基）に対して反応性である多官能性分子も本発明において想定される。

30

40

【0129】

ホモ二官能性分子は少なくとも2つの同種の反応性官能基を有する。ホモ二官能性分子上の反応性官能基は、例えばアルデヒド基および活性エステル基を含む。アルデヒド基を有するホモ二官能性分子としては、例えばグルタルアルデヒド及びサブアラルデヒド（subaraldehyde）が挙げられる。架橋剤としてのグルタルアルデヒドの使用は、Poznanskyら、Science 223, 1304-1306 (1984)により開示された。少なくとも2つの活性エステルユニットを有するホモ二官能性分子としては、ジカルボン酸及びN-ヒドロキシスクシンイミドのエステルが挙げられる。このようなN-スクシンイミジルエステルの幾つかの例としては、ジスクシンイミジルスベリン酸塩及びジチオ-ビス-（スクシンイミジルプロピオン酸塩）

50

、ならびにこれらの可溶性ビス-スルホン酸及びビススルホン酸塩（これらのナトリウム塩及びカリウム塩等）が挙げられる。これらのホモ二官能性試薬は、Pierce (Rockford, Illinois) から入手可能である。

【0130】

ヘテロ二官能性分子は、少なくとも2つの異種の反応性基を有する。反応性基は、（例えばエリスロポエチン上及び分子上に存在する）異なる官能基と反応する。ヘテロ二官能性架橋剤上の反応性基と反応するこれら2つの異なる官能基は通常、アミノ基（例えばリシンのアミノ基等）、スルフヒドリル基（例えばシステインのチオール基等）、カルボン酸（例えばアスパラギン酸上のカルボキシラート等）、又はヒドロキシ基（例えばセリン上のヒドロキシ基等）である。

10

【0131】

もちろん、本発明の種々のエリスロポエチン分子は、ある架橋剤と共に使用することができる適当な反応性基をもたなくてもよいが、当業者であれば、本発明のエリスロポエチン中の架橋に利用できる基に基づいて架橋剤の選択を十分行うことができるであろう。

【0132】

ヘテロ二官能性分子の反応性基がアミノ基と共に共有結合を形成するとき、この共有結合は通常はアミドもしくはイミド結合である。アミノ基と共有結合を形成する反応性基は、例えば活性化されたカルボキシラート基、ハロカルボニル基、またはエステル基であってもよい。好適なハロカルボニル基は、クロロカルボニル基である。エステル基は好ましくは例えばN-ヒドロキシ-スクシンイミドエステル基等の反応性エステル基である。

20

【0133】

典型的には、他の官能基は、チオール基、チオール基に変換されることができる基、またはチオール基と共に共有結合を形成する基である。共有結合は通常はチオエーテル結合又はジスルフィド結合である。チオール基と共に共有結合を形成する反応性基としては、例えば、チオール基または活性化されたジスルフィドと反応する二重結合が挙げられる。チオール基と反応することができる二重結合を含む反応性基はマレイミド基であるが、アクリロニトリル等の他の反応性基も可能である。反応性ジスルフィド基としては例えば2-ピリジルジチオ基又は5,5'-ジチオ-ビス-(2-ニトロ安息香酸)基が挙げられる。反応性ジスルフィド結合を含むヘテロ二官能性試薬の幾つかの例としては、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジル-ジチオ)プロピオン酸塩 (Carlssonら, 1978, Biochem J., 173:723-737)、S-4-スクシンイミジルオキシカルボニル- α -メチルベンジルチオ硫酸ナトリウム、及び4-スクシンイミジルオキシカルボニル- α -メチル-(2-ピリジルジチオ)トルエンが挙げられる。N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸塩が好ましい。チオール基と反応する二重結合を有する反応性基を含むヘテロ二官能性試薬の幾つかの例としては、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート及びスクシンイミジル m -マレイミド安息香酸塩が挙げられる。

30

【0134】

他のヘテロ二官能性分子としては、スクシンイミジル3-(マレイミド)プロピオン酸、スルホスクシンイミジル4-(p -マレイミド-フェニル)酪酸塩、スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル-シクロヘキサン)-1-カルボン酸塩、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシ-スクシンイミドエステルが挙げられる。スクシンイミジル m -マレイミドベンゾエートのスルホン酸ナトリウム塩が好ましい。上記ヘテロ二官能性試薬及びこれらのスルホン酸塩の多くは、Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois USAから入手可能である。

40

【0135】

上記可逆的又は不安定な接合をさせるために必要なことは、当業者により簡単に決定することができる。接合体を、*in vitro*にてエリスロポエチン及び所望の薬理活性の両方についてテストすることができる。接合体がどちらの活性も維持している場合、次にその適合性について*in vivo*でテストする。接合された分子がその活性化のためにエリスロポエチンからの分離を必要とする場合、エリスロポエチンとの不安定な結合又は可逆的会合が好

50

ましい。不安定性の特徴についても、*in vivo*でテストする前に標準的な*in vitro*手法を用いてテストすることもできる。

【0136】

これら及び他の多官能性試薬をどのように作製及び使用するかについての更なる情報は、以下に挙げる出版物又は当分野で入手可能な他の出版物から入手することができる。

【0137】

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Staros, J.V., 1979, *Eur. J. Biochem.* 101:395-399.

Yoshitake, S.ら, 1982, *Biochem.* 21:3950-3955.

Yoshitake, S.ら, 1982, *J. Biochem.* 92:1413-1424.

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

Novick, D.ら, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:8483-8487.

Lomant, A.J.及びFirbanks, G., 1976, *J. Mol. Biol.* 104:243-261.

Hamada, H.及びTsuruo, T., 1987, *Anal. Biochem.* 160:483-488.

Hashida, S.ら, 1984, *J. Applied Biochem.* 6:56-63.

さらに、架橋方法については、Means及びFeeney, 1990, *Bioconjugate Chem.* 1:2-12により概説が記載されている。

【0138】

本発明の上記方法及び組成物が通過するバリアとしては、血液脳関門、血液眼関門、血液精巣障壁、血液卵巣関門、及び血液胎盤関門が挙げられるが、これらに限定されない。

【0139】

内皮細胞バリアを介して輸送させる候補分子としては、例えば成長ホルモン等のホルモン、神経栄養因子、例えば脳及び他のバリア機能に守られた器官からは通常除外されるもの等の抗生物質又は抗真菌剤、ペプチド放射性医薬品、アンチセンス薬、生物学的に活性な物質に対する抗体、医薬品、及び抗癌剤等が挙げられる。このような分子の非限定的な例としては、成長ホルモン、神経成長因子 (NGF)、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、毛様体神経栄養因子 (CNTF)、塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF)、トランスフォーミング増殖因子 1 (TGF 1)、トランスフォーミング増殖因子 2 (TGF 2)、トランスフォーミング増殖因子 3 (TGF 3)、インターロイキン1、インターロイキン2、インターロイキン3、インターロイキン6、AZT、腫瘍壊死因子に対する抗体、及びシクロスポリン等の免疫抑制剤が挙げられる。

【0140】

また本発明は、内皮細胞の密着帯バリアを介したトランスサイトosisにより輸送させようとする分子と上記エリスロポエチンとを含む組成物にも関する。本発明はさらに、上記のようにバリアを介して分子を送達するための医薬組成物を調製するための、上記エリスロポエチンと該分子との接合体の使用に関する。

【0141】

本発明は、本発明の例として提供される以下の非限定的実施例を参照することによってさらに良く理解することができる。以下の実施例は、本発明の好適な実施形態をよりあますところなく示すために提供される。ただしこれらの実施例は、本発明の広い範囲を限定す

10

20

30

40

50

るものと考えるべきではない。

【実施例】

【0142】

実施例 1

密着血液脳脊髄液関門を通過するエリスロポエチン

成体雄Sprague-Dawleyラットに麻酔をかけ、組換えヒトエリスロポエチンを腹膜内投与した。30分間隔で最長4時間、大槽から脳脊髄液のサンプルを取り、高感度の特異的酵素結合イムノアッセイを用いてエリスロポエチン濃度を測定した。図1に示すように、CSF内におけるベースラインエリスロポエチン濃度は8mU/mlである。数時間遅れて、CSF内で測定されるエリスロポエチンのレベルは上昇し始め、2.5時間以後は、ベースライン濃度とは大きく異なる ($p<0.01$ レベル)。約100mU/mlのピークレベルは、in vitroにおいて保護的な効果を発揮することが分かっている範囲内である (0.1~100mU/ml)。ピークに達する時間は約3.5時間頃であり、これは、ピーク血漿レベルのもの (1時間未満) よりかなり遅れている。この実験結果は、適当な濃度のエリスロポエチンの非経口ボーラス投与によって、有意なレベルのエリスロポエチンが密着細胞結合を通過することができることを示している。

10

【0143】

実施例 2

移植術用に用意された心臓内での機能の維持

Wistar雄ラット (体重300~330g) に、エリスロポエチン (5000U/kg体重) 又はビヒクルを与えた24時間後、ex vivo研究のために心臓を取り出す (Delcayreら, 1992, Amer. J. Physiol. 263: H1537-45のプロトコールに従って行う)。ペントバルビタール (0.3mL) を用いて動物を犠牲にし、静脈内にヘパリン投与 (0.2mL) を行う。まず心臓を15分間平衡化する。次に、拡張終期血圧が8mm Hgとなる体積まで左心室のバルーンを膨張させる。0.02ml増分ずつバルーン体積を膨張させることにより、左心室の圧力-体積曲線を構築する。ゼロ体積は、左心室の拡張終期血圧がゼロになるポイントとして定義する。圧力-体積曲線が完成したら、左心室のバルーンからガスを抜いて拡張終期血圧をもとの8mm Hgに設定し、冠状血流量をチェックした後、対照期間を15分間追跡する。次に、50mL Celsior+分子を用いて心臓を停止させ、圧力60cm H₂O下で4 にて休息させる。次に心臓を取り出し、同溶液で満たしたプラスチック容器の中で4 にて5時間保存し、砕いた氷で囲む。

20

30

【0144】

保存終了後、心臓をランゲンドルフ装置に移す。バルーンカテーテルを左心室の中に再び挿入し、虚血前期間と同じ体積になるまで再び膨らませる。心臓を37 にて少なくとも2時間再灌流する。再灌流圧は、リフロー (re-flow) の15分間は50cm H₂Oに設定した後、次の2時間は100cmH₂Oに戻す。ペーシング (1分間あたり320拍) を再び始める。収縮指数及び拡張期血圧の定容測定は、再灌流の25分、45分、60分及び120分で3重テストを行う。この時間ポイントで、圧力-体積曲線の構築を行い、45mn再灌流中の冠状動脈流出液を回収して、クレアチンキナーゼの漏出を測定する。不対t-検定 (unpaired t-test) を用いてこれら2つの処理グループを比較し、拡張終期血圧データを用いた1次回帰を用いてコンプライアンス曲線を設計する。図2に示すように、エリスロポエチンでの処理後には、発生した左心室圧の大きな改善、ならびに体積-圧力曲線の改善、拡張期の左心室圧の低下及びクレアチンキナーゼ漏出の減少が生じる。

40

【0145】

実施例 3

エリスロポエチンは虚血損傷から心筋を守る

24時間前に組換えヒトエリスロポエチン (5000U/kg体重) を与えた成体雄ラットに麻酔をかけ、冠状動脈閉塞の準備をする。処理開始時に追加用量のエリスロポエチンを与え、左の主冠状動脈を30分間塞いだ後、解放する。処理後一週間、同量のエリスロポエチンを毎日与える。次に動物の心機能について調べる。図3が示すように、擬似注射 (食塩水) を与えた動物は左心室の拡張終期血圧が大きく増加した。これは、心筋梗塞に付随した拡張

50

した硬直心臓を示している。これとは対照的に、擬似手術を行った対照と比較して、エリスロポエチンを与えた動物では、心機能の減分は見られなかった（差は有意であった： $p < 0.01$ レベル）。

【0146】

実施例 4

エリスロポエチン分子

天然エリスロポエチンを修飾して1以上の特定の組織についてのその活性を調整することができる。この所望の組織特異性を達成するために行うことができる幾つかの非限定的戦略としては、グリコシル化された部分（エリスロポエチンは3つのN結合型及び1つのO結合型のグリコシル化された部分を有する）を除去もしくは変更する修飾が挙げられる。グリコシル化エリスロポエチンのこのような変異体は、様々な方法で作製することができる。例えば、糖鎖の端部を締めくくるシアル酸は、そのシアル酸と糖鎖とを結ぶ化学結合の種類に応じた特定のシアリダーゼによって除去することができる。あるいは、グリコシル化構造は、特定の結合を切断する他の酵素を用いることによって種々の方法で解体することができる。これらの原則を確認するために、シアリダーゼA（Prozyme Inc.）を用いてその製造業者のプロトコールに従って組換えヒトエリスロポエチンを脱シアル化した。化学的修飾が成功したかどうか、SDSポリアクリルアミドゲル上で反応生成物を泳動させ、得られたバンドを染色することによって（およそ34kDの未修飾エリスロポエチンに対し、予想通り、化学修飾したエリスロポエチンはおおよそ31kDの見かけ分子量を有していた）、及び化学的手段で残りのシアル酸残基を測定することによって（エリスロポエチンは1モルあたり<0.1モルであった）、確認した。

【0147】

エリスロポエチンのアミノ酸残基を修飾する他の修飾では、Takahashiのプロトコール（1977, J. Biochem. 81:395-402）に従いフェニルグリオキサルを用いて、室温にて0.5~3時間の様々な長さの時間実施することによって、アルギニン残基を修飾した。水に対して反応混合物を透析することにより、反応を終了させた。このようなエリスロポエチンの修飾形態の使用は、本明細書中に全て包含される。

【0148】

アシアロエリスロポエチン及びフェニルグリオキサルエリスロポエチンは、図4~6に示すようにin vitroにおいて神経細胞に対して天然エリスロポエチンと同じ様に効率的であった。血清除去後にアポトーシスを経験した神経様胚性癌細胞（P19）を用いて、in vitroテストを行った。血清除去の24時間前に、1~1000ng/mlのエリスロポエチン又は修飾エリスロポエチンを培養物に加えた。翌日培地を除去し、細胞を新しい非血清含有培地で洗浄し、テスト物質を含む培地（血清なし）を培養物にもう一度加えてさらに48時間培養した。生存細胞の数を測定するために、テトラゾリウム還元アッセイを行った（CellTiter 96; Promega, Inc.）。図4~5が示すように、アシアロエリスロポエチンは、細胞死の予防においてエリスロポエチン自体と同等の効力を有するようである。上記の神経様P19細胞アッセイを用いて、フェニルグリオキサル修飾型エリスロポエチンをテストした。図6が示すように、この化学修飾エリスロポエチンはその神経保護的作用を完全に保持している。

【0149】

ラット局所虚血モデル（中大脳動脈の領域内の可逆的病変を、過去に記載されたように行う（Brinesら, 2000, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 97:10526-31））を用いて、in vivoでの神経保護作用の保持について確かめた。動脈閉塞の発症時に成体雄Sprague-Dawleyラットにアシアロエリスロポエチン又はエリスロポエチン（5000U/kg BW、腹腔内）又はビヒクルを投与した。24時間後、動物を犠牲にし、これらの脳を取り出して調べた。連続切片を作製し、テトラゾリウム塩で染色して、脳の生きている領域を同定した。図7に示すように、1時間の虚血から神経を保護するのに、アシアロエリスロポエチンは天然エリスロポエチンと同じくらい効果的であった。図8は、他の局所虚血モデル（エリスロポエチン及びアシアロエリスロポエチンを用いて比較用量応答テストを行う）の結果を表す。

最低用量250U/kgにおいて、アシアロエリスロポエチンは保護機能を発揮したが、未修飾エリスロポエチンは保護機能を持たなかった。

【0150】

実施例 5

エリスロポエチンの一次構造の修飾及び神経保護の有効性

赤血球のエリスロポエチン受容体に結合せず従って *in vivo* 又は *in vitro* において赤血球新生をサポートしない多くの突然変異型エリスロポエチン分子が記載されている。にもかかわらず、これらの分子の幾つかは、他の組織又は器官の中でエリスロポエチン自体の機能に似た機能を発揮する。例えば天然エリスロポエチンの31～47位のアミノ酸配列を含む17量体は、*in vitro* において赤血球新生に対しては不活性であるが、神経細胞に対しては完全に活性である (Campana & O'Brien, 1998; *Int. J. Mol. Med.* 1:235-41)。

【0151】

本明細書中に記載される使用に望ましいエリスロポエチン誘導体は、本明細書中の上記他の手法の中でも、アルギニン残基又はカルボキシル基のグアニジン化、アミジン化、トリニトロフェニル化、アセチル化、サクシニル化、ニトロ化、又は修飾によって、特定の器官及び組織に対するそれらの活性を維持し且つ他の器官や組織 (赤血球等) に対する活性を持たないエリスロポエチンを作製することにより作製することができる。エリスロポエチンを上記反応にかけたところ、全般的に、得られる分子は *in vivo* 及び *in vitro* のいずれであっても赤血球産生作用を持たないことが分かった (例えば Satake ら; 1990, *Biochem. Biophys. Acta* 1038:125-9)。修飾型エリスロポエチンの幾つかの調製例を以下に記載する。

【0152】

エリスロポエチンの遊離アミノ基のピオチン化: 0.2mgのD-ピオチノイル-L-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (Boehringer Mannheim #1418165) を100ul DMSOに溶解した。この溶液を、エリスロポエチン約0.2mgを含む400μlのPBSと一緒に、箔を被せた試験管に入れた。室温にて4時間インキュベートを行った後、Centricon 10カラムでゲル濾過を行って、未反応のピオチンを分離した。図10に示されるように、このピオチン化エリスロポエチンは、血清除去からp19細胞を守る。

【0153】

"Biotinylated recombinant human erythropoietins: Bioactivity and Utility as a receptor ligand", by Wojchowski ら, *Blood*, 1989, 74(3): 952-8において、著者等は、3つの異なるエリスロポエチンのピオチン化方法を使用している。(1) シアル酸成分、(2) カルボキシラート基、(3) アミノ基に、ピオチンを付加する。著者等は、マウス脾臓細胞増殖アッセイを用いて、(1) シアル酸性分にピオチンを付加しても、エリスロポエチンの生物学的活性は不活化されないこと、(2) カルボキシラート基にピオチンを付加すると、エリスロポエチンが実質的に生物学的に不活化されること、(3) アミノ基にピオチンを付加すると、エリスロポエチンが完全に生物学的に不活化されることを示している。これらの方法及び修飾は、本明細書中に全て包含される。図9は、血清欠乏P19アッセイにおける、ピオチン化されたエリスロポエチン及びアシアロエリスロポエチンの活性を示す。

【0154】

エリスロポエチンのヨウ素化: 方法1-ヨードビーズ。1mCi遊離Na¹²⁵Iを含む100ul PBS (20mMリン酸ナトリウム、0.15M NaCl, pH7.5) 中で、1つのヨードビーズ (Pierce, Rockford, IL) を5分間インキュベートした。次に100ul PBS中の100ugエリスロポエチンを混合物に加えた。室温にて10分間インキュベートを行った後、反応容器から200ul溶液を除去する (ヨードビーズは残しておく) ことにより、反応を停止した。Centricon 10カラムでのゲル濾過により、過剰なヨウ素を除去した。図11に示すように、このように作製したヨード-エリスロポエチンは、血清除去からP19細胞を守るのに効果的である。

【0155】

方法2: クロラミンT。100ul PBS中の100ugエリスロポエチンを500uCi Na¹²⁵Iに加え、エ

ッペンドルフ試験管の中で混合した。次に、25ulのクロラミンT (2mg/ml) を加え、混合物を室温にて1時間インキュベートした。次に、50ulのクロラミンT停止バッファー (PBS中の2.4mg/mlメタ重亜硫酸ナトリウム、10mg/mlチロシン、10%グリセロール、0.1%キシレン) を加えた。次に、Centricon10カラムでのゲル濾過により、ヨードチロシン及びヨウ素化エリスロポエチンを分離した。

【0156】

リシン修飾：カルバミル化：シアン酸カリウムを用いてPlappら ("Activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease A with modified amino groups" 1971, J. Biol. Chem. 246, 939-845) に記載されるようにエリスロポエチン (100ug) を修飾した。

【0157】

トリニトロフェニル化：2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸塩を用いて、Plappら ("Activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease A with modified amino groups" 1971, J. Biol. Chem. 246, 939-845) に記載されるようにエリスロポエチン (100ug) を修飾した。

【0158】

アセチル化：同量の無水酢酸を含む0.3Mリン酸バッファー (pH7.2) 中でエリスロポエチン (100ug) を0 にて1時間インキュベートした。蒸留水に対する透析により、反応を停止した。

【0159】

サクシニル化：0.5M NaHCO₃ (pH8.0) 中のエリスロポエチン (100ug) を、15モル過剰の無水コハク酸と一緒に15 にて1時間インキュベートした。蒸留水に対する透析により、反応を停止した。

【0160】

アルギニン修飾：Riordan ("Functional arginyl residues in carboxypeptidase A. Modification with butanedione" Riordan JF, Biochemistry 1973, 12(20): 3915-3923) に記載されるように、2,3ブタンジオンを用いてエリスロポエチンを修飾した。

【0161】

Patthyら ("Identification of functional arginine residues in ribonuclease A and lysozyme", Patthy, L, Smith EL, J. Biol. Chem. 1975 250(2): 565-9) に記載されるように、シクロヘキサノンを用いてエリスロポエチンを修飾した。

【0162】

Werberら ("Proceedings: Carboxypeptidase B: modification of functional arginyl residues" Werber, MM, Sokolovsky M Isr J. Med Sci 1975 11(11): 1169-70) に記載されるように、フェニルグリオキサールを用いてエリスロポエチンを修飾した。

【0163】

チロシン修飾：Nestlerら "Stimulation of rat ovarian cell steroidogenesis by high density lipoproteins modified with tetranitromethane" Nestler JE, Chacko GK, Strauss JF 3rd. J. Biol Chem 1985 Jun 25;260(12): 7316-21において以前記載されたように、エリスロポエチン (100ug) をテトラニトロメタンと一緒にインキュベートした。

【0164】

グルタミン酸 (及びアスパラギン酸) 修飾：カルボキシル基を修飾するために、Carrawayら "Carboxyl group modification in chymotrypsin and chymotrypsinogen." Carraway K L, Spoerl P, Koshland DE Jr J Mol Biol 1969 May 28;42(1):133-7に記載されるように、1Mグリシンアミド (pH4.5) 中の0.02M EDCと一緒にエリスロポエチン (100ug) を室温にて60分間インキュベートした。

【0165】

トリプトファン残基修飾：Aliら, J. Biol. Chem. 1995 Mar 3;270(9): 4570-4に記載されるように、20mMリン酸カリウムバッファー (pH6.5) 中の20uM n-ブロモスクシンイミドと一緒にエリスロポエチン (100ug) を室温にてインキュベートした。Korotchkina (Korotchkina, LGら, Protein Expr Purif. 1995 Feb;6(1):79-90) に記載された方法によって

10

20

30

40

50

、酸化されたトリプトファン残基の数を測定した。

【0166】

アミノ基の除去：エリスロポエチン（100ug）のアミノ基を除去するために、20mMニンヒドリン（Pierce Chemical, Rockford, IL）を含むPBS（pH7.4）中で37℃にて2時間、Kokkiniら（Kokkini, G.ら, "Modification of hemoglobin by ninhydrin" Blood, Vol. 556, No. 4 1980: 701-705）に記載されるように、インキュベートした。得られたアルデヒドの還元を、この生成物を水素化ホウ素ナトリウム又は水素化アルミニウムリチウムと反応させることによって行った。具体的には、エリスロポエチン（100ug）をPBS中の0.1M水素化ホウ素ナトリウムと一緒に室温にて30分間インキュベートした。還元は、サンプルを氷上にて10分間冷やし、これをPBSに対して一晩3回透析することによって終了した（Kokkini, G., Blood, Vol. 556, No 4 1980: 701-705）。水素化アルミニウムリチウムを用いた還元は、エリスロポエチン（100ug）をPBS中の0.1M水素化アルミニウムリチウムと一緒に室温にて30分間インキュベートすることによって行った。還元は、サンプルを氷上にて10分間冷やし、これをPBSに対して一晩3回透析することによって終了した。

10

【0167】

ジスルフィドによる還元及び安定化：エリスロポエチン（100ug）を500mM DTTと共に60℃にて15分間インキュベートした。次に、20mMヨードアセトアミド水を混合物に加え、暗所で室温にて25分間インキュベートした。

【0168】

限定的蛋白分解：エリスロポエチンを、特定の残基を標的とする限定的な化学的蛋白分解にかけることができる。エリスロポエチンを、トリプトファン残基を特異的に切断する2-(2-ニトロフェニルスルフェニル)-3-メチル-3'-プロモインドレニン（bromoindolenine）と50倍過剰量の50%酢酸の中で暗所で室温にて48時間、窒素圧力下でキャップした試験管の中で反応させた。トリプトファンでクエンチして脱塩することにより、反応を停止した。

20

【0169】

実施例 6

エリスロポエチンの末梢投与による網膜虚血の保護

網膜細胞は、虚血ストレスの30分後にはその多くが死滅してしまうほど虚血に対して非常に敏感である。さらに、亜急性もしくは慢性の虚血は、糖尿病、緑内障、及び黄斑変性等の多くの一般的なヒト疾患を伴う視力の悪化の原因である。現時点では、虚血から細胞を保護する効果的な治療法はない。血液と網膜との間には、大部分の巨大分子を排除する密着内皮バリアが存在する。末梢投与されたエリスロポエチンが、虚血に対して敏感な細胞を守るか否かをテストするために、Rosenbaumら（1997; Vis. Res. 37:3443-51）により記載されるように、急性可逆的緑内障ラットモデルを使用した。具体的には、成体雄ラットの前眼房に食塩水を注射して、全身動脈血圧を超える圧力にし、60分間維持した。動物に、食塩水又は体重kgあたり5000Uのエリスロポエチンを腹腔内投与した24時間後に、虚血を誘導し、さらに3日間毎日投与を続けた。処理後1週間で、暗順応ラットに対して網膜電図記録を行った。図11～12は、食塩水のみで処理した動物（パネルC）（機能は僅かしか残っていなかった）とは対照的に、エリスロポエチンの投与が網膜電図（ERG）の良好な保持（パネルD）に関係があることを示している。図11は、エリスロポエチンで処理したグループと食塩水で処理したグループとで、網膜電図a波及びb波の振幅を比較するものであり、エリスロポエチンにより有意な保護が付与されたことを示す。

30

40

【0170】

実施例 7

脳損傷から生じる認知機能の低下に及ぼすエリスロポエチンの回復作用

脳に外傷を受けたマウスにおける低下した認知機能を回復させるエリスロポエチンの能力を示す研究において、Brinesら（PNAS 2000, 97; 10295-10672）に記載されるように、雌Balb/cマウスに、脳に鈍傷を負わせ、5日後に、毎日1日あたり5000U/kg-bwのエリスロポエチンの腹腔内投与を開始した。損傷を負わせた12日後に、モーリス水迷路（Morris wat

50

er maze)の中で認知機能について動物をテストした。一日あたり4回試行を行った。処理動物及び未処理動物はいずれもこのテストにおける行動が良くなかった(遊泳時間はおそらく90秒間のうち約80秒間)。図13は、エリスロポエチンで処理した動物の行動の方が良かったことを示している(このプレゼンテーションでは、負の値の方が良い)。外傷後30日までエリスロポエチン処理の開始を遅らせても(図14)、認知機能の回復が見られる。

【0171】

実施例8

カイニン酸モデル

カイニン酸神経毒性モデルにおいて、Brinesら, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 2000, 97; 10295-10672のプロトコルに従って、5000U/kg-bwの用量でアシアロエリスロポエチンを腹腔内投与した24時間後に、25mg/kgカイニン酸を投与したところ、(時間)対(死亡率)により示されるように(図15)、エリスロポエチンと同じくらい効果的であることが分かる。

【0172】

本発明は、記載された特定の実施形態によってその範囲が限定されるものではなく、これらの実施形態は、本発明の個々の態様を1つずつ例示するものであり、機能的に同等な方法及びコンポーネントは本発明の範囲に含まれる。実際に、これまでの説明及び添付の図面から、本明細書中に示し記載されたものに加え、本発明の種々の改変物が当業者には自明となろう。このような改変物は、本発明の特許請求の範囲内に含まれるものとする。

【0173】

本明細書中で引用された全ての文献は、あらゆる目的のためにその全てが本明細書中に参考として組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0174】

【図1】図1は、非経口投与されたエリスロポエチンの脳脊髄液中へのトランスロケーションを表す。

【図2】図2は、一時的な血管閉塞の後の虚血ダメージからのエリスロポエチンによる心筋層の保護を表す。

【図3】図3は、エリスロポエチンによる移植用に用意された心臓の機能維持を表す。

【図4】図4は、血清欠乏P19細胞の生存力に対するエリスロポエチン及びアシアロエリスロポエチンのin-vitro効力を比較した図である。

【図5】図5は、血清欠乏P19細胞の生存力に対するエリスロポエチン及びアシアロエリスロポエチンのin-vitro効力を比較する他の実験を表す。

【図6】図6は、血清欠乏P19細胞の生存力に対するエリスロポエチン及びフェニルグリオキサールにより修飾されたエリスロポエチンのin-vitro効力を比較した図である。

【図7】図7は、ラット局所脳虚血モデルにおけるエリスロポエチン及びアシアロエリスロポエチンの保護を表す。

【図8】図8は、虚血卒中のモデルにおける中大脳動脈閉塞におけるヒトエリスロポエチン及びヒトアシアロエリスロポエチンの効力を比較する用量応答曲線を表す。

【図9】図9は、P19アッセイにおけるピオチン化エリスロポエチン及びアシアロエリスロポエチンの効力を表す。

【図10】図10は、P19アッセイにおけるヨウ化エリスロポエチンの活性を表す。

【図11】図11は、ラット緑内障モデルにおけるエリスロポエチン治療の効力を表す。

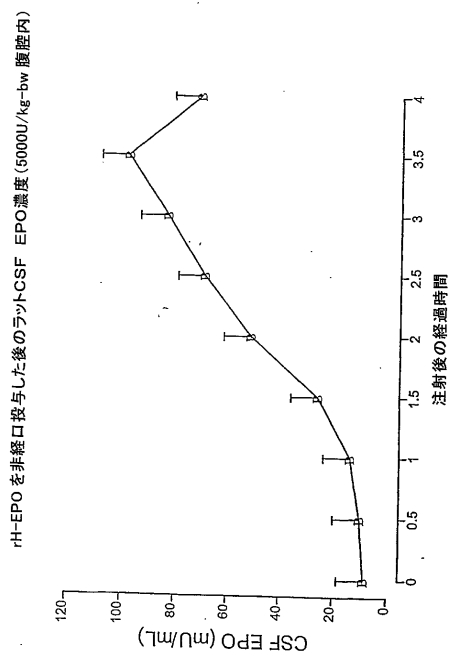
【図12】図12は、ラット緑内障モデルにおけるエリスロポエチンによる網膜機能の保存程度を表す。

【図13】図13は、外傷を負った5日後にエリスロポエチンの投与を開始することによる、脳の外傷後の認知機能の回復を表す。

【図14】図14は、外傷を負った30日後にエリスロポエチンの投与を開始することによる、脳の外傷後の認知機能の回復を表す。

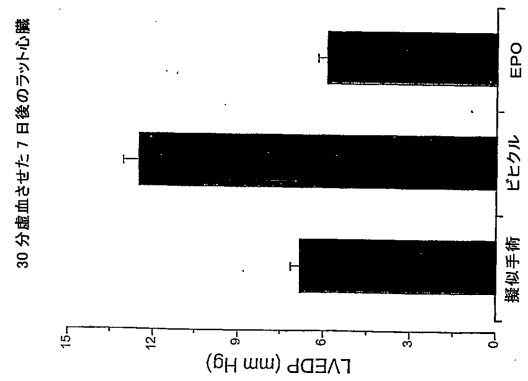
【図15】図15は、大脳毒性のカイニン酸モデルにおけるヒトアシアロエリスロポエチンの効力を表す。

【図1】

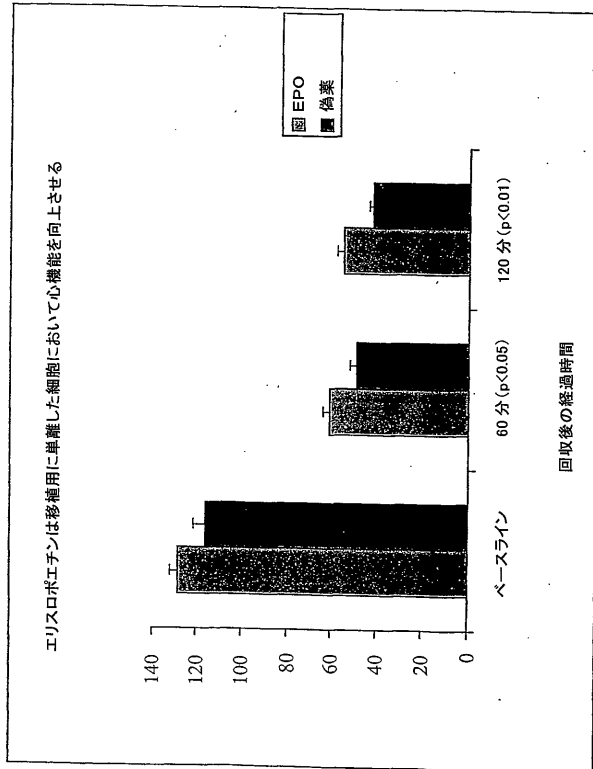


2.5 時間以降は $p < 0.01$ (ベースラインと比較)

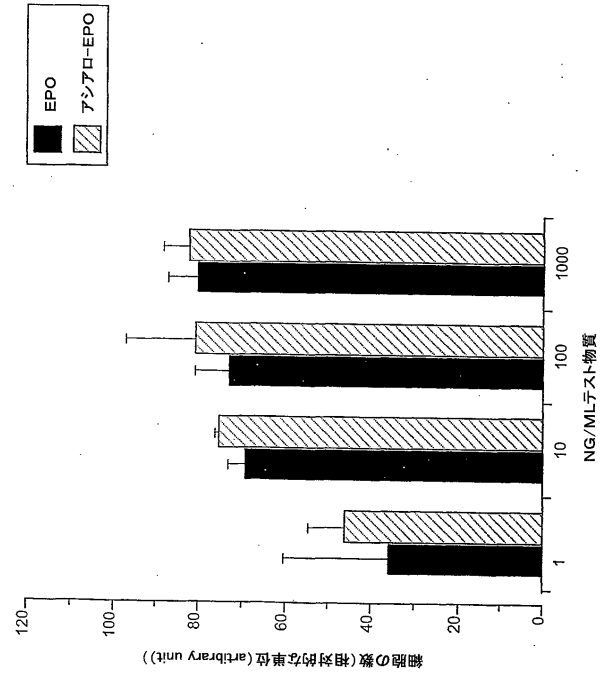
【図2】



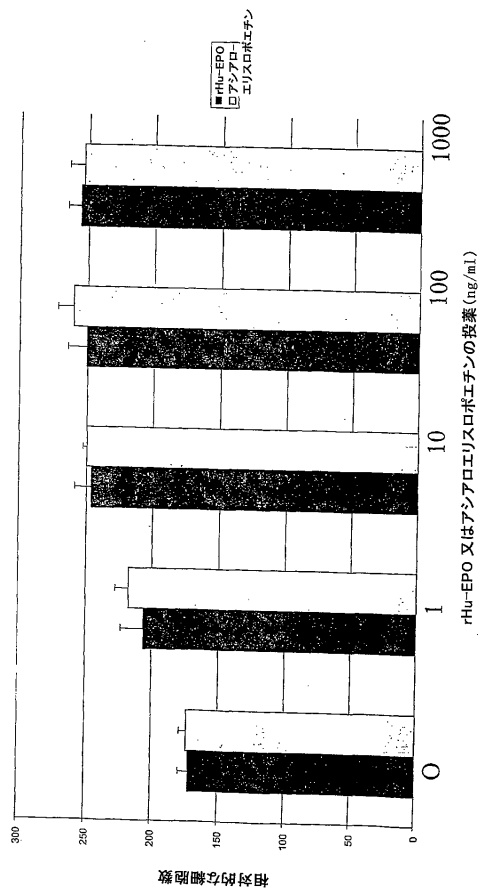
【図 3】



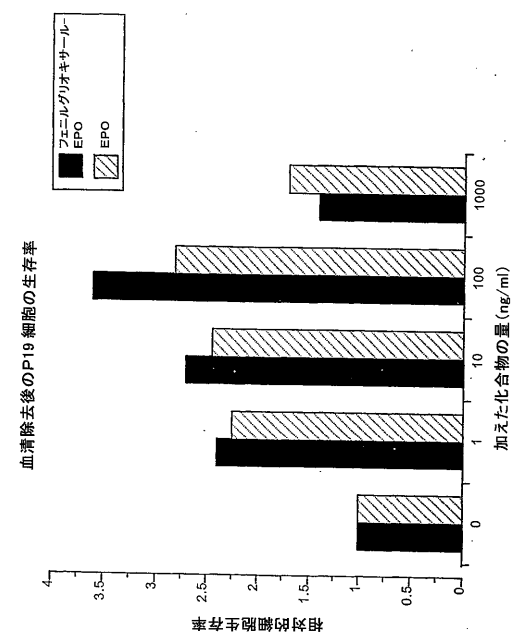
【図 4】



【図 5】

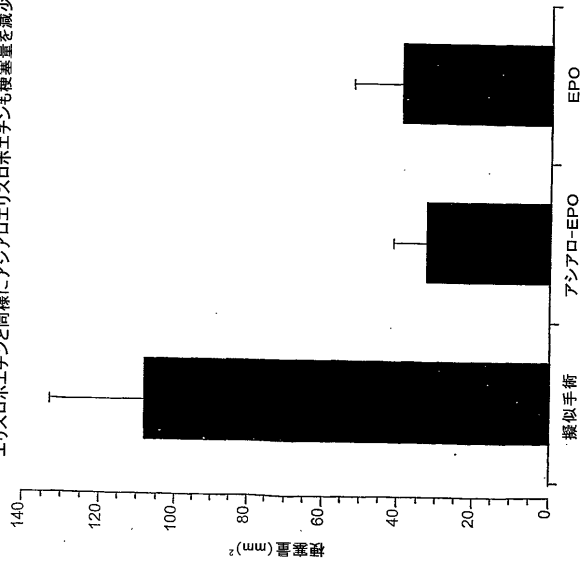


【図 6】



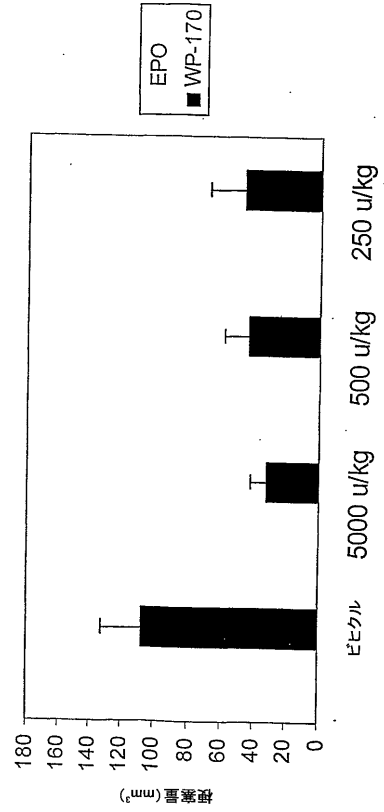
【図 7】

エリスロポエチンと同様にアシアロエリスロポエチンも腫瘍を減少させる



【図 8】

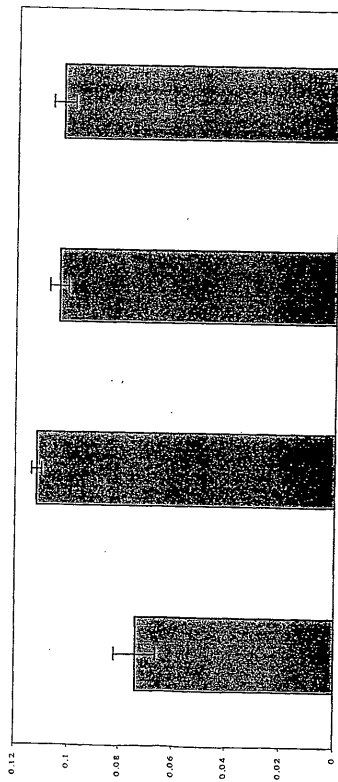
アシアロエリスロポエチン(用量応答)



各グループについて n は 4 以上である

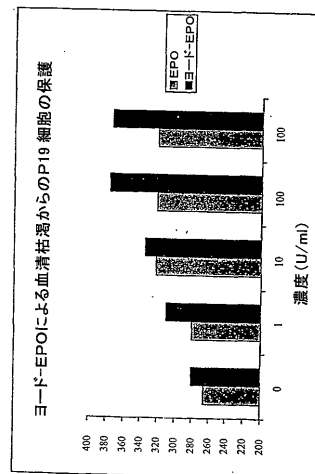
【図 9】

ビオチン化-EPO及びアシアロ-EPOは、P19 アッセイにおいて活性を保つ



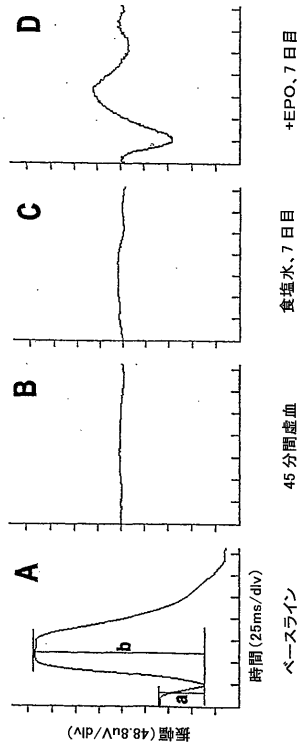
【図 10】

ヨード-EPOによる血清枯渇からのP19細胞の保護



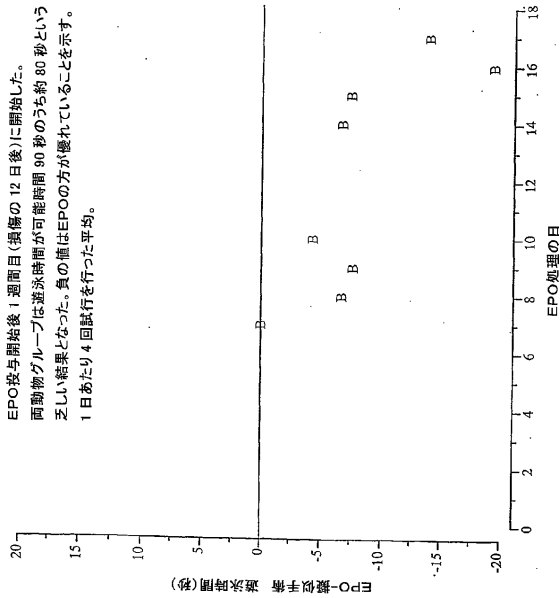
【図 1 1】

60 分間虚血させたラットの網膜電図



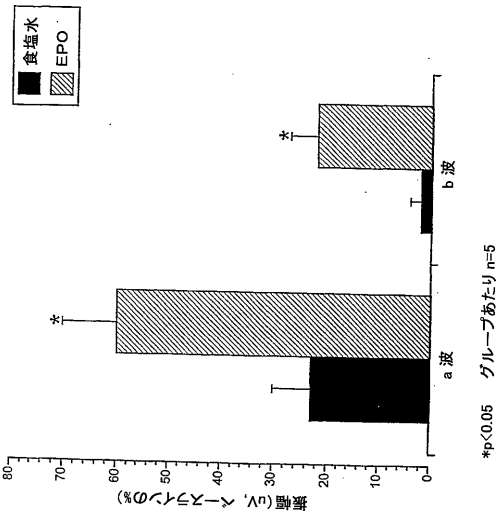
【図 1 3】

モリス水迷路: 雄 Balb/c マウス $n=16$ 。脳の損傷を負い、損傷後 5 日目に EPOx を開始した。最初の水迷路テストは EPO 投与開始後 1 週間目 (損傷の 12 日後) に開始した。両動物グループは水迷路時間が可能時間 90 秒のうち約 80 秒という乏しい結果となった。負の値は EPO の方が優れていることを示す。1 日あたり 4 回試行を行った平均。



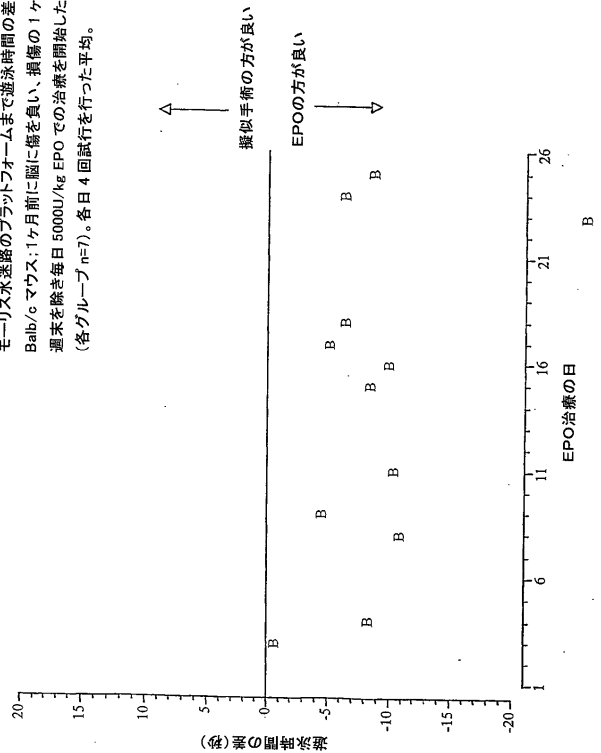
【図 1 2】

60 分間虚血させた後の網膜電図の振幅

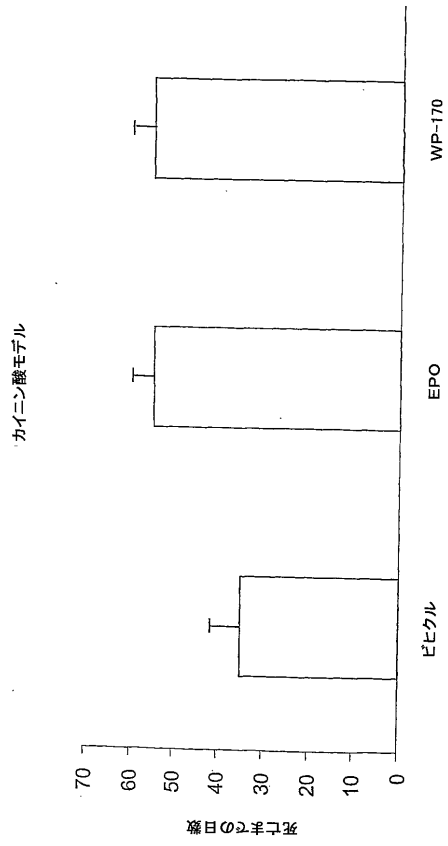


【図 1 4】

モリス水迷路のプラットフォームまで游泳時間の差。
Balb/c マウス: 1 ヶ月前に脳に傷を負い、損傷の 1 ヶ月後に週末を除き毎日 5000U/kg EPO での治療を開始した (各グループ $n=7$)。各日 4 回試行を行った平均。



【図 15】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
11 July 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/053580 A2

(51) International Patent Classification: C07K

(74) Agents: CORUZZI, Laura, A. et al.; Pennie & Edmonds
LLP, 1155 Avenue of the Americas, New York, NY 10036
(US).

(21) International Application Number: PCT/US01/49479

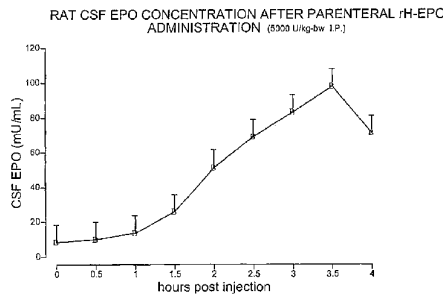
(22) International Filing Date:
28 December 2001 (28.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/753,132 29 December 2000 (29.12.2000) US
60/259,245 29 December 2000 (29.12.2000) US(71) Applicant: THE KENNETH S. WARREN INSTI-
TUTE, INC. [US/US]; 712 Kitchawan Road, Ossining,
NY 10562 (US).(72) Inventors: BRINES, Michael; 1 Wepawang Road, Wood-
bridge, CT 06525 (US); CERAMI, Anthony; 170 Mercer
Street, New York, NY 10012 (US); CERAMI, Carla; 121
Farrington Avenue, Sleepy Hollow, NY 10591 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, NG, SN, TD, TG).Published:
without international search report and to be republished
upon receipt of that report

[Continued on next page]

(54) Title: PROTECTION, RESTORATION, AND ENHANCEMENT OF ERYTHROPOIETIN-RESPONSIVE CELLS, TISSUES
AND ORGANS2.5 hrs and longer $p < 0.01$ compared to baseline(57) Abstract: Methods and compositions are provided for protecting or enhancing an erythropoietin-responsive cell, tissue, organ
or body part function or viability in vivo, in situ or ex vivo in mammals, including human beings, by systemic or local administration
of an erythropoietin receptor activity modulator, such as an erythropoietin or a modified erythropoietin.

WO 02/053580 A2

WO 02/053580 A2

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

**PROTECTION, RESTORATION, AND ENHANCEMENT OF ERYTHROPOIETIN-
RESPONSIVE CELLS, TISSUES AND ORGANS**

Priority of provisional application no.60/259,245 filed on December 29, 2000, which is incorporated herein by reference in its entirety, is claimed under 35 U.S.C. § 119(e)(1).

BACKGROUND OF THE INVENTION

For many years, the only clear physiological role of erythropoietin had been its control of the production of red blood cells. Recently, several lines of evidence suggest that erythropoietin, as a member of the cytokine superfamily, performs other important physiologic functions which are mediated through interaction with the erythropoietin receptor (erythropoietin-R). These actions include mitogenesis, modulation of calcium influx into smooth muscle cells and neural cells, and effects on intermediary metabolism. It is believed that erythropoietin provides compensatory responses that serve to improve hypoxic cellular microenvironment as well as modulate programmed cell death caused by metabolic stress. Although studies have established that erythropoietin injected intracranially protects neurons against hypoxic neuronal injury, intracranial administration is an impractical and unacceptable route of administration for therapeutic use, particularly for normal individuals. Furthermore, previous studies of anemic patients given erythropoietin have concluded that peripherally-administered erythropoietin is not transported into the brain (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.).

Various modified forms of erythropoietin have been described with activities directed towards improving the erythropoietic activity of the molecule, such as those with altered amino acids at

WO 02/053580

PCT/US01/49479

the carboxy terminus described in U.S. Patent 5,457,089 and in U.S. Patent 4,835,260; erythropoietin isoforms with various numbers of sialic acid residues per molecule, such as described in U.S. Patent 5,856,292; polypeptides described in U.S. Patent 4,703,008; agonists described in U.S. Patent 5,767,078; peptides which bind to the erythropoietin receptor as described in U.S. Patents 5,773,569 and 5,830,851; and small-molecule mimetics as described in U.S. Patent 5,835,382.

It is towards the use of an erythropoietin for protecting, maintaining, enhancing, or restoring erythropoietin-responsive cells and associated cells, tissues and organs *in situ* as well as *ex vivo*, and to delivery of an erythropoietin across an endothelial cell barrier for the purpose of protecting and enhancing erythropoietin-responsive cells and associated cells, tissues and organs distal to the vasculature, or to carry associated molecules, that the present invention is directed.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

In one aspect, the present invention is directed to the use of erythropoietins for the preparation of pharmaceutical compositions for protecting, maintaining, enhancing, or restoring the function or viability of erythropoietin-responsive mammalian cells and their associated cells, tissues and organs. In one particular aspect, the erythropoietin-responsive mammalian cells and their associated cells, tissue or organ are distal to the vasculature by virtue of a tight endothelial cell barrier. In another particular aspect, the cells, tissues, organs or other bodily parts are isolated from a mammalian body, such as those intended for transplant. By way of non-limiting examples, the erythropoietin-responsive cell or tissue may be neuronal, retinal, muscle, heart, lung, liver, kidney, small intestine, adrenal cortex, adrenal medulla, capillary endothelial, testes,

WO 02/053580

PCT/US01/49479

ovary, pancreas or endometrial cells or tissue. These examples of erythropoietin-responsive cells are merely illustrative. In one aspect, the erythropoietin-responsive cell or its associated cells, tissues, or organs are not excitable cells, tissues, or organs, or do not predominantly comprise excitable cells or tissues. In a particular embodiment, the mammalian cell, tissue or organ for which an aforementioned erythropoietin derivative is used are those that have expended or will expend a period of time under at least one condition adverse to the viability of the cell, tissue or organ. Such conditions include traumatic *in-situ* hypoxia or metabolic dysfunction, surgically-induced *in-situ* hypoxia or metabolic dysfunction, or *in-situ* toxin exposure, the latter may be associated with chemotherapy or radiation therapy. In one embodiment, the adverse conditions are a result of cardio-pulmonary bypass (heart-lung machine), as is used for certain surgical procedures.

The erythropoietins are useful for the therapeutic or prophylactic treatment of human diseases of the CNS or peripheral nervous system which have primarily neurological or psychiatric symptoms, as well as ophthalmic diseases, cardiovascular diseases, cardiopulmonary diseases, respiratory diseases, kidney, urinary and reproductive diseases, gastrointestinal diseases and endocrine and metabolic abnormalities.

The invention is also directed to pharmaceutical compositions comprising particular erythropoietin derivatives for administration to a mammalian animal, preferably a human. Such pharmaceutical compositions may be formulated for oral, intranasal, or parenteral administration, or in the form of a perfusate solution for maintaining the viability of cells, tissues or organs *ex vivo*.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

Erythropoietin derivatives useful for the aforementioned purposes may be any native erythropoietin, or an erythropoietin analog, an erythropoietin mimetic, and erythropoietin fragment, a hybrid erythropoietin molecule, an erythropoietin-receptor-binding molecule, an erythropoietin agonist, a renal erythropoietin, a brain erythropoietin, an oligomer thereof, a multimer thereof, a mutein thereof, a congener thereof, a naturally-occurring form thereof, a synthetic form thereof, a recombinant form thereof, a glycosylation variant thereof, a deglycosylated variant thereof, or a combination thereof. Any form of erythropoietin capable of benefitting erythropoietin-responsive cells is embraced in this aspect of the invention.

Other erythropoietin derivatives useful for the aforementioned purposes and pharmaceutical compositions include both native erythropoietins as well as erythropoietins that have been altered by at least one modification as compared to native erythropoietin, and preferably as compared to native human erythropoietin. The at least one modification may be a modification of at least one amino acid of the erythropoietin molecule, or a modification of at least one carbohydrate of the erythropoietin molecule. Of course, erythropoietin molecules useful for the purposes herein may have a plurality of modifications compared to the native molecule, such as multiple modifications of the amino acid portion of the molecule, multiple modifications of the carbohydrate portion of the molecule, or at least one modification of the amino acid portion of the molecule and at least one modification of the carbohydrate portion of the molecule. The modified erythropoietin molecule retains its ability of protecting, maintaining, enhancing or restoring the function or viability of erythropoietin-responsive mammalian cells, yet other properties of the erythropoietin molecule unrelated to the aforementioned, desirable feature may

WO 02/053580

PCT/US01/49479

be absent as compared to the native molecule. In a preferred embodiment, the erythropoietin derivative is non-erythropoietic.

In one embodiment, the erythropoietin of the invention has at least no sialic acid moieties. In a preferred embodiment, the modified erythropoietin is asialoerythropoietin, and most preferably, human asialoerythropoietin. In another embodiment, the modified erythropoietin has 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, or 13 sialic acid moieties.

In a second embodiment, the modified erythropoietin has at least no N-linked or no O-linked carbohydrates.

In a third embodiment, the modified erythropoietin has at least a reduced carbohydrate content by virtue of treatment of erythropoietin with its native carbohydrates with at least one glycosidase.

In a fourth embodiment, the carbohydrate portion of the modified erythropoietin molecule has at least a non-mammalian glycosylation pattern by virtue of the expression of a recombinant erythropoietin in non-mammalian cells. In preferred embodiments, the modified erythropoietins are expressed in insect cells or plant cells.

In a fifth embodiment, the modified erythropoietin has at least one or more oxidized carbohydrates which also may be chemically reduced. In a preferred embodiment, the modified erythropoietin is periodate-oxidized erythropoietin; in another preferred embodiment, the

WO 02/053580

PCT/US01/49479

periodate-oxidized erythropoietin is chemically reduced with a borohydride salt such as sodium borohydride or sodium cyanoborohydride.

In a sixth embodiment, the modified erythropoietin for the aforementioned uses has at least one or more modified arginine residues. In one embodiment, the modified erythropoietin comprises a glyoxal moiety on the one or more arginine residues, such as an arylglyoxal or alkylglyoxal moiety. In another embodiment, at least one arginine residue is modified by reaction with a vicinal diketone such as but not limited to 2,3-butanedione or cyclohexanedione.

In a seventh embodiment, the modified erythropoietin comprises at least one or more modified lysine residues or a modification of the N-terminal amino group of the erythropoietin molecule, such modifications as those resulting from reaction of the lysine residue or N-terminal amino group with an amino-group-modifying agent. The modified lysine residue further may be chemically reduced. In one preferred embodiment, an erythropoietin is biotinylated or carbamylated via one or more lysine groups. In another preferred embodiment, the lysine is reacted with an aldehyde or reducing sugar to form an imine, which may be stabilized by reduction as with sodium cyanoborohydride to form an N-alkylated lysine such as glucitolyl lysine, or which in the case of reducing sugars may be stabilized by Amadori or Heyns rearrangement to form an alpha-deoxy alpha-amino sugar such as alpha-deoxy-alpha-fructosyllysine. In another preferred embodiment, the lysine group is carbamylated (carbamoylated), such as by virtue of reaction with cyanate ion, alkyl-carbamylated, aryl-carbamylated, or aryl-thiocarbamylated with an alkyl-isocyanate, aryl-isocyanate, or aryl-isothiocyanate, respectively, or it may be acylated by a reactive alkylcarboxylic or

WO 02/053580

PCT/US01/49479

arylcarboxylic acid derivative, such as by reaction with acetic anhydride, succinic anhydride or phthalic anhydride. At least one lysine group may also be trinitrophenyl modified by reaction with a trinitrobenzenesulfonic acid, or preferably its salts. In another embodiment, lysine residues may be modified by reaction with a glyoxal derivative, such as reaction with glyoxal, methylglyoxal or 3-deoxyglucosone to form the corresponding alpha-carboxyalkyl derivatives.

In an eighth embodiment, at least one tyrosine residue of erythropoietin may be modified in an aromatic ring position by an electrophilic reagent, such as by nitration or iodination.

In a ninth embodiment, at least an aspartic acid or a glutamic acid residue of an erythropoietin may be modified, such as by reaction with a carbodiimide followed by reaction with an amine such as but not limited to glycineamide.

In a tenth embodiment, at least a tryptophan residue of an erythropoietin is modified, such as by reaction with n-bromosuccinimide or n-chlorosuccinimide.

In an eleventh embodiment, a modified erythropoietin molecule is provided having at least one erythropoietin amino group removed, such as by reaction with ninhydrin followed by reduction of the resulting carbonyl group by reaction with borohydride.

In a twelfth embodiment, a modified erythropoietin is provided having at least an opening of at least one of the cystine linkages in the erythropoietin molecule by reaction with a reducing agent

WO 02/053580

PCT/US01/49479

such as dithiothreitol, followed by reaction of the subsequent sulfhydryls with iodoacetamide, iodoacetic acid or another electrophile to prevent reformation of the disulfide linkages.

In a thirteenth embodiment, a modified erythropoietin is provided having at least one substitution of any one of a number of amino acids, such as a leucine, with at least one of lysine, arginine, tryptophan, tyrosine, or cysteine residues of erythropoietin, using molecular biological techniques.

In a fourteenth embodiment, a modified erythropoietin is subjected to a limited chemical proteolysis that targets specific residues, for example, to cleave after tryptophan residues. Such resulting erythropoietin fragments are embraced herein.

As noted above, an erythropoietin useful for the purposes herein may have at least one of the aforementioned modifications, but may have more than one of the above modifications. By way of example of a modified erythropoietin with one modification to the carbohydrate portion of the molecule and one modification to the amino acid portion, a modified erythropoietin is asialoerythropoietin and has its lysine residues biotinylated or carbamylated. The present invention also embraces compositions, including pharmaceutical compositions, comprising one or more of the aforementioned erythropoietins.

In another aspect of the invention, a method is provided for the protecting, maintaining, enhancing or restoring the function or viability of erythropoietin-responsive mammalian cells and their associated cells, tissues and organs, by administering an effective amount of any one or

WO 02/053580

PCT/US01/49479

more of the aforementioned erythropoietins. In one particular aspect of the method, the erythropoietin-responsive mammalian cells and their associated cells, tissue or organ are distal to the vasculature by virtue of a tight endothelial cell barrier. In another particular aspect, the cells, tissues, organs or other bodily parts are isolated from a mammalian body, such as those intended for transplant. By way of non-limiting examples, the erythropoietin-responsive cell or tissue may be neuronal, retinal, muscle, heart, lung, liver, kidney, small intestine, adrenal cortex, adrenal medulla, capillary endothelial, testes, ovary, or endometrial cells or tissue. These examples of erythropoietin-responsive cells are merely illustrative. In a particular embodiment, the erythropoietin-responsive cell or its associated cells, tissues, or organs are not excitable cells, tissues, or organs, or do not predominantly comprise excitable cells or tissues. In another particular embodiment, the mammalian cell, tissue or organ for which an aforementioned erythropoietin derivative may be administered are those that have expended or will expend a period of time under at least one condition adverse to the viability of the cell, tissue or organ. Such conditions may include traumatic *in-situ* hypoxia or metabolic dysfunction, surgically-induced *in-situ* hypoxia or metabolic dysfunction, or *in-situ* toxin exposure, the latter may be associated with chemotherapy or radiation therapy. In one embodiment, the invention protects against the adverse conditions resulting from cardio-pulmonary bypass.

In another aspect of the invention, any of the foregoing erythropoietins as well as any other erythropoietin molecules including native human erythropoietin can be used in the preparation of a pharmaceutical composition for *ex-vivo* treatment of cells, tissues and organs for the purpose of protecting, maintaining, enhancing, or restoring the function or viability of erythropoietin-responsive mammalian cells and their associated cells, tissues and organs. Such *ex-vivo*

WO 02/053580

PCT/US01/49479

treatment is useful, for example, for the preservation of cells, tissues or organs for transplant, whether autotransplant or xenotransplant. The cells, tissue or organ may be bathed in a solution comprising erythropoietin, or the perfusate instilled into the organ through the vasculature or other means, to maintain cellular functioning during the period wherein the cells, tissue or organ is not integrated with the vasculature of the donor or recipient. Administration of the perfusate may be made to a donor prior to organ harvesting, as well as to the harvested organ and to the recipient. Moreover, the aforementioned use of any erythropoietin is useful whenever a cell, tissue or organ is isolated from the vasculature of the individual and thus essentially existing *ex vivo* for a period of time, the term isolated referring to restricting or clamping the vasculature of or to the cell, tissue, organ or bodily part, such as may be performed during surgery, including, in particular, cardio-pulmonary bypass surgery; bypassing the vasculature of the cell, tissue, organ or bodily part; removing the cell, tissue, organ or bodily part from the mammalian body, such as may be done in advance of xenotransplantation or prior to and during autotransplantation; or traumatic amputation of a cell, tissue, organ or bodily part. Thus, this aspect of the invention pertains both to the perfusion with an erythropoietin *in situ* and *ex vivo*. *Ex vivo*, the erythropoietin may be provided in a cell, tissue or organ preservation solution. For either aspect, the exposing may be by way of continuous perfusion, pulsatile perfusion, infusion, bathing, injection, or catheterization.

In yet a further aspect, the invention is directed to a method for protecting, maintaining, enhancing, or restoring the viability of a mammalian cell, tissue, organ or bodily part which includes an erythropoietin-responsive cell or tissue, in which the cell, tissue, organ or bodily part is isolated from the mammalian body. The method includes at least exposing the isolated

WO 02/053580

PCT/US01/49479

mammalian cell, tissue, organ or bodily part to an amount of an erythropoietin for a duration which is effective to protect, maintain, enhance, or restore the aforesaid viability. In non-limiting examples, isolated refers to restricting or clamping the vasculature of or to the cell, tissue, organ or bodily part, such as may be performed during surgery, in particular, cardio-pulmonary bypass surgery; bypassing the vasculature of the cell, tissue, organ or bodily part; removing the cell, tissue, organ or bodily part from the mammalian body, such may be done in advance of xenotransplantation or prior to and during autotransplantation; or traumatic amputation of a cell, tissue, organ or bodily part. Thus, this aspect of the invention pertains both to the perfusion with an erythropoietin *in situ* and *ex vivo*. *Ex vivo*, the erythropoietin may be provided in a cell, tissue or organ preservation solution. For either aspect, the exposing may be by way of continuous perfusion, pulsatile perfusion, infusion, bathing, injection, or catheterization.

In the aforementioned isolation or *ex-vivo* embodiment, a useful erythropoietin may be any of the aforementioned erythropoietins, including any native erythropoietin, or an erythropoietin analog, an erythropoietin mimetic, and erythropoietin fragment, a hybrid erythropoietin molecule, an erythropoietin-receptor-binding molecule, an erythropoietin agonist, a renal erythropoietin, a brain erythropoietin, an oligomer thereof, a multimer thereof, a mutein thereof, a congener thereof, a naturally-occurring form thereof, a synthetic form thereof, a recombinant form thereof, a glycosylation variant thereof, a deglycosylated variant thereof, or a combination thereof. Any form of erythropoietin capable of benefitting erythropoietin-responsive cells is embraced in this aspect of the invention. Other erythropoietins include, but are not limited to asialoerythropoietin, N-deglycosylated erythropoietin, O-deglycosylated erythropoietin, erythropoietin with reduced carbohydrate content, erythropoietin with altered glycosylation patterns, erythropoietin with

WO 02/053580

PCT/US01/49479

carbohydrates oxidized then reduced, arylglyoxal-modified erythropoietin, alkylglyoxal-modified erythropoietin, 2,3-butanedione-modified erythropoietin, cyclohexanedione-modified erythropoietin, biotinylated erythropoietin, N-alkylated-lysyl-erythropoietin, glucitolyl lysine erythropoietin, alpha-deoxy-alpha-fructosyllysine-erythropoietin, carbamylated erythropoietin, acetylated erythropoietin, succinylated erythropoietin, alpha-carboxyalkyl erythropoietin, nitrated erythropoietin, iodinated erythropoietin, to name some representative yet non-limiting examples based on the teachings herein. A human erythropoietin is preferred; native human erythropoietin is most preferred. In another embodiment human asialoerythropoietin is preferred. In another embodiment human phenylglyoxal erythropoietin is preferred.

By way of non-limiting examples, the aforementioned *ex-vivo* erythropoietin-responsive cell or tissue may be or comprise neuronal, retinal, muscle, heart, lung, liver, kidney, small intestine, adrenal cortex, adrenal medulla, capillary endothelial, testes, ovary, or endometrial cells or tissue. These examples of erythropoietin-responsive cells are merely illustrative.

All of the foregoing methods and uses are preferably applicable to human beings, but are useful as well for any mammal, such as but not limited to companion animals, domesticated animals, livestock and zoo animals. Routes of administration of the aforementioned pharmaceutical compositions include oral, intravenous, intranasal, topical, intraluminal, inhalation or parenteral administration, the latter including intravenous, intraarterial, subcutaneous, intramuscular, intraperitoneal, submucosal or intradermal. For *ex-vivo* use, a perfusate or bath solution is preferred. This includes pervusing an isolated portion of the vasculature *in situ*.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

In yet another aspect of the invention, any of the aforementioned erythropoietins are useful in preparing a pharmaceutical composition for restoring a dysfunctional cell, tissue or organ when administered after the onset of the disease or condition responsible for the dysfunction. By way of non-limiting example, administration of a pharmaceutical composition comprising erythropoietin restores cognitive function in animals previously having brain trauma, even when administered long after (*e.g.*, three days, five days, a week, a month, or longer) the trauma has subsided. Erythropoietins useful for such applications include any of the particular aforementioned erythropoietins or any native erythropoietin, or an erythropoietin analog, an erythropoietin mimetic, and erythropoietin fragment, a hybrid erythropoietin molecule, an erythropoietin-receptor-binding molecule, an erythropoietin agonist, a renal erythropoietin, a brain erythropoietin, an oligomer thereof, a multimer thereof, a mutein thereof, a congener thereof, a naturally-occurring form thereof, a synthetic form thereof, a recombinant form thereof, a glycosylation variant thereof, a deglycosylated variant thereof, or a combination thereof. Any form of erythropoietin capable of benefitting erythropoietin-responsive cells is embraced in this aspect of the invention. Other erythropoietin derivatives useful for the aforementioned purposes and pharmaceutical compositions include both native erythropoietins as well as erythropoietins that have been altered by at least one modification as compared to native erythropoietin, and preferably as compared to native human erythropoietin. The at least one modification may be a modification of at least one amino acid of the erythropoietin molecule, or a modification of at least one carbohydrate of the erythropoietin molecule. Of course, erythropoietin molecules useful for the purposes herein may have a plurality of modifications compared to the native molecule, such as multiple modifications of the amino acid portion of the molecule, multiple modifications of the carbohydrate portion of the molecule, or at least one modification of the

WO 02/053580

PCT/US01/49479

amino acid portion of the molecule and at least one modification of the carbohydrate portion of the molecule. The modified erythropoietin molecule retains its ability of protecting, maintaining, enhancing or restoring the function or viability of erythropoietin-responsive mammalian cells, yet other properties of the erythropoietin molecule unrelated to the aforementioned, desirable feature may be absent as compared to the native molecule. A human erythropoietin is preferred; native human erythropoietin is most preferred. In another embodiment human asialoerythropoietin is preferred.

In yet another embodiment, the invention provides methods for the use of the aforementioned erythropoietin for restoring a dysfunctional cell, tissue or organ when administered after the onset of the disease or condition responsible for the dysfunction. By way of non-limiting example, methods for administration of a pharmaceutical composition comprising erythropoietin restores cognitive function in animals previously having brain trauma, even when administered long after (*e.g.*, three days, five days, a week, a month, or longer) the trauma has subsided. Erythropoietins useful for such methods include any of the particular aforementioned erythropoietins or any native erythropoietin, or an erythropoietin analog, an erythropoietin mimetic, and erythropoietin fragment, a hybrid erythropoietin molecule, an erythropoietin-receptor-binding molecule, an erythropoietin agonist, a renal erythropoietin, a brain erythropoietin, an oligomer thereof, a multimer thereof, a mutein thereof, a congener thereof, a naturally-occurring form thereof, a synthetic form thereof, a recombinant form thereof, a glycosylation variant thereof, a deglycosylated variant thereof, or a combination thereof. Any form of erythropoietin capable of benefitting erythropoietin-responsive cells is embraced in this aspect of the invention. Other erythropoietin derivatives useful for the aforementioned purposes

WO 02/053580

PCT/US01/49479

and pharmaceutical compositions include both native erythropoietins as well as erythropoietins that have been altered by at least one modification as compared to native erythropoietin, and preferably as compared to native human erythropoietin. The at least one modification may be a modification of at least one amino acid of the erythropoietin molecule, or a modification of at least one carbohydrate of the erythropoietin molecule. Of course, erythropoietin molecules useful for the purposes herein may have a plurality of modifications compared to the native molecule, such as multiple modifications of the amino acid portion of the molecule, multiple modifications of the carbohydrate portion of the molecule, or at least one modification of the amino acid portion of the molecule and at least one modification of the carbohydrate portion of the molecule. The modified erythropoietin molecule retains its ability of protecting, maintaining, enhancing or restoring the function or viability of erythropoietin-responsive mammalian cells, yet other properties of the erythropoietin molecule unrelated to the aforementioned, desirable feature may be absent as compared to the native molecule. A human erythropoietin is preferred; native human erythropoietin is most preferred. In another embodiment human asialoerythropoietin is preferred.

In still yet a further aspect of the present invention, methods are provided for facilitating the transcytosis of a molecule across an endothelial cell barrier in a mammal by administration a composition of a molecule in association with an erythropoietin such as: an erythropoietin having at least no sialic acid moieties; an erythropoietin having at least no N-linked or no O-linked carbohydrates; an erythropoietin having at least a reduced carbohydrate content by virtue of treatment of native erythropoietin with at least one glycosidase; an erythropoietin with a carbohydrate portion of the erythropoietin molecule having at least a non-mammalian

WO 02/053580

PCT/US01/49479

glycosylation pattern by virtue of the expression of a recombinant erythropoietin in non-mammalian cells; an erythropoietin has at least one or more oxidized carbohydrates which also may be chemically reduced; an erythropoietin having at least one or more modified arginine residues; an erythropoietin having at least one or more modified lysine residues or a modification of the N-terminal amino group of the erythropoietin molecule; an erythropoietin having at least a modified tyrosine residue; an erythropoietin having at least a modified aspartic acid or a glutamic acid residue; an erythropoietin having at least a modified tryptophan residue; an erythropoietin having at least one amino group removed; an erythropoietin having at least an opening of at least one of the cystine linkages in the erythropoietin molecule; an erythropoietin is provided having at least one substitution of at least one amino acid; or a truncated erythropoietin.

The association between the molecule to be transported and the erythropoietin may be, for example, a labile covalent bond, a stable covalent bond, or a noncovalent association with a binding site for the molecule. Endothelial cell barriers may be the blood-brain barrier, the blood-eye barrier, the blood-testes barrier, the blood-ovary barrier and the blood-placenta barrier. Suitable molecule for transport by the method of the present invention include hormones, such as growth hormone, antibiotics and anti-cancer agents.

It is a further aspect of the present invention to provide a composition for facilitating the transecytosis of a molecule across an endothelial cell barrier in a mammal, said composition comprising said molecule in association with an erythropoietin such as an erythropoietin having at least no sialic acid moieties; an erythropoietin having at least no N-linked or no O-linked carbohydrates; an erythropoietin having at least a reduced carbohydrate content by virtue of

WO 02/053580

PCT/US01/49479

treatment of native erythropoietin with at least one glycosidase; an erythropoietin with a carbohydrate portion of the modified erythropoietin molecule having at least a non-mammalian glycosylation pattern by virtue of the expression of a recombinant erythropoietin in non-mammalian cells; an erythropoietin has at least one or more oxidized carbohydrates which also may be chemically reduced; an erythropoietin having at least one or more modified arginine residues; an erythropoietin having at least one or more modified lysine residues or a modification of the N-terminal amino group of the erythropoietin molecule; an erythropoietin having at least a modified tyrosine residue; an erythropoietin having at least a modified aspartic acid or a glutamic acid residue; an erythropoietin having at least a modified tryptophan residue; an erythropoietin having at least one amino group removed; an erythropoietin having at least an opening of at least one of the cystine linkages in the erythropoietin molecule; an erythropoietin is provided having at least one substitution of at least one amino acid; or a truncated erythropoietin.

The association may be, for example, a labile covalent bond, a stable covalent bond, or a noncovalent association with a binding site for the molecule. Endothelial cell barriers may be the blood-brain barrier, the blood-eye barrier, the blood-testes barrier, the blood-ovary barrier and the blood-placenta barrier. Suitable molecule for transport by the method of the present invention include hormones, such as growth hormone, antibiotics and anti-cancer agents.

In a still further aspect of the present invention, any of the aforementioned erythropoietins are useful in preparing a pharmaceutical composition for facilitating the transcytosis of a molecule across an endothelial cell barrier in a mammal, said composition comprising said molecule in association with an erythropoietin such as an erythropoietin having at least no sialic acid

WO 02/053580

PCT/US01/49479

moieties; an erythropoietin having at least no N-linked or no O-linked carbohydrates; an erythropoietin having at least a reduced carbohydrate content by virtue of treatment of native erythropoietin with at least one glycosidase; an erythropoietin with a carbohydrate portion of the modified erythropoietin molecule having at least a non-mammalian glycosylation pattern by virtue of the expression of a recombinant erythropoietin in non-mammalian cells; an erythropoietin has at least one or more oxidized carbohydrates which also may be chemically reduced; an erythropoietin having at least one or more modified arginine residues; an erythropoietin having at least one or more modified lysine residues or a modification of the N-terminal amino group of the erythropoietin molecule; an erythropoietin having at least a modified tyrosine residue; an erythropoietin having at least a modified aspartic acid or a glutamic acid residue; an erythropoietin having at least a modified tryptophan residue; an erythropoietin having at least one amino group removed; an erythropoietin having at least an opening of at least one of the cystine linkages in the erythropoietin molecule; an erythropoietin is provided having at least one substitution of at least one amino acid; or a truncated erythropoietin.

The association may be, for example, a labile covalent bond, a stable covalent bond, or a noncovalent association with a binding site for the molecule. Endothelial cell barriers may be the blood-brain barrier, the blood-eye barrier, the blood-testes barrier, the blood-ovary barrier and the blood-placenta barrier. Suitable molecule for transport by the method of the present invention include hormones, such as growth hormone, antibiotics and anti-cancer agents.

These and other aspects of the present invention will be better appreciated by reference to the following Figures and Detailed Description.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 depicts the translocation of parenterally-administered erythropoietin into the cerebrospinal fluid.

Figure 2 shows the protection of the myocardium from ischemic damage by erythropoietin after temporary vascular occlusion.

Figure 3 shows the maintenance of the function of a heart prepared for transplantation by erythropoietin.

Figure 4 compares the *in-vitro* efficacy of erythropoietin and asialoerythropoietin on the viability of serum-starved P19 cells.

Figure 5 is another experiment which compares the *in-vitro* efficacy of erythropoietin and asialoerythropoietin on the viability of serum-starved P19 cells.

Figure 6 compares the *in-vitro* efficacy of erythropoietin and phenylglyoxal-modified erythropoietin on the viability of serum-starved P19 cells.

Figure 7 shows protection of erythropoietin and asialoerythropoietin in a rat focal cerebral ischemia model.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

Figure 8 shows a dose response comparing the efficacy of human erythropoietin and human asialoerythropoietin in middle cerebral artery occlusion in a model of ischemic stroke

Figure 9 shows the effect of biotinylated erythropoietin and asialoerythropoietin in the P19 assay.

Figure 10 shows the activity of iodinated erythropoietin in the P19 assay.

Figure 11 depicts the effects of erythropoietin treatment in a rat glaucoma model.

Figure 12 shows the extent of preservation of retinal function by erythropoietin in the rat glaucoma model.

Figure 13 depicts the restoration of cognitive function following brain trauma by administration of erythropoietin starting five days after trauma.

Figure 14 depicts the restoration of cognitive function following brain trauma by administration of erythropoietin starting 30 days after trauma.

Figure 15 depicts the efficacy of human asialoerythropoietin in a kainate model of cerebral toxicity.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

"Erythropoietin-responsive cell" refers to a mammalian cell whose function or viability may be maintained, promoted, enhanced, regenerated, or in any other way benefitted, by exposure to an erythropoietin. Non-limiting examples of such cells include neuronal, retinal, muscle, heart, lung, liver, kidney, small intestine, adrenal cortex, adrenal medulla, capillary endothelial, testes, ovary, and endometrial cells. Moreover, such erythropoietin-responsive cells and the benefits provided thereto by an erythropoietin may be extended to provide protection or enhancement indirectly to other cells that are not directly erythropoietin responsive, or of tissues or organs which contain such non-erythropoietin-responsive cells. These other cells, or tissues or organs which benefit indirectly from the enhancement of erythropoietin-responsive cells present as part of the cells, tissue or organ as "associated" cells, tissues and organs. Thus, benefits of an erythropoietin as described herein may be provided as a result of the presence of a small number or proportion of erythropoietin-responsive cells in a tissue or organ, for example, excitable or neuronal tissue present in such tissue, or the Leydig cells of the testis, which makes testosterone. In one aspect, the erythropoietin-responsive cell or its associated cells, tissues, or organs are not excitable cells, tissues, or organs, or do not predominantly comprise excitable cells or tissues.

The methods of the invention provide for the local or systemic protection or enhancement of cells, tissues and organs within a mammalian body, under a wide variety of normal and adverse conditions, or protection of those which are destined for relocation to another mammalian body. In addition, restoration or regeneration of dysfunction is also provided. As mentioned above, the ability of an erythropoietin to cross a tight endothelial cell barrier and exert its positive effects on

WO 02/053580

PCT/US01/49479

erythropoietin-responsive cells (as well as other types of cells) distal to the vasculature offers the potential to prevent as well as treat a wide variety of conditions and diseases which otherwise cause significant cellular and tissue damage in an animal, including human, and moreover, permit success of heretofore unattemptable surgical procedures for which risk traditionally outweighed the benefits. The duration and degree of purposeful adverse conditions induced for ultimate benefit, such as high-dose chemotherapy, radiation therapy, prolonged *ex-vivo* transplant survival, and prolonged periods of surgically-induced ischemia, may be carried out by taking advantage of the invention herein. However, the invention is not so limited, but includes as one aspect, methods or compositions wherein the target erythropoietin-responsive cells are distal to the vasculature by virtue of an endothelial-cell barrier or endothelial tight junctions. In general, the invention is directed to any erythropoietin-responsive cells and associated cells, tissues and organs which may benefit from exposure to an erythropoietin. Furthermore, cellular, tissue or organ dysfunction may be restored or regenerated after an acute adverse event (such as trauma) by exposure to an erythropoietin.

The invention is therefore directed generally to the use of erythropoietins for the preparation of pharmaceutical compositions for the aforementioned purposes in which cellular function is maintained, promoted, enhanced, regenerated, or in any other way benefitted. The invention is also directed to methods for maintaining, enhancing, promoting, or regenerating cellular function by administering to a mammal an effective amount of an erythropoietin as described herein. The invention is further directed to methods for maintaining, promoting, enhancing, or regenerating cellular function *ex vivo* by exposing cells, a tissue or organ to an erythropoietin. The invention

WO 02/053580

PCT/US01/49479

is also directed to a perfusate composition comprising an erythropoietin for use in organ or tissue preservation.

The various methods of the invention utilize a pharmaceutical composition which at least includes an erythropoietin at an effective amount for the particular route and duration of exposure to exert positive effects or benefits on erythropoietin-responsive cells within or removed from a mammalian body. Where the target cell, tissues or organs of the intended therapy require the erythropoietin to cross an endothelial cell barrier, the pharmaceutical composition includes the erythropoietin at a concentration which is capable, after crossing the endothelial cell barrier, of exerting its desirable effects upon the erythropoietin-responsive cells. Molecules capable of interacting with the erythropoietin receptor and modulating the activity of the receptor, herein referred to as erythropoietin or erythropoietin receptor activity modulators, are useful in the context of the present invention. These molecules may be, for example, naturally-occurring, synthetic, or recombinant forms of erythropoietin molecules, as described above, or other molecules which may not necessarily resemble erythropoietin in any manner, except to modulate erythropoietin responsive cell activity, as described herein.

Erythropoietin is a glycoprotein hormone which in humans has a molecular weight of about 34 kDa. The mature protein comprises 165 amino acids, and the glycosyl residues comprise about 40% of the weight of the molecule. The forms of erythropoietin useful in the practice of the present invention encompass naturally-occurring, synthetic and recombinant forms of the following human and other mammalian erythropoietin-related molecules: erythropoietin, asialoerythropoietin, deglycosylated erythropoietin, erythropoietin analogs, erythropoietin

WO 02/053580

PCT/US01/49479

mimetics, erythropoietin fragments, hybrid erythropoietin molecules, erythropoietin receptor-binding molecules, erythropoietin agonists, renal erythropoietin, brain erythropoietin, oligomers and multimers thereof, muteins thereof, and congeners thereof. In addition, erythropoietin forms useful in the practice of the present invention include proteins that represent functionally equivalent gene products. Such an equivalent erythropoietin gene product include mutant erythropoietins, which may contain deletions, including internal deletions, additions, including additions yielding fusion proteins, or conservative substitutions of amino acid residues within and/or adjacent to the amino acid sequence, but that result in a "silent" change, in that the change produces a functionally equivalent erythropoietin. Such amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues involved. For example, nonpolar (hydrophobic) amino acids include alanine, leucine, isoleucine, valine, proline, phenylalanine, tryptophan, and methionine; polar neutral amino acids include glycine, serine, threonine, cysteine, tyrosine, asparagine, and glutamine; positively charged (basic) amino acids include arginine, lysine, and histidine; and negatively charged (acidic) amino acids include aspartic acid and glutamic acid. Alternatively, non-conservative amino acid changes, and larger insertions and deletions may be used to create functionally altered erythropoietin mutants. Such mutants can be used to alter erythropoietin properties in desirable ways. For example, in one embodiment, an erythropoietin useful for the practice of the invention can be a mutant erythropoietin altered in one or more amino acids within the four functional domains of erythropoietin which affect receptor binding: VLQRY and/or TKVNFYAW and/or SGLRSLTTL and/or SNFLRG. In another embodiment, erythropoietins containing mutations in the surrounding areas of the molecule which affect the kinetics or receptor-binding properties of the molecule can be used.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

The term "erythropoietin" as well as "an erythropoietin" may be used interchangeably or conjunctively, and the various analogs, fragments, hybrid molecules, agonists, muteins, and other forms as described above embrace the variants in the extents of and sites of glycosylation of erythropoietin, including native, deglycosylated, asialylated, and other partially glycosylated forms of erythropoietin. Non-limiting examples of such variants are described in Tsuda et al., 1990, *Eur. J. Biochem.* **188**:405-411, incorporated herein by reference. Bacteria, yeast, insect, plant, mammalian, including human. In addition, a variety of host systems may be used for expression and production of recombinant erythropoietin, including, but not limited to, bacteria, yeast, insect, plant, and mammalian, including human, cell systems. For example, recombinant erythropoietin produced in bacteria, which do not glycosylate or sialate the product, could be used to produce non-glycosylated forms of erythropoietin. Alternatively, recombinant erythropoietin can produced in other systems that do glycosylate, *e.g.*, plants, including human cells.

As noted above, the invention herein embraces any and all erythropoietin receptor activity modulator molecules capable of exerting positive activity on erythropoietin-responsive cells, regardless of any structural relationship of the molecule with erythropoietin.

In addition, erythropoietin itself may be modified to tailor its activities for a specific tissue or tissues. Several non-limiting strategies which may be carried out to achieve this desired tissue specificity include modifications that shorten circulating half-life and thus reducing the time erythropoietin can interact with erythroid precursors, or modification of the primary structure of

WO 02/053580

PCT/US01/49479

the erythropoietin molecule. One approach to reducing circulating half life is to remove or modify the glycosylation moieties, of which erythropoietin has three N-linked and one O-linked. Such variants of glycosylated erythropoietin can be produced in a number of ways. For example, the sialic acids which terminate the end of the sugar chains can be removed by specific sialidases depending on the chemical linkage connecting the sialic acid to the sugar chain. Alternatively, the glycosylated structure can be dismantled in different ways by using other enzymes that cleave at specific linkages. Techniques to modify the primary structure are myriad and include substitution of specific amino acids, chemical modification of amino acids, or addition of other structures which interfere with the interaction of erythropoietin with any of its receptors. Use of such forms of erythropoietin are fully embraced herein. In a preferred embodiment, the half-life of the non-erythropoietic erythropoietin of the invention is reduced by about 90% from that of native erythropoietin.

Some of these molecules will nevertheless mimic the actions of erythropoietin itself in other tissues or organs. For example, a 17-mer containing the amino-acid sequence of 31-47 of native erythropoietin is inactive for erythropoiesis but fully active for neural cells *in vitro* (Campana & O'Brien, 1998: Int. J. Mol. Med. 1:235-41).

Furthermore, derivative erythropoietin molecules desirable for the uses described herein may be generated by guanidination, amidination, carbamylation (carbamoylation), trinitrophenylation, acetylation, succinylation, nitration, or modification of arginine, lysine, tyrosine, tryptophan, or cysteine residues or carboxyl groups, among other procedures, such as limited proteolysis, removal of amino groups, and/or mutational substitution of arginine, lysine, tyrosine, tryptophan,

WO 02/053580

PCT/US01/49479

or cysteine residues by molecular biological techniques to produce erythropoietins which maintain an adequate level of activities for specific organs and tissues but not for others, such as erythrocytes (e.g., Satake et al; 1990, *Biochim. Biophys. Acta* **1038**:125-9; incorporated herein by reference in its entirety). One non-limiting example as described hereinbelow is the modification of erythropoietin arginine residues by reaction with a glyoxal such as phenylglyoxal (according to the protocol of Takahashi, 1977, *J. Biochem.* **81**:395-402). As will be seen below, such an erythropoietin molecule fully retains its neurotrophic effect. Such erythropoietin molecules are fully embraced for the various uses and compositions described herein.

Synthetic and recombinant molecules, such as brain erythropoietin and renal erythropoietin, recombinant mammalian forms of erythropoietin, as well as its naturally-occurring, tumor-derived, and recombinant isoforms, such as recombinantly-expressed molecules and those prepared by homologous recombination are provided herein. Furthermore, the present invention includes molecules including peptides which bind the erythropoietin receptor, as well as recombinant constructs or other molecules which possess part or all of the structural and/or biological properties of erythropoietin, including fragments and multimers of erythropoietin or its fragments. Erythropoietin herein embraces molecules with altered erythropoietin receptor binding activities, preferably with increased receptor affinity, in particular as pertains to enhancing transport across endothelial cell barriers. Muteins comprising molecules which have additional or reduced numbers of glycosylation sites are included herein. As noted above, the terms "erythropoietin" and "mimetics" as well as the other terms are used interchangeably herein to refer to the erythropoietin-responsive cell protective and enhancing molecules related to erythropoietin as well as the molecules which are capable of crossing endothelial cell barriers.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

Furthermore, molecules produced by transgenic animals are also encompassed here. It should be noted that erythropoietin molecules as embraced herein do not necessarily resemble erythropoietin structurally or in any other manner, except for ability to interact with the erythropoietin receptor or modulate erythropoietin receptor activity or activate erythropoietin-activated signaling cascades, as described herein.

By way of non-limiting examples, forms of erythropoietin useful for the practice of the present invention include erythropoietin muteins, such as those with altered amino acids at the carboxy terminus described in U.S. Patent 5,457,089 and in U.S. Patent 4,835,260; asialoerythropoietin and erythropoietin isoforms with various numbers of sialic acid residues per molecule, such as described in U.S. Patent 5,856,298; polypeptides described in U.S. Patent 4,703,008; agonists described in U.S. Patent 5,767,078; peptides which bind to the erythropoietin receptor as described in U.S. Patents 5,773,569 and 5,830,851; small-molecule mimetics which activate the erythropoietin receptor, as described in U.S. Patent 5,835,382; and erythropoietin analogs described in WO 9505465, WO 9718318, and WO 9818926. All of the aforementioned citations are incorporated herein to the extent that such disclosures refer to the various alternate forms or processes for preparing such forms of the erythropoietins of the present invention.

Erythropoietin can be obtained commercially, for example, under the trademarks of PROCRIT, available from Ortho Biotech Inc., Raritan, NJ, and EPOGEN, available from Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

The activity (in units) of erythropoietin (erythropoietin) and erythropoietin-like molecules is traditionally defined based on its effectiveness in stimulating red cell production in rodent models (and as derived by international standards of erythropoietin). One unit (U) of regular erythropoietin (MW of ~34,000) is ~8 ng of protein (1 mg protein is approximately 125,000 U). However, as the effect on erythropoiesis is incidental to the desired activities herein and may not necessarily be a detectable property of certain of the erythropoietins of the invention, the definition of activity based on erythropoietic activity is inappropriate. Thus, as used herein, the activity unit of erythropoietin or erythropoietin-related molecules is defined as the amount of protein required to elicit the same activity in neural or other erythropoietin-responsive cellular systems as is elicited by WHO international standard erythropoietin in the same system. The skilled artisan will readily determine the units of a non-erythropoietic erythropoietin or related molecule following the guidance herein.

Further to the above-mentioned erythropoietin modifications useful herein, the following discussion expands on the various erythropoietins of the invention.

An erythropoietin of the invention may have at least no sialic acid moieties, referred to as asialoerythropoietin. Preferably, an erythropoietin of the invention is human asialoerythropoietin. In alternative embodiments, the erythropoietin of the invention may have at least 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, or 13 sialic acid residues. It may be prepared by desialylating erythropoietin using a sialidase, such as is described in the manufacturer's packaging for Sialydase A from ProZyme Inc., San Leandro, California. Typically, PROZYME® GLYCOPRO® sequencing-grade SIALYDASE A™ (N-acetylneuraminate

WO 02/053580

PCT/US01/49479

glycohydrolase, EC 3.2.1.18) is used to cleave all non-reducing terminal sialic acid residues from complex carbohydrates and glycoproteins such as erythropoietin. It will also cleave branched sialic acids (linked to an internal residue). Sialydase A is isolated from a clone of *Arthrobacter ureafaciens*.

An erythropoietin may have at least a reduced number of N-linked carbohydrates. To remove N-linked carbohydrates, erythropoietin may be treated with hydrazine, in accordance, for example, with the methods described by Hermentin et al., 1996, *Glycobiology* 6(2):217-30. As noted above, erythropoietin has three N-linked carbohydrate moieties; the present invention embraces those erythropoietins with two, one, or no N-linked carbohydrate.

An erythropoietin of the invention may have at least a reduced carbohydrate content by virtue of treatment of native erythropoietin with at least one glycosidase. For example, the procedure of Chen and Evangelista, 1998, *Electrophoresis* 19(15):2639-44, may be followed. Furthermore, removal of the O-linked carbohydrate may be achieved following the methods described in Hokke et al., 1995, *Eur. J. Biochem.* 228(3):981-1008.

The carbohydrate portion of an erythropoietin molecule may have at least a non-mammalian glycosylation pattern by virtue of the expression of a recombinant erythropoietin in non-mammalian cells. Preferably, the erythropoietins are expressed in insect or plant cells. By way of non-limiting example, expression of erythropoietin in insect cells using a baculovirus expression system may be carried out in accordance with Quelle et al., 1989, *Blood* 74(2):652-657. Another method is described in U.S. Patent 5,637,477. Expression in a plant system may be

WO 02/053580

PCT/US01/49479

carried out in accordance with the method of Matsumoto et al., 1993, *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(8):1249-1252. Alternatively, expression in bacteria will result in non-glycosylated forms of erythropoietin. These are merely exemplary of methods useful for the production of an erythropoietin of the invention are in no way limiting.

An erythropoietin of the invention may have at least one or more oxidized carbohydrates that also may be chemically reduced. For example, the erythropoietin may be periodate-oxidized erythropoietin; the periodate-oxidized erythropoietin also may be chemically reduced with a borohydride salt such as sodium borohydride or sodium cyanoborohydride. Periodate oxidation of erythropoietin may be carried out, for example, by the methods described by Linsley et al., 1994, *Anal. Biochem.* 219(2):207-17. Chemical reduction following periodate oxidation may be carried out following the methods of Tonelli and Meints, 1978, *J. Supramol. Struct.* 8(1):67-78.

An erythropoietin for the aforementioned uses may have at least one or more modified arginine residues. For example, the modified erythropoietin may comprise a R-glyoxal moiety on the one or more arginine residues, where R may be an aryl, heteroaryl, lower alkyl, lower alkoxy, or cycloalkyl group, or an alpha-deoxyglycitoyl group. As used herein, the term lower "alkyl" means a straight- or branched-chain saturated aliphatic hydrocarbon group preferably containing 1-6 carbon atoms. Representative of such groups are methyl, ethyl, isopropyl, isobutyl, butyl, pentyl, hexyl and the like. The term "alkoxy" means a lower alkyl group as defined above attached to the remainder of the molecule by oxygen. Examples of alkoxy include methoxy, ethoxy, propoxy, isopropoxy and the like. The term "cycloalkyl" refers to cyclic alkyl groups with three up to about 8 carbons, including for example cyclopropyl, cyclobutyl, cyclohexyl and

WO 02/053580

PCT/US01/49479

the like. The term aryl refers to phenyl and naphthyl groups. The term heteroaryl refers to heterocyclic groups containing 4-10 ring members and 1-3 heteroatoms selected from the group consisting of oxygen, nitrogen and sulfur. Examples include but are not limited to isoxazolyl, phenylisoxazolyl, furyl, pyrimidinyl, quinolyl, tetrahydroquinolyl, pyridyl, imidazolyl, pyrrolidinyl, 1,2,4-triazolyl, thiazolyl, thienyl, and the like. The R group may be substituted, as for example the 2,3,4-trihydroxybutyl group of 3-deoxyglucosone. Typical examples of R-glyoxal compounds are glyoxal, methylglyoxal, 3-deoxyglucosone, and phenylglyoxal. Preferred R-glyoxal compounds are methylglyoxal or phenylglyoxal. An exemplary method for such modification may be found in Werber et al., 1975, *Isr. J. Med. Sci.* 11(11): 1169-70, using phenylglyoxal.

In a further example, at least one arginine residue may be modified by reaction with a vicinal diketone such as 2,3-butanedione or cyclohexanedione, preferably in ca. 50 millimolar borate buffer at pH 8-9. A procedure for the latter modification with 2,3-butanedione may be carried out in accordance with Riordan, 1973, *Biochemistry* 12(20): 3915-3923; and that with cyclohexanone according to Pathy et al., 1975, *J. Biol. Chem* 250(2): 565-9.

An erythropoietin of the invention may comprise at least one or more modified lysine residues or a modification of the N-terminal amino group of the erythropoietin molecule, such modifications as those resulting from reaction of the lysine residue with an amino-group-modifying agent. In another embodiment, lysine residues may be modified by reaction with glyoxal derivatives, such as reaction with glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone to form alpha-carboxyalkyl derivatives. Examples are reaction with glyoxal to form carboxymethyllysine as in Glomb and

WO 02/053580

PCT/US01/49479

Monnier, 1995, J. Biol. Chem. 270(17):10017-26, or with methylglyoxal to form (1-carboxyethyl)lysine as in Degenhardt et al., 1998, Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand) 44(7):1139-45. The modified lysine residue further may be chemically reduced. For example, the erythropoietin may be biotinylated via lysine groups, such as in accordance with the method described in Example 5, in which D-biotinoyl-L-aminocaproic acid-N-hydroxysuccinimide ester was reacted with erythropoietin, followed by removal of unreacted biotin by gel filtration on a Centricon 10 column, as described by Wojchowski and Caslake, 1989, Blood 74(3):952-8. In this paper, the authors use three different methods of biotinylating erythropoietin, any of which may be used for the preparation of the erythropoietins for the uses herein. Biotin may be added to (1) the sialic acid moieties (2) carboxylate groups or (3) amino groups.

In another preferred embodiment, the lysine may be reacted with an aldehyde or reducing sugar to form an imine, which may be stabilized by reduction as with sodium cyanoborohydride to form an N-alkylated lysine such as glucitolyl lysine, or which in the case of reducing sugars may be stabilized by Amadori or Heyns rearrangement to form an alpha-deoxy alpha-amino sugar such as alpha-deoxy-alpha-fructosyllysine. As an example, preparation of a fructosyllysine-modified protein by incubation with 0.5 M glucose in sodium phosphate buffer at pH 7.4 for 60 days is described by Makita et al., 1992, J. Biol. Chem. 267:5133-5138. In another example, the lysine group may be carbamylated, such as by virtue of reaction with cyanate ion, or alkyl- or aryl-carbamylated or -thiocarbamylated with an alkyl- or aryl-isocyanate or -isothiocyanate, or it may be acylated by a reactive alkyl- or arylcarboxylic acid derivative, such as by reaction with acetic anhydride or succinic anhydride or phthalic anhydride. Exemplary are the modification of lysine groups with 4-sulfophenylisothiocyanate or with acetic anhydride, both as described in

WO 02/053580

PCT/US01/49479

Gao et al., 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91(25):12027-30. Lysine groups may also be trinitrophenyl modified by reaction with trinitrobenzenesulfonic acid or preferably its salts. Such methods are described below in Example 5.

At least one tyrosine residue of an erythropoietin may be modified in an aromatic ring position by an electrophilic reagent, such as by nitration or iodination. By way of non-limiting example, erythropoietin may be reacted with tetranitromethane (Nestler et al., 1985, J. Biol. Chem. 260(12):7316-21; or iodinated as described in Example 5.

At least an aspartic acid or a glutamic acid residue of an erythropoietin may be modified, such as by reaction with a carbodiimide followed by reaction with an amine such as but not limited to glycylamide. Examples of such modifications may be found in Example 5.

In another example, a tryptophan residue of an erythropoietin may be modified, such as by reaction with *n*-bromosuccinimide or *n*-chlorosuccinimide, following methods such as described in Josse et al., Chem Biol Interact 1999 May 14;119-120.

In yet another example, an erythropoietin molecule may be prepared by removing at least one amino group, such may be achieved by reaction with ninhydrin followed by reduction of the subsequent carbonyl group by reaction with borohydride.

In still a further example, an erythropoietin is provided that has at least an opening of at least one of the cystine linkages in the erythropoietin molecule by reaction with a reducing agent such as

WO 02/053580

PCT/US01/49479

dithiothreitol, followed by reaction of the subsequent sulfhydryls with iodoacetamide, iodoacetic acid or another electrophile to prevent reformation of the disulfide linkages.

An erythropoietin is provided having at least one substitution of any one of a number of amino acids, such as a leucine, with at least one of lysine, arginine, tryptophan, tyrosine, or cysteine residues of erythropoietin, using molecular biological techniques.

A modified erythropoietin may be prepared by subjecting an erythropoietin to a limited chemical proteolysis that targets specific residues, for example, to cleave after tryptophan residues. Such resulting erythropoietin fragments are embraced herein.

As noted above, an erythropoietin useful for the purposes herein may have at least one of the aforementioned modifications, but may have more than one of the above modifications. By way of example of a modified erythropoietin with one modification to the carbohydrate portion of the molecule and one modification to the amino acid portion, a modified erythropoietin may be asialoerythropoietin and have its lysine residues biotinylated or carbamylated.

Thus, various erythropoietin molecules and pharmaceutical compositions containing them for the uses described herein are embraced. Such erythropoietin molecules include but are not limited to asialoerythropoietin, N-deglycosylated erythropoietin, O-deglycosylated erythropoietin, erythropoietin with reduced carbohydrate content, erythropoietin with altered glycosylation patterns, erythropoietin with carbohydrates oxidized then reduced, arylglyoxal-modified erythropoietin, alkylglyoxal-modified erythropoietin, 2,3-butanedione-modified

WO 02/053580

PCT/US01/49479

erythropoietin, cyclohexanedione-modified erythropoietin, biotinylated erythropoietin, N-alkylated-lysyl-erythropoietin, glucitolyl lysine erythropoietin, alpha-deoxy-alpha-fructosyllysine-erythropoietin, carbamylated erythropoietin, acetylated erythropoietin, succinylated erythropoietin, alpha-carboxyalkyl erythropoietin, nitrated erythropoietin, iodinated erythropoietin, to name some representative yet non-limiting examples based on the teachings herein. Preferred are the aforementioned modified forms based on human erythropoietin.

Moreover, certain of the aforementioned erythropoietins are new, and the invention is directed to such compounds as well as pharmaceutical compositions comprising them. By way of non-limiting example, such new erythropoietins include periodate-oxidized erythropoietin, glucitolyl lysine erythropoietin, fructosyl lysine erythropoietin, 3-deoxyglucosone erythropoietin, and carbamylated asialoerythropoietin.

A variety of host-expression vector systems may be utilized to produce the erythropoietins and erythropoietin-related molecules of the invention. Such host-expression systems represent vehicles by which the erythropoietins of interest may be produced and subsequently purified, but also represent cells that may, when transformed or transfected with the appropriate nucleotide coding sequences, exhibit the modified erythropoietin gene product *in situ*. These include but are not limited to, bacteria, insect, plant, mammalian, including human host systems, such as, but not limited to, insect cell systems infected with recombinant virus expression vectors (*e.g.*, baculovirus) containing the modified erythropoietin product coding sequences; plant cell systems infected with recombinant virus expression vectors (*e.g.*, cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV) or transformed with recombinant plasmid expression vectors (*e.g.*,

WO 02/053580

PCT/US01/49479

Ti plasmid) containing erythropoietin-related molecule coding sequences; or mammalian cell systems, including human cell systems, (*e.g.*, HT1080, COS, CHO, BHK, 293, 3T3) harboring recombinant expression constructs containing promoters derived from the genome of mammalian cells (*e.g.*, metallothionein promoter) or from mammalian viruses (*e.g.*, the adenovirus late promoter; the vaccinia virus 7.5K promoter).

In addition, a host cell strain may be chosen that modulates the expression of the inserted sequences, or modifies and processes the gene product in the specific fashion desired. Such modifications (*e.g.*, glycosylation) and processing (*e.g.*, cleavage) of protein products may be important for the function of the protein. Different host cells have characteristic and specific mechanisms for the post-translational processing and modification of proteins and gene products. Appropriate cell lines or host systems can be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein expressed. To this end, eukaryotic host cells that possess the cellular machinery for proper processing of the primary transcript, glycosylation, and phosphorylation of the gene product may be used. Such mammalian host cells, including human host cells, include but are not limited to HT1080, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, and WI38.

For long-term, high-yield production of recombinant proteins, stable expression is preferred. For example, cell lines that stably express the erythropoietin-related molecule gene product may be engineered. Rather than using expression vectors that contain viral origins of replication, host cells can be transformed with DNA controlled by appropriate expression control elements (*e.g.*, promoter, enhancer, sequences, transcription terminators, polyadenylation sites, etc.), and a

WO 02/053580

PCT/US01/49479

selectable marker. Following the introduction of the foreign DNA, engineered cells may be allowed to grow for 1-2 days in an enriched media, and then are switched to a selective media. The selectable marker in the recombinant plasmid confers resistance to the selection and allows cells to stably integrate the plasmid into their chromosomes and grow to form foci that in turn can be cloned and expanded into cell lines. This method may advantageously be used to engineer cell lines that express the erythropoietin-related molecule gene product. Such engineered cell lines may be particularly useful in screening and evaluation of compounds that affect the endogenous activity of the erythropoietin-related molecule gene product.

Alternatively, the expression characteristic of an endogenous erythropoietin gene within a cell line or microorganism may be modified by inserting a heterologous DNA regulatory element into the genome of a stable cell line or cloned microorganism such that the inserted regulatory element is operatively linked with the endogenous erythropoietin gene. For example, an endogenous erythropoietin gene which is normally "transcriptionally silent", *i.e.*, an erythropoietin gene which is normally not expressed, or is expressed only a very low levels in a cell line, may be activated by inserting a regulatory element which is capable of promoting the expression of a normally expressed gene product in that cell line or microorganism. Alternatively, a transcriptionally silent, endogenous erythropoietin gene may be activated by insertion of a promiscuous regulatory element that works across cell types.

A heterologous regulatory element may be inserted into a stable cell line or cloned microorganism, such it is operatively linked with an endogenous erythropoietin gene, using techniques, such as targeted homologous recombination, which are well known to those of skill

WO 02/053580

PCT/US01/49479

in the art, and described *e.g.*, in French Patent No. 2646438 to Institut Pasteur, U.S. Patent No. 4,215,051 to Chappel; U.S. Patent No. 5,578,461 to Sherwin *et al.*; International Application No. PCT/US92/09627 (WO93/09222) by Selden *et al.*; and International Application No. PCT/US90/06436 (WO91/06667) by Skoultschi *et al.*, each of which is incorporated by reference herein in its entirety.

In one embodiment of the invention, an erythropoietin-related molecule deficient in sialic residues, or completely lacking sialic residues, may be produced in mammalian cell, including a human cell. Such cells may be engineered to be deficient in, or lacking, the enzymes that add sialic acids, *i.e.*, the β -galactoside α 2,3 sialyltransferase (" α 2,3 sialyltransferase") and the β -galactoside α 2,6 sialyltransferase (" α 2,6 sialyltransferase") activity. In one embodiment, a mammalian cell is used in which either or both the α 2,3 sialyltransferase gene and/or the α 2,6 sialyltransferase gene, is deleted. Such deletions may be constructed using gene knock-out techniques well known in the art. In another embodiment, dihydrofolate reductase (DHFR) deficient Chinese Hamster Ovary (CHO) cells are used as the host cell for the production of recombinant erythropoietin-related molecules. CHO cells do not express the enzyme α 2,6 sialyltransferase and therefore do not add sialic acid in the 2,6 linkage to N-linked oligosaccharides of glycoproteins produced in these cells. As a result, recombinant proteins produced in CHO cells lack sialic acid in the 2,6 linkage to galactose (Sasaki *et al.* (1987; Takeuchi *et al.* *supra*; Mutsaers *et al.* *Eur. J. Biochem.* 156, 651 (1986); Takeuchi *et al.* *J. Chromotgr.* 400, 207 (1987). In one embodiment, to produce a host cell for the production of asialo-erythropoietin, the gene encoding α 2,3 sialyltransferase in CHO cells is deleted. Such α

WO 02/053580

PCT/US01/49479

2,3 sialyltransferase knock-out CHO cells completely lack sialyltransferase activity, and as a result, are useful for the recombinant expression and production of asialo-erythropoietin.

In another embodiment, asialo glycoproteins can be produced by interfering with sialic acid transport into the golgi apparatus *e.g.*, Eckhardt et al., 1998, J. Biol. Chem. 273:20189-95).

Using methods well known to those skilled in the art (*e.g.*, Oelmann et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:26291-300), mutagenesis of the nucleotide sugar CMP-sialic acid transporter can be accomplished to produce mutants of Chinese hamster ovary cells. These cells cannot add sialic acid residues to glycoproteins such as erythropoietin and produce only asialoerythropoietin.

Transfected mammalian cells producing erythropoietin also produce cytosolic sialidase which if it leaks into the culture medium degrades sialoerythropoietin with high efficiency (*e.g.*, Gramer et al, 1995 Biotechnology 13:692-698). Using methods well known to those knowledgeable in the art (*e.g.*, from information provided in Ferrari et al, 1994, Glycobiology 4:367-373), cell lines can be transfected, mutated or otherwise caused to constitutively produce sialidase. In this manner, asialoerythropoietin can be produced during the manufacture of asialoerythropoietin.

In the practice of one aspect of the present invention, a pharmaceutical composition as described above containing an erythropoietin may be administerable to a mammal by any route which provides a sufficient level of an erythropoietin in the vasculature to permit translocation across an endothelial cell barrier and beneficial effects on erythropoietin-responsive cells. When used for the purpose of perfusing a tissue or organ, similar results are desired. In the instance wherein the erythropoietin is used for *ex-vivo* perfusion, the erythropoietin may be any form of erythropoietin, such as the aforementioned erythropoietins but not limited thereto and may be

WO 02/053580

PCT/US01/49479

inclusive of native erythropoietins including human erythropoietin. In the instance where the cells or tissue is non-vascularized and/or the administration is by bathing the cells or tissue with the composition of the invention, the pharmaceutical composition provides an effective erythropoietin-responsive-cell-beneficial amount of an erythropoietin. The endothelial cell barriers across which an erythropoietin may translocate include tight junctions, perforated junctions, fenestrated junctions, and any other types of endothelial barriers present in a mammal. A preferred barrier is an endothelial cell tight junction, but the invention is not so limiting.

The aforementioned erythropoietins are useful generally for the therapeutic or prophylactic treatment of human diseases of the central nervous system or peripheral nervous system which have primarily neurological or psychiatric symptoms, ophthalmic diseases, cardiovascular diseases, cardiopulmonary diseases, respiratory diseases, kidney, urinary and reproductive diseases, gastrointestinal diseases and endocrine and metabolic abnormalities. In particular, such conditions and diseases include hypoxic conditions, which adversely affect excitable tissues, such as excitable tissues in the central nervous system tissue, peripheral nervous system tissue, or cardiac tissue or retinal tissue such as, for example, brain, heart, or retina/eye. Therefore, the invention can be used to treat or prevent damage to excitable tissue resulting from hypoxic conditions in a variety of conditions and circumstances. Non-limiting examples of such conditions and circumstances are provided in the table hereinbelow.

In the example of the protection of neuronal tissue pathologies treatable in accordance with the present invention, such pathologies include those which result from reduced oxygenation of neuronal tissues. Any condition which reduces the availability of oxygen to neuronal tissue,

WO 02/053580

PCT/US01/49479

resulting in stress, damage, and finally, neuronal cell death, can be treated by the methods of the present invention. Generally referred to as hypoxia and/or ischemia, these conditions arise from or include, but are not limited to stroke, vascular occlusion, prenatal or postnatal oxygen deprivation, suffocation, choking, near drowning, carbon monoxide poisoning, smoke inhalation, trauma, including surgery and radiotherapy, asphyxia, epilepsy, hypoglycemia, chronic obstructive pulmonary disease, emphysema, adult respiratory distress syndrome, hypotensive shock, septic shock, anaphylactic shock, insulin shock, sickle cell crisis, cardiac arrest, dysrhythmia, nitrogen narcosis, and neurological deficits caused by heart-lung bypass procedures.

In one embodiment, for example, the specific EPO compositions can be administered to prevent injury or tissue damage resulting from risk of injury or tissue damage during surgical procedures, such as, for example, tumor resection or aneurysm repair. Other pathologies caused by or resulting from hypoglycemia which are treatable by the methods described herein include insulin overdose, also referred to as iatrogenic hyperinsulinemia, insulinoma, growth hormone deficiency, hypocortisolism, drug overdose, and certain tumors.

Other pathologies resulting from excitable neuronal tissue damage include seizure disorders, such as epilepsy, convulsions, or chronic seizure disorders. Other treatable conditions and diseases include diseases such as stroke, multiple sclerosis, hypotension, cardiac arrest, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, cerebral palsy, brain or spinal cord trauma, AIDS dementia, age-related loss of cognitive function, memory loss, amyotrophic lateral sclerosis,

WO 02/053580

PCT/US01/49479

seizure disorders, alcoholism, retinal ischemia, optic nerve damage resulting from glaucoma, and neuronal loss.

The specific compositions and methods of the invention may be used to treat conditions of, and damage to, retinal tissue. Such disorders include, but are not limited to retinal ischemia, macular degeneration, retinal detachment, retinitis pigmentosa, arteriosclerotic retinopathy, hypertensive retinopathy, retinal artery blockage, retinal vein blockage, hypotension, and diabetic retinopathy.

In another embodiment, the methods principles of the invention may be used to protect or treat injury resulting from radiation damage to excitable tissue. A further utility of the methods of the present invention is in the treatment of neurotoxin poisoning, such as domoic acid shellfish poisoning, neuroleptanesthesia, and Guam disease, amyotrophic lateral sclerosis, and Parkinson's disease.

As mentioned above, the present invention is also directed to a method for enhancing excitable tissue function in a mammal by peripheral administration of an erythropoietin as described above. Various diseases and conditions are amenable to treatment using this method, and further, this method is useful for enhancing cognitive function in the absence of any condition or disease. These uses of the present invention are describe in further detail below and include enhancement of learning and training in both human and non-human mammals.

Conditions and diseases treatable by the methods of this aspect of the present invention directed to the central nervous system include but are not limited to mood disorders, anxiety disorders,

WO 02/053580

PCT/US01/49479

depression, autism, attention deficit hyperactivity disorder, and cognitive dysfunction. These conditions benefit from enhancement of neuronal function. Other disorders treatable in accordance with the teachings of the present invention include sleep disruption, for example, sleep apnea and travel-related disorders; subarachnoid and aneurismal bleeds, hypotensive shock, concussive injury, septic shock, anaphylactic shock, and sequelae of various encephalitides and meningitides, for example, connective tissue disease-related cerebritides such as lupus. Other uses include prevention of or protection from poisoning by neurotoxins, such as domoic acid shellfish poisoning, neuroleptanesthesia, and Guam disease, amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease; postoperative treatment for embolic or ischemic injury; whole brain irradiation; sickle cell crisis; and eclampsia.

A further group of conditions treatable by the methods of the present invention include mitochondrial dysfunction, of either an hereditary or acquired nature, which are the cause of a variety of neurological diseases typified by neuronal injury and death. For example, Leigh disease (subacute necrotizing encephalopathy) is characterized by progressive visual loss and encephalopathy, due to neuronal drop out, and myopathy. In these cases, defective mitochondrial metabolism fails to supply enough high energy substrates to fuel the metabolism of excitable cells. An erythropoietin receptor activity modulator optimizes failing function in a variety of mitochondrial diseases. As mentioned above, hypoxic conditions adversely affect excitable tissues. The excitable tissues include, but are not limited to, central nervous system tissue, peripheral nervous system tissue, and heart tissue. In addition to the conditions described above, the methods of the present invention are useful in the treatment of inhalation poisoning such as carbon monoxide and smoke inhalation, severe asthma, adult respiratory distress

WO 02/053580

PCT/US01/49479

syndrome, and choking and near drowning. Further conditions which create hypoxic conditions or by other means induce excitable tissue damage include hypoglycemia that may occur in inappropriate dosing of insulin, or with insulin-producing neoplasms (insulinoma).

Various neuropsychologic disorders which are believed to originate from excitable tissue damage are treatable by the instant methods. Chronic disorders in which neuronal damage is involved and for which treatment by the present invention is provided include disorders relating to the central nervous system and/or peripheral nervous system including age-related loss of cognitive function and senile dementia, chronic seizure disorders, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, dementia, memory loss, amyotrophic lateral sclerosis, multiple sclerosis, tuberous sclerosis, Wilson's Disease cerebral and progressive supranuclear palsy, Guam disease, Lewy body dementia, prion diseases, such as spongiform encephalopathies, e.g., Creutzfeldt-Jakob disease, Huntington's disease, myotonic dystrophy, Freidrich's ataxia and other ataxias, as well as Gilles de la Tourette's syndrome, seizure disorders such as epilepsy and chronic seizure disorder, stroke, brain or spinal cord trauma, AIDS dementia, alcoholism, autism, retinal ischemia, glaucoma, autonomic function disorders such as hypertension and sleep disorders, and neuropsychiatric disorders that include, but are not limited to schizophrenia, schizoaffective disorder, attention deficit disorder, dysthymic disorder, major depressive disorder, mania, obsessive-compulsive disorder, psychoactive substance use disorders, anxiety, panic disorder, as well as unipolar and bipolar affective disorders. Additional neuropsychiatric and neurodegenerative disorders include, for example, those listed in the American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical manual of Mental Disorders (DSM), the most current version of which is incorporated herein by reference in its entirety.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

In another embodiment, recombinant chimeric toxin molecules comprising erythropoietin can be used for therapeutic delivery of toxins to treat a proliferative disorder, such as cancer, or viral disorder, such as subacute sclerosing panencephalitis.

The following table lists additional exemplary, non-limiting indications as to the various conditions and diseases amenable to treatment by the aforementioned erythropoietins.

<i>Cell, tissue or organ</i>	<i>Dysfunction or pathology</i>	<i>Condition or disease</i>	<i>Type</i>
Heart	Ischemia	Coronary artery disease	Acute, chronic Stable, unstable
		Myocardial infarction	Dressler's syndrome
		Angina	
		Congenital heart disease	Valvular Cardiomyopathy
		Prinzmetal angina	
	Arrhythmia	Cardiac rupture	Aneurysmatic Septal perforation
		Angiitis	
		Tachy-, bradyarrhythmia Supraventricular, ventricular Conduction abnormalities	Stable, unstable Hypersensitive carotid sinus node
	Congestive heart failure	Left, right, bi-ventricular	Cardiomyopathies, such as idiopathic familial, infective, metabolic, storage disease, deficiencies, connective tissue disorder, infiltration and granulomas, neurovascular
		Myocarditis	Autoimmune, infective, idiopathic
		Cor pulmonale	
	Blunt and penetrating trauma		
	Toxins	Cocaine	

WO 02/053580

PCT/US01/49479

<i>Cell, tissue or organ</i>	<i>Dysfunction or pathology</i>	<i>Condition or disease</i>	<i>Type</i>
Vascular	Hypertension	Primary, secondary	
	Decompression sickness		
	Fibromuscular hyperplasia		
	Aneurysm	Dissecting, ruptured, enlarging	
Lungs	Obstructive	Asthma Chronic bronchitis, Emphysema and airway obstruction	
	Ischemic lung disease	Pulmonary embolism, Pulmonary thrombosis, Fat embolism	
	Environmental lung diseases		
	Ischemic lung disease	Pulmonary embolism Pulmonary thrombosis	
	Interstitial lung disease	Idiopathic pulmonary fibrosis	
	Congenital	Cystic fibrosis	
	Cor pulmonale		
	Trauma		
	Pneumonia and pneumonitides	Infectious, parasitic, toxic, traumatic, burn, aspiration	
	Sarcoidosis		
Pancreas	Endocrine	Diabetes mellitus, type I and II	Beta cell failure, dysfunction Diabetic neuropathy
		Other endocrine cell failure of the pancreas	
	Exocrine	Exocrine pancreas failure	pancreatitis
Bone	Osteopenia	Primary secondary	Hypogonadism immobilisation

WO 02/053580

PCT/US01/49479

<i>Cell, tissue or organ</i>	<i>Dysfunction or pathology</i>	<i>Condition or disease</i>	<i>Type</i>
			Postmenopausal Age-related Hyperparathyroidism Hyperthyroidism Calcium, magnesium, phosphorus and/or vitamin D deficiency
	Osteomyelitis		
	Avascular necrosis		
	Trauma		
	Paget's disease		
Skin	Alopecia	Arcata Totalis	Primary Secondary Male pattern baldness
	Vitiligo	Localized generalized	Primary secondary
	Diabetic ulceration		
	Peripheral vascular disease		
	Burn injuries		
Autoimmune disorders	Lupus erythematoses, Sjogren, Rheumatoid arthritis, Glomerulonephritis, Angiitis		
	Langerhan's histiocytosis		
Eye	Optic neuritis		
	Blunt and penetrating injuries, Infections, Sarcoid, Sickle C disease, Retinal detachment, Temporal arteritis		
Embryonic and fetal disorders	Asphyxia		
	Ischemia		

WO 02/053580

PCT/US01/49479

<i>Cell, tissue or organ</i>	<i>Dysfunction or pathology</i>	<i>Condition or disease</i>	<i>Type</i>
CNS	Chronic fatigue syndrome, acute and chronic hyposmolar and hyperosmolar syndromes, AIDS Dementia, Electrocutation		
	Encephalitis	Rabies, Herpes	
	Meningitis		
	Subdural hematoma		
	Nicotine addiction		
	Drug abuse and withdrawal	Cocaine, heroin, crack, marijuana, LSD, PCP, poly-drug abuse, ecstasy, opioids, sedative hypnotics, amphetamines, caffeine	
	Obsessive-compulsive disorders		
	Spinal stenosis, Transverse myelitis, Guillian Barre, Trauma, Nerve root compression, Tumoral compression, Heat stroke		
ENT	Tinnitus Meuniere's syndrome Hearing loss		
	Traumatic injury, barotrauma		
Kidney	Renal failure	Acute, chronic	Vascular/ischemic, interstitial disease, diabetic kidney disease, nephrotic syndromes, infections
	Henoch S. Purpura		
Striated muscle	Autoimmune disorders	Myasthenia gravis Dermatomyositis Polymyositis	

WO 02/053580

PCT/US01/49479

<i>Cell, tissue or organ</i>	<i>Dysfunction or pathology</i>	<i>Condition or disease</i>	<i>Type</i>
	Myopathies	Inherited metabolic, endocrine and toxic	
	Heat stroke		
	Crush injury		
	Rhabdomyolysis		
	Mitochondrial disease		
	Infection	Necrotizing fasciitis	
Sexual dysfunction	Central and peripheral	Impotence secondary to medication	
Liver	hepatitis	Viral, bacterial, parasitic	
	Ischemic disease		
	Cirrhosis, fatty liver		
	Infiltrative/metabolic diseases		
Gastrointestinal	Ischemic bowel disease		
	Inflammatory bowel disease		
	Necrotizing enterocolitis		
Organ transplantation	Treatment of donor and recipient		
Reproductive tract	infertility	Vascular Autoimmune Uterine abnormalities Implantation disorders	
Endocrine	Glandular hyper- and hypofunction		

As mentioned above, these diseases, disorders or conditions are merely illustrative of the range of benefits provided by the erythropoietins of the invention. Accordingly, this invention

WO 02/053580

PCT/US01/49479

generally provides therapeutic or prophylactic treatment of the consequences of mechanical trauma or of human diseases. Therapeutic or prophylactic treatment for diseases, disorders or conditions of the CNS and/or peripheral nervous system are preferred. Therapeutic or prophylactic treatment for diseases, disorders or conditions which have a psychiatric component is provided. Therapeutic or prophylactic treatment for diseases, disorders or conditions including but not limited to those having an ophthalmic, cardiovascular, cardiopulmonary, respiratory, kidney, urinary, reproductive, gastrointestinal, endocrine, or metabolic component is provided.

In one embodiment, such a pharmaceutical composition of an erythropoietin may be administered systemically to protect or enhance the target cells, tissue or organ. Such administration may be parenterally, via inhalation, or transmucosally, *e.g.*, orally, nasally, rectally, intravaginally, sublingually, submucosally or transdermally. Preferably, administration is parenteral, *e.g.*, via intravenous or intraperitoneal injection, and also including, but is not limited to, intra-arterial, intramuscular, intradermal and subcutaneous administration.

For other routes of administration, such as by use of a perfusate, injection into an organ, or other local administration, a pharmaceutical composition will be provided which results in similar levels of an erythropoietin as described above. A level of about 15pM –30 nM is preferred.

The pharmaceutical compositions of the invention may comprise a therapeutically effective amount of a compound, and a pharmaceutically acceptable carrier. In a specific embodiment, the term "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized foreign

WO 02/053580

PCT/US01/49479

pharmacopeia for use in animals, and more particularly in humans. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the therapeutic is administered. Such pharmaceutical carriers can be sterile liquids, such as saline solutions in water and oils, including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin, such as peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil and the like. A saline solution is a preferred carrier when the pharmaceutical composition is administered intravenously. Saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions can also be employed as liquid carriers, particularly for injectable solutions. Suitable pharmaceutical excipients include starch, glucose, lactose, sucrose, gelatin, malt, rice, flour, chalk, silica gel, sodium stearate, glycerol monostearate, talc, sodium chloride, dried skim milk, glycerol, propylene, glycol, water, ethanol and the like. The composition, if desired, can also contain minor amounts of wetting or emulsifying agents, or pH buffering agents. These compositions can take the form of solutions, suspensions, emulsion, tablets, pills, capsules, powders, sustained-release formulations and the like. The composition can be formulated as a suppository, with traditional binders and carriers such as triglycerides. The compounds of the invention can be formulated as neutral or salt forms. Pharmaceutically acceptable salts include those formed with free amino groups such as those derived from hydrochloric, phosphoric, acetic, oxalic, tartaric acids, etc., and those formed with free carboxyl groups such as those derived from sodium, potassium, ammonium, calcium, ferric hydroxides, isopropylamine, triethylamine, 2-ethylamino ethanol, histidine, procaine, etc. Examples of suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin. Such compositions will contain a therapeutically effective amount of the compound, preferably in purified form, together with a suitable amount of carrier so as to provide the form for proper administration to the patient. The formulation should suit the mode of administration.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

Pharmaceutical compositions adapted for oral administration may be provided as capsules or tablets; as powders or granules; as solutions, syrups or suspensions (in aqueous or non-aqueous liquids); as edible foams or whips; or as emulsions. Tablets or hard gelatine capsules may comprise lactose, starch or derivatives thereof, magnesium stearate, sodium saccharine, cellulose, magnesium carbonate, stearic acid or salts thereof. Soft gelatine capsules may comprise vegetable oils, waxes, fats, semi-solid, or liquid polyols etc. Solutions and syrups may comprise water, polyols and sugars.

An active agent intended for oral administration may be coated with or admixed with a material that delays disintegration and/or absorption of the active agent in the gastrointestinal tract (*e.g.*, glyceryl monostearate or glyceryl distearate may be used). Thus, the sustained release of an active agent may be achieved over many hours and, if necessary, the active agent can be protected from being degraded within the stomach. Pharmaceutical compositions for oral administration may be formulated to facilitate release of an active agent at a particular gastrointestinal location due to specific pH or enzymatic conditions.

Pharmaceutical compositions adapted for transdermal administration may be provided as discrete patches intended to remain in intimate contact with the epidermis of the recipient for a prolonged period of time. Pharmaceutical compositions adapted for topical administration may be provided as ointments, creams, suspensions, lotions, powders, solutions, pastes, gels, sprays, aerosols or oils. For topical administration to the skin, mouth, eye or other external tissues a topical ointment or cream is preferably used. When formulated in an ointment, the active ingredient

WO 02/053580

PCT/US01/49479

may be employed with either a paraffinic or a water-miscible ointment base. Alternatively, the active ingredient may be formulated in a cream with an oil-in-water base or a water-in-oil base. Pharmaceutical compositions adapted for topical administration to the eye include eye drops. In these compositions, the active ingredient can be dissolved or suspended in a suitable carrier, *e.g.*, in an aqueous solvent. Pharmaceutical compositions adapted for topical administration in the mouth include lozenges, pastilles and mouthwashes.

Pharmaceutical compositions adapted for nasal and pulmonary administration may comprise solid carriers such as powders (preferably having a particle size in the range of 20 to 500 microns). Powders can be administered in the manner in which snuff is taken, *i.e.*, by rapid inhalation through the nose from a container of powder held close to the nose. Alternatively, compositions adapted for nasal administration may comprise liquid carriers, *e.g.*, nasal sprays or nasal drops. Alternatively, inhalation directly into the lungs may be accomplished by inhalation deeply or installation through a mouthpiece into the oropharynx. These compositions may comprise aqueous or oil solutions of the active ingredient. Compositions for administration by inhalation may be supplied in specially adapted devices including, but not limited to, pressurized aerosols, nebulizers or insufflators, which can be constructed so as to provide predetermined dosages of the active ingredient. In a preferred embodiment, pharmaceutical compositions of the invention are administered into the nasal cavity directly or into the lungs via the nasal cavity or oropharynx.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

Pharmaceutical compositions adapted for rectal administration may be provided as suppositories or enemas. Pharmaceutical compositions adapted for vaginal administration may be provided as pessaries, tampons, creams, gels, pastes, foams or spray formulations.

Pharmaceutical compositions adapted for parenteral administration include aqueous and non-aqueous sterile injectable solutions or suspensions, which may contain antioxidants, buffers, bacteriostats and solutes that render the compositions substantially isotonic with the blood of an intended recipient. Other components that may be present in such compositions include water, alcohols, polyols, glycerine and vegetable oils, for example. Compositions adapted for parenteral administration may be presented in unit-dose or multi-dose containers, for example sealed ampules and vials, and may be stored in a freeze-dried (lyophilized) condition requiring only the addition of a sterile liquid carrier, *e.g.*, sterile saline solution for injections, immediately prior to use. Extemporaneous injection solutions and suspensions may be prepared from sterile powders, granules and tablets. In one embodiment, an autoinjector comprising an injectable solution of an erythropoietin may be provided for emergency use by ambulances, emergency rooms, and battlefield situations, and even for self-administration in a domestic setting, particularly where the possibility of traumatic amputation may occur, such as by imprudent use of a lawn mower. The likelihood that cells and tissues in a severed foot or toe will survive after reattachment may be increased by administering an erythropoietin to multiple sites in the severed part as soon as practicable, even before the arrival of medical personnel on site, or arrival of the afflicted individual with severed toe in tow at the emergency room.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

In a preferred embodiment, the composition is formulated in accordance with routine procedures as a pharmaceutical composition adapted for intravenous administration to human beings.

Typically, compositions for intravenous administration are solutions in sterile isotonic aqueous buffer. Where necessary, the composition may also include a solubilizing agent and a local anesthetic such as lidocaine to ease pain at the site of the injection. Generally, the ingredients are supplied either separately or mixed together in unit dosage form, for example, as a dry lyophilized powder or water-free concentrate in a hermetically-sealed container such as an ampule or sachette indicating the quantity of active agent. Where the composition is to be administered by infusion, it can be dispensed with an infusion bottle containing sterile pharmaceutical grade water or saline. Where the composition is administered by injection, an ampule of sterile saline can be provided so that the ingredients may be mixed prior to administration.

Suppositories generally contain active ingredient in the range of 0.5% to 10% by weight; oral formulations preferably contain 10% to 95% active ingredient.

A perfusate composition may be provided for use in transplanted organ baths, for in situ perfusion, or for administration to the vasculature of an organ donor prior to organ harvesting. Such pharmaceutical compositions may comprise levels of an erythropoietin or a form of an erythropoietin not suitable for acute or chronic, local or systemic administration to an individual, but will serve the functions intended herein in a cadaver, organ bath, organ perfusate, or in situ perfusate prior to removing or reducing the levels of the erythropoietin contained therein before exposing or returning the treated organ or tissue to regular circulation. The erythropoietin for

WO 02/053580

PCT/US01/49479

this aspect of the invention may be any erythropoietin, such as naturally-occurring forms such as human erythropoietin, or any of the erythropoietins hereinabove described, such as asialoerythropoietin and phenylglyoxal-erythropoietins, as non-limiting examples.

The invention also provides a pharmaceutical pack or kit comprising one or more containers filled with one or more of the ingredients of the pharmaceutical compositions of the invention. Optionally associated with such container(s) can be a notice in the form prescribed by a governmental agency regulating the manufacture, use or sale of pharmaceuticals or biological products, which notice reflects approval by the agency of manufacture, use or sale for human administration.

In another embodiment, for example, erythropoietin can be delivered in a controlled-release system. For example, the polypeptide may be administered using intravenous infusion, an implantable osmotic pump, a transdermal patch, liposomes, or other modes of administration. In one embodiment, a pump may be used (see 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). In another embodiment, the compound can be delivered in a vesicle, in particular a liposome (see Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat *et al.*, in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); WO 91/04014; U.S. Patent No. 4,704,355; Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; see generally *ibid.*). In another embodiment, polymeric materials can be used [see Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, Florida, 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball

WO 02/053580

PCT/US01/49479

(eds.), Wiley: New York (1984); Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61, 1953; see also Levy *et al.*, 1985, Science 228:190; During *et al.*, 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard *et al.*, 1989, J. Neurosurg. 71:105).

In yet another embodiment, a controlled release system can be placed in proximity of the therapeutic target, *i.e.*, the target cells, tissue or organ, thus requiring only a fraction of the systemic dose (see, *e.g.*, Goodson, pp. 115-138 in Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, *supra*, 1984). Other controlled release systems are discussed in the review by Langer (1990, Science 249:1527-1533).

In another embodiment, erythropoietin, as properly formulated, can be administered by nasal, oral, rectal, vaginal, or sublingual administration.

In a specific embodiment, it may be desirable to administer the erythropoietin compositions of the invention locally to the area in need of treatment; this may be achieved by, for example, and not by way of limitation, local infusion during surgery, topical application, *e.g.*, in conjunction with a wound dressing after surgery, by injection, by means of a catheter, by means of a suppository, or by means of an implant, said implant being of a porous, non-porous, or gelatinous material, including membranes, such as silastic membranes, or fibers.

Selection of the preferred effective dose will be determined by a skilled artisan based upon considering several factors which will be known to one of ordinary skill in the art. Such factors include the particular form of erythropoietin, and its pharmacokinetic parameters such as

WO 02/053580

PCT/US01/49479

bioavailability, metabolism, half-life, etc., which will have been established during the usual development procedures typically employed in obtaining regulatory approval for a pharmaceutical compound. Further factors in considering the dose include the condition or disease to be treated or the benefit to be achieved in a normal individual, the body mass of the patient, the route of administration, whether administration is acute or chronic, concomitant medications, and other factors well known to affect the efficacy of administered pharmaceutical agents. Thus the precise dosage should be decided according to the judgment of the practitioner and each patient's circumstances, *e.g.*, depending upon the condition and the immune status of the individual patient, according to standard clinical techniques.

In another aspect of the invention, a perfusate or perfusion solution is provided for perfusion and storage of organs for transplant, the perfusion solution including an amount of an erythropoietin effective to protect erythropoietin-responsive cells and associated cells, tissues or organs. Transplant includes but is not limited to xenotransplantation, where a organ (including cells, tissue or other bodily part) is harvested from one donor and transplanted into a different recipient; and autotransplant, where the organ is taken from one part of a body and replaced at another, including bench surgical procedures, in which an organ may be removed, and while *ex vivo*, resected, repaired, or otherwise manipulated, such as for tumor removal, and then returned to the original location. In one embodiment, the perfusion solution is the University of Wisconsin (UW) solution (U.S. Patent No. 4,798,824) which contains from about 1 to about 25 U/ml erythropoietin, 5% hydroxyethyl starch (having a molecular weight of from about 200,000 to about 300,000 and substantially free of ethylene glycol, ethylene chlorohydrin, sodium chloride and acetone); 25mM KH_2PO_4 ; 3mM glutathione; 5mM adenosine; 10mM glucose;

WO 02/053580

PCT/US01/49479

10mM HEPES buffer; 5mM magnesium gluconate; 1.5mM CaCl₂; 105mM sodium gluconate; 200,000 units penicillin; 40 units insulin; 16mg Dexamethasone; 12mg Phenol Red; and has a pH of 7.4-7.5 and an osmolality of about 320 mOSm/l. The solution is used to maintain cadaveric kidneys and pancreases prior to transplant. Using the solution, preservation can be extended beyond the 30-hour limit recommended for cadaveric kidney preservation. This particular perfusate is merely illustrative of a number of such solutions that can be adapted for the present use by inclusion of an effective amount of an erythropoietin. In a further embodiment, the perfusate solution contains from about 5 to about 35 U/ml erythropoietin, or from about 10 to about 30 U/ml erythropoietin. As mentioned above, any form of erythropoietin can be used in this aspect of the invention.

While the preferred recipient of an erythropoietin for the purposes herein throughout is a human, the methods herein apply equally to other mammals, particularly domesticated animals, livestock, companion and zoo animals. However, the invention is not so limiting and the benefits can be applied to any mammal.

In further aspects of the *ex-vivo* invention, any erythropoietin such as but not limited to the erythropoietins described above, as well as native erythropoietins as well as an analog thereof, an erythropoietin mimetic, and erythropoietin fragment, a hybrid erythropoietin molecule, an erythropoietin-receptor-binding molecule, an erythropoietin agonist, a renal erythropoietin, a brain erythropoietin, an oligomer thereof, a multimer thereof, a mutein thereof, a congener thereof, a naturally-occurring form thereof, a synthetic form thereof, a recombinant form thereof, a glycosylation variant thereof, a deglycosylated variant thereof, or a combination thereof.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

In another aspect of the invention, methods and compositions for enhancing the viability of cells, tissues or organs which are not isolated from the vasculature by an endothelial cell barrier are provided by exposing the cells, tissue or organs directly to a pharmaceutical composition comprising an erythropoietin, or administering or contacting an erythropoietin-containing pharmaceutical composition to the vasculature of the tissue or organ. Enhanced activity of erythropoietin-responsive cells in the treated tissue or organ are responsible for the positive effects exerted.

As described above, the invention is based, in part, on the discovery that erythropoietin molecules can be transported from the luminal surface to the basement membrane surface of endothelial cells of the capillaries of organs with endothelial cell tight junctions, including, for example, the brain, retina, and testis. Thus, erythropoietin-responsive cells across the barrier are susceptible targets for the beneficial effects of erythropoietin, and others cell types or tissues or organs that contain and depend in whole or in part on erythropoietin-responsive cells therein are targets for the methods of the invention. While not wishing to be bound by any particular theory, after transcytosis of erythropoietin, erythropoietin can interact with an erythropoietin receptor on an erythropoietin-responsive cell, for example, neuronal, retinal, muscle, heart, lung, liver, kidney, small intestine, adrenal cortex, adrenal medulla, capillary endothelial, testes, ovary, or endometrial cell, and receptor binding can initiate a signal transduction cascade resulting in the activation of a gene expression program within the erythropoietin-responsive cell or tissue, resulting in the protection of the cell or tissue, or organ, from damage, such as by toxins, chemotherapeutic agents, radiation therapy, hypoxia, *etc.* Thus, methods for protecting

WO 02/053580

PCT/US01/49479

erythropoietin-responsive cell-containing tissue from injury or hypoxic stress, and enhancing the function of such tissue are described in detail hereinbelow.

In the practice of one embodiment of the invention, a mammalian patient is undergoing systemic chemotherapy for cancer treatment, including radiation therapy, which commonly has adverse effects such as nerve, lung, heart, ovarian or testicular damage. Administration of a pharmaceutical composition comprising an erythropoietin as described above is performed prior to and during chemotherapy and/or radiation therapy, to protect various tissues and organs from damage by the chemotherapeutic agent, such as to protect the testes. Treatment may be continued until circulating levels of the chemotherapeutic agent have fallen below a level of potential danger to the mammalian body.

In the practice of another embodiment of the invention, various organs were planned to be harvested from a victim of an automobile accident for transplant into a number of recipients, some of which required transport for an extended distance and period of time. Prior to organ harvesting, the victim was infused with a pharmaceutical composition comprising an erythropoietin as described herein. Harvested organs for shipment were perfused with a perfusate containing erythropoietin as described herein, and stored in a bath comprising erythropoietin. Certain organs were continuously perfused with a pulsatile perfusion device, utilizing a perfusate containing an erythropoietin in accordance with the present invention. Minimal deterioration of organ function occurred during the transport and upon implant and reperfusion of the organs *in situ*.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

In another embodiment of the invention, a surgical procedure to repair a heart valve required temporary cardioplegia and arterial occlusion. Prior to surgery, the patient was infused with 500 U erythropoietin per kg body weight. Such treatment prevented hypoxic ischemic cellular damage, particularly after reperfusion.

In another embodiment of the invention, in any surgical procedure, such as in cardiopulmonary bypass surgery, a naturally-occurring erythropoietin or any erythropoietin of the invention can be used. In one embodiment, administration of a pharmaceutical composition comprising an erythropoietin as described above is performed prior to, during, and/or following the bypass procedure, to protect the function of brain, heart, and other other organs.

In the foregoing examples in which an erythropoietin of the invention, including naturally-occurring erythropoietin, is used for *ex-vivo* applications, or to treat erythropoietin-responsive cells such as neuronal tissue, retinal tissue, heart, lung, liver, kidney, small intestine, adrenal cortex, adrenal medulla, capillary endothelial, testes, ovary, or endometrial cells or tissue, the invention provides a pharmaceutical composition in dosage unit form adapted for protection or enhancement of erythropoietin-responsive cells, tissues or organs distal to the vasculature which comprises, per dosage unit, an effective non-toxic amount within the range from about 50,000 to 500,000 Units, 60,000 to 500,000 Units, 70,000 to 500,000 Units, 80,000 to 500,000 Units, 90,000 to 500,000 Units, 100,000 to 500,000 Units, 150,000 to 500,000 Units, 200,000 to 500,000 Units, 250,000 to 500,000 Units, 300,000 to 500,000 Units, 350,000 to 500,000 Units, 400,000 to 500,000 Units, or 450,000 to 500,000 Units of erythropoietin, an erythropoietin receptor activity modulator, or an erythropoietin-activated receptor modulator and a

WO 02/053580

PCT/US01/49479

pharmaceutically acceptable carrier. In a preferred embodiment, the effective non-toxic amount of erythropoietin is within the range from about 50,000 to 500,000 Units. In a preferred embodiment, the erythropoietin in the aforementioned composition is non-erythropoietic.

In a further aspect of the invention, erythropoietin administration was found to restore cognitive function in animals having undergone brain trauma. After a delay of either 5 days or 30 days, administration of erythropoietin was still able to restore function as compared to sham-treated animals, indicating the ability of an erythropoietin to regenerate or restore brain activity. Thus, the invention is also directed to the use of an erythropoietin for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of brain trauma and other cognitive dysfunctions, including treatment well after the injury (e.g. three days, five days, a week, a month, or longer). The invention is also directed to a method for the treatment of cognitive dysfunction following injury by administering an effective amount of an erythropoietin. Any erythropoietin as described herein may be used for this aspect of the invention.

Furthermore, this restorative aspect of the invention is directed to the use of any of the erythropoietins herein for the preparation of a pharmaceutical composition for the restoration of cellular, tissue or organ dysfunction, wherein treatment is initiated after, and well after, the initial insult responsible for the dysfunction. Moreover, treatment using erythropoietins of the invention can span the course of the disease or condition during the acute phase as well as a chronic phase.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

In the instance wherein an erythropoietin of the invention has erythropoietic activity, in a preferred embodiment, erythropoietin may be administered systemically at a dosage between about 300 and about 10,000 Units/kg body weight, preferably about 500-5,000 Units/kg-body weight, most preferably about 1,000 Units/kg-body weight, per administration. This effective dose should be sufficient to achieve serum levels of erythropoietin greater than about 10,000, 15,000, or 20,000 mU/ml of serum after erythropoietin administration. Such serum levels may be achieved at about 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 hours post-administration. Such dosages may be repeated as necessary. For example, administration may be repeated daily, as long as clinically necessary, or after an appropriate interval, *e.g.*, every 1 to 12 weeks, preferably, every 1 to 3 weeks. In one embodiment, the effective amount of erythropoietin and a pharmaceutically acceptable carrier may be packaged in a single dose vial or other container. In another embodiment, an erythropoietin useful for the purposes herein is nonerythropoietic, *i.e.*, it is capable of exerting the activities described herein but not causing an increase in hemoglobin concentration or hematocrit. Such a non-erythropoietic form of erythropoietin is preferred in instances wherein the methods of the present invention are intended to be provided chronically. In another embodiment, an erythropoietin is given at a dose greater than that necessary to maximally stimulate erythropoiesis. As noted above, an erythropoietin of the invention does not necessarily have erythropoietic activity, and therefore the above dosages expressed in hematopoietic units is merely exemplary for erythropoietins that are erythropoietic; hereinabove molar equivalents for dosages are provided which are applicable to any erythropoietin.

The present invention is further directed to a method for facilitating the transport of a molecule across an endothelial cell barrier in a mammal by administering a composition which comprises

WO 02/053580

PCT/US01/49479

the particular molecule in association with an erythropoietin as described hereinabove. As described above, tight junctions between endothelial cells in certain organs in the body create a barrier to the entry of certain molecules. For treatment of various conditions within the barriered organ, means for facilitating passage of pharmaceutical agents is desired. An erythropoietin of the invention is useful as a carrier for delivering other molecules across the blood-brain and other similar barriers. A composition comprising a molecule desirous of crossing the barrier with erythropoietin is prepared, and peripheral administration of the composition results in the transcytosis of the composition across the barrier. The association between the molecule to be transported across the barrier and the erythropoietin may be a labile covalent bond, in which case the molecule is released from association with the erythropoietin after crossing the barrier. If the desired pharmacological activity of the molecule is maintained or unaffected by association with erythropoietin, such a complex can be administered.

The skilled artisan will be aware of various means for associating molecules with an erythropoietin of the invention and the other agents described above, by covalent, non-covalent, and other means; furthermore, evaluation of the efficacy of the composition can be readily determined in an experimental system. Association of molecules with an erythropoietin may be achieved by any number of means, including labile, covalent binding, cross-linking, etc. Biotin/avidin interactions may be employed. As mentioned above, a hybrid molecule may be prepared by recombinant or synthetic means, for example, which includes both the domain of the molecule with desired pharmacological activity and the domain responsible for erythropoietin receptor activity modulation.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

A molecule may be conjugated to an erythropoietin through a polyfunctional molecule, *i.e.*, a polyfunctional crosslinker. As used herein, the term "polyfunctional molecule" encompasses molecules having one functional group that can react more than one time in succession, such as formaldehyde, as well as molecules with more than one reactive group. As used herein, the term "reactive group" refers to a functional group on the crosslinker that reacts with a functional group on a molecule (*e.g.*, peptide, protein, carbohydrate, nucleic acid, particularly a hormone, antibiotic, or anti-cancer agent to be delivered across an endothelial cell barrier) so as to form a covalent bond between the cross-linker and that molecule. The term "functional group" retains its standard meaning in organic chemistry. The polyfunctional molecules which can be used are preferably biocompatible linkers, *i.e.*, they are noncarcinogenic, nontoxic, and substantially non-immunogenic *in vivo*. Polyfunctional cross-linkers such as those known in the art and described herein can be readily tested in animal models to determine their biocompatibility. The polyfunctional molecule is preferably bifunctional. As used herein, the term "bifunctional molecule" refers to a molecule with two reactive groups. The bifunctional molecule may be heterobifunctional or homobifunctional. A heterobifunctional cross-linker allows for vectorial conjugation. It is particularly preferred for the polyfunctional molecule to be sufficiently soluble in water for the cross-linking reactions to occur in aqueous solutions such as in aqueous solutions buffered at pH 6 to 8, and for the resulting conjugate to remain water soluble for more effective bio-distribution. Typically, the polyfunctional molecule covalently bonds with an amino or a sulfhydryl functional group. However, polyfunctional molecules reactive with other functional groups, such as carboxylic acids or hydroxyl groups, are contemplated in the present invention.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

The homobifunctional molecules have at least two reactive functional groups, which are the same. The reactive functional groups on a homobifunctional molecule include, for example, aldehyde groups and active ester groups. Homobifunctional molecules having aldehyde groups include, for example, glutaraldehyde and subaraldehyde. The use of glutaraldehyde as a cross-linking agent was disclosed by Poznansky et al., Science 223, 1304-1306 (1984).

Homobifunctional molecules having at least two active ester units include esters of dicarboxylic acids and N-hydroxysuccinimide. Some examples of such N-succinimidyl esters include disuccinimidyl suberate and dithio-bis-(succinimidyl propionate), and their soluble bis-sulfonic acid and bis-sulfonate salts such as their sodium and potassium salts. These homobifunctional reagents are available from Pierce, Rockford, Illinois.

The heterobifunctional molecules have at least two different reactive groups. The reactive groups react with different functional groups, *e.g.*, present on the erythropoietin and the molecule. These two different functional groups that react with the reactive group on the heterobifunctional cross-linker are usually an amino group, *e.g.*, the epsilon amino group of lysine; a sulfhydryl group, *e.g.*, the thiol group of cysteine; a carboxylic acid, *e.g.*, the carboxylate on aspartic acid; or a hydroxyl group, *e.g.*, the hydroxyl group on serine.

Of course, the various erythropoietin molecules of the invention may not have suitable reactive groups available for use with certain cross-linking agent; however, one of skill in the art will be amply aware of the choice of cross-linking agents based on the available groups for cross-linking in an erythropoietin of the invention.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

When a reactive group of a heterobifunctional molecule forms a covalent bond with an amino group, the covalent bond will usually be an amido or imido bond. The reactive group that forms a covalent bond with an amino group may, for example, be an activated carboxylate group, a halocarbonyl group, or an ester group. The preferred halocarbonyl group is a chlorocarbonyl group. The ester groups are preferably reactive ester groups such as, for example, an N-hydroxy-succinimide ester group.

The other functional group typically is either a thiol group, a group capable of being converted into a thiol group, or a group that forms a covalent bond with a thiol group. The covalent bond will usually be a thioether bond or a disulfide. The reactive group that forms a covalent bond with a thiol group may, for example, be a double bond that reacts with thiol groups or an activated disulfide. A reactive group containing a double bond capable of reacting with a thiol group is the maleimido group, although others, such as acrylonitrile, are also possible. A reactive disulfide group may, for example, be a 2-pyridyldithio group or a 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) group. Some examples of heterobifunctional reagents containing reactive disulfide bonds include N-succinimidyl 3-(2-pyridyl-dithio)propionate (Carlsson, et al., 1978, *Biochem J.*, 173:723-737), sodium S-4-succinimidyloxycarbonyl- α -methylbenzylthiosulfate, and 4-succinimidyloxycarbonyl- α -methyl-(2-pyridyldithio)toluene. N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate is preferred. Some examples of heterobifunctional reagents comprising reactive groups having a double bond that reacts with a thiol group include succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate and succinimidyl m-maleimidobenzoate.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

Other heterobifunctional molecules include succinimidyl 3-(maleimido)propionate, sulfosuccinimidyl 4-(p-maleimido-phenyl)butyrate, sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl-cyclohexane)-1-carboxylate, maleimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimide ester. The sodium sulfonate salt of succinimidyl m-maleimidobenzoate is preferred. Many of the above-mentioned heterobifunctional reagents and their sulfonate salts are available from Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois USA.

The need for the above-described conjugated to be reversible or labile may be readily determined by the skilled artisan. A conjugate may be tested *in vitro* for both the erythropoietin, and for the desirable pharmacological activity. If the conjugate retains both properties, its suitability may then be tested *in vivo*. If the conjugated molecule requires separation from the erythropoietin for activity, a labile bond or reversible association with erythropoietin will be preferable. The lability characteristics may also be tested using standard *in vitro* procedures before *in vivo* testing.

Additional information regarding how to make and use these as well as other polyfunctional reagents may be obtained from the following publications or others available in the art:

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.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Additionally, methods of cross-linking are reviewed by Means and Feeney, 1990, Bioconjugate Chem. 1:2-12.

Barriers which are crossed by the above-described methods and compositions of the present invention include but are not limited to the blood-brain barrier, the blood-eye barrier, the blood-testes barrier, the blood-ovary barrier, and the blood-uterus barrier.

Candidate molecules for transport across an endothelial cell barrier include, for example, hormones such as growth hormone, neurotrophic factors, antibiotics or antifungals such as those normally excluded from the brain and other barriered organs, peptide radiopharmaceuticals, antisense drugs, antibodies against biologically-active agents, pharmaceuticals, and anti-cancer

WO 02/053580

PCT/US01/49479

agents. Non-limiting examples of such molecules include growth hormone, nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor β 1 (TGF β 1), transforming growth factor β 2 (TGF β 2), transforming growth factor β 3 (TGF β 3), interleukin 1, interleukin 2, interleukin 3, and interleukin 6, AZT, antibodies against tumor necrosis factor, and immunosuppressive agents such as cyclosporin.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

1 The present invention is also directed to a composition comprising a molecule to be transported
2 via transcytosis across a endothelial cell tight junction barrier and an erythropoietin as described
3 above. The invention is further directed to the use of a conjugate between a molecule and an
4 erythropoietin as described above for the preparation of a pharmaceutical composition for the
5 delivery of the molecule across a barrier as described above.

6

7 The present invention may be better understood by reference to the following non-limiting
8 Examples, which are provided as exemplary of the invention. The following examples are
9 presented in order to more fully illustrate the preferred embodiments of the invention. They
10 should in no way be construed, however, as limiting the broad scope of the invention.

11

12

Example 1

13

ERYTHROPOIETIN CROSSES THE BLOOD-CEREBROSPINAL FLUID

14

TIGHT BARRIER

15

16 Adult male Sprague-Dawley rats were anesthetized and administered recombinant human
17 erythropoietin intraperitoneally. Cerebrospinal fluid was sampled from the cisterna magna at 30
18 minute intervals up to 4 hrs and the erythropoietin concentration determined using a sensitive
19 and specific enzyme-linked immunoassay. As illustrated in **Figure 1**, the baseline erythropoietin
20 concentration in CSF is 8 mU/ml. After a delay of several hours, the levels of erythropoietin
21 measured in the CSF begin to rise and by 2.5 hours and later are significantly different from the
22 baseline concentration at the $p < 0.01$ level. The peak level of about 100 mU/ml is within the
23 range known to exert protective effects *in vitro* (0.1 to 100 mU/ml). The time to peak occurs at

WO 02/053580

PCT/US01/49479

1 about 3.5 hrs, which is delayed significantly from the peak serum levels (less than 1 hr). The
2 results of this experiment illustrate that significant levels of erythropoietin can be accomplished
3 across a tight cellular junction by bolus parenteral administration of erythropoietin at
4 appropriate concentrations.

5

6

Example 2

7

MAINTENANCE OF FUNCTION IN HEART PREPARED FOR TRANSPLANTATION

8

9 Wistar male rats weighing 300 to 330g are given erythropoietin (5000 U/kg body weight) or
10 vehicle 24h prior to removal of the heart for *ex vivo* studies, done in accordance with the protocol
11 of Delcayre et al., 1992, *Amer. J. Physiol.* **263**:H1537-45. Animals are sacrificed with
12 pentobarbital (0.3mL), and intravenously heparinized (0.2mL). The hearts are initially allowed to
13 equilibrate for 15 min. The left ventricular balloon is then inflated to a volume that gives an end-
14 diastolic pressure of 8 mm Hg. A left ventricular pressure-volume curve is constructed by
15 incremental inflation of the balloon volume by 0.02 ml aliquots. Zero volume is defined as the
16 point at which the left ventricular end-diastolic pressure is zero. On completion of the pressure-
17 volume curve, the left ventricular balloon is deflated to set end-diastolic pressure back to
18 8mmHg and the control period is pursued for 15 min, after check of coronary flow. Then the
19 heart is arrested with 50 mL Celsior + molecule to rest at 4°C under a pressure of 60cm H₂O. The
20 heart is then removed and stored 5 hours at 4°C in plastic container filled with the same solution
21 and surrounded with crushed ice.

22

WO 02/053580

PCT/US01/49479

1 On completion of storage, the heart is transferred to a Langendorff apparatus. The balloon
2 catheter is re-inserted into the left ventricle and re-inflated to the same volume as during
3 preischemic period. The heart is re-perfused for at least 2 hours at 37°C. The re-perfusion
4 pressure is set at 50cm H₂O for 15min of re-flow and then back to 100cm H₂O for the 2 next
5 hours. Pacing (320 beats per minute) is re-instituted. Isovolumetric measurements of contractile
6 indexes and diastolic pressure are taken in triplicate at 25, 45, 60, 120 min of reperfusion. At this
7 time point pressure volume curves are performed and coronary effluent during the 45min
8 reperfusion collected to measure creatine kinase leakage. The two treatment groups are compared
9 using an unpaired t-test, and a linear regression using the end-diastolic pressure data is used to
10 design compliance curves. As shown in Figure 2, significant improvement of left ventricular
11 pressure developed occurs after treatment with erythropoietin, as well as improved volume-
12 pressure curve, decrease of left diastolic ventricular pressure and decrease of creatine kinase
13 leakage.

14

15

Example 3

16

ERYTHROPOIETIN PROTECTS MYOCARDIUM FROM ISCHEMIC INJURY.

17

18 Adult male rats given recombinant human erythropoietin (5000 U/kg body weight) 24 hrs
19 previously are anesthetized and prepared for coronary artery occlusion. An additional dose of
20 erythropoietin is given at the start of the procedure and the left main coronary artery occluded for
21 30 minutes and then released. The same dose of erythropoietin is given daily for one week after
22 treatment. The animals are then studied for cardiac function. As **Figure 3** illustrates, animals
23 receiving a sham injection (saline) demonstrated a large increase in the left end diastolic

WO 02/053580

PCT/US01/49479

1 pressure, indicative of a dilated, stiff heart secondary to myocardial infarction. In
2 contradistinction, animals receiving erythropoietin suffered no decrement in cardiac function,
3 compared to sham operated controls (difference significant at the $p < 0.01$ level).

4

5

Example 4

6

ERYTHROPOIETIN MOLECULES

7

8 Native erythropoietin may be modified to tailor its activities for a specific tissue or tissues.
9 Several non-limiting strategies that may be carried out to achieve this desired tissue specificity
10 include modifications that remove or modify the glycosylation moieties, of which erythropoietin
11 has three N-linked and one O-linked. Such variants of glycosylated erythropoietin can be
12 produced in a number of ways. For example, the sialic acids which terminate the end of the sugar
13 chains can be removed by specific sialidases depending on the chemical linkage connecting the
14 sialic acid to the sugar chain. Alternatively, the glycosylated structure can be dismantled in
15 different ways by using other enzymes that cleave at specific linkages. To validate these
16 principles, recombinant human erythropoietin was desialized using Sialidase A (Prozyme Inc.)
17 according to the manufacturer's protocol. Successful chemical modification was confirmed by
18 running the reaction product on an SDS polyacrylamide gel and staining the resultant bands
19 which showed that the chemically-modified erythropoietin possessed an apparent molecular
20 weight of ~31 kD as expected, compared to unmodified erythropoietin which was ~34 kD and
21 by measuring the sialic acid residues remaining by chemical means to be < 0.1 mole/ mole of
22 erythropoietin.

23

WO 02/053580

PCT/US01/49479

1 In another modification wherein the amino acid residues of erythropoietin are modified, arginine
2 residues were modified by using phenylglyoxal according to the protocol of Takahashi (1977, *J.*
3 *Biochem.* 81:395-402) carried out for variable lengths of time ranging from 0.5 to 3 hrs at room
4 temperature. The reaction was terminated by dialyzing the reaction mixture against water. Use
5 of such modified forms of erythropoietin is fully embraced herein.

6
7 Asialoerythropoietin and phenylglyoxalerythropoietin were as effective as native erythropoietin
8 for neural cells *in vitro* as shown in Figures 4-6. *In-vitro* testing was carried out using neural-
9 like embryonal carcinoma cells (P19) that undergo apoptosis upon the withdrawal of serum.
10 Twenty-four hours before the removal of serum, 1-1000 ng/ml of erythropoietin or a modified
11 erythropoietin was added to the cultures. The following day the medium was removed, the cells
12 washed with fresh, non-serum containing medium, and medium containing the test substance (no
13 serum) added back to the cultures for an additional 48 hours. To determine the number of
14 viable cells, a tetrazolium reduction assay was performed (CellTiter 96; Promega, Inc.). As
15 Figure 4-5 illustrate, asialoerythropoietin appears to be of equal potency to erythropoietin itself
16 in preventing cell death. The phenylglyoxal-modified erythropoietin was tested using the neural-
17 like P19 cell assay described above. As Figure 6 illustrates, this chemically-modified
18 erythropoietin fully retains its neuroprotective effects.

19
20 Retention of neuroprotective activity *in vivo* was confirmed using a rat focal ischemia model in
21 which a reversible lesion in the territory of the middle cerebral artery is performed as described
22 previously (Brines et al., 2000, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 97:10526-31). Adult male Sprague-
23 Dawley rats were administered asialoerythropoietin or erythropoietin (5000 U/kgBW

WO 02/053580

PCT/US01/49479

1 intraperitoneally) or vehicle at the onset of the arterial occlusion. Twenty-four hours later, the
2 animals were sacrificed and their brains removed for study. Serial sections were cut and stained
3 with tetrazolium salts to identify living regions of the brain. As shown in **Figure 7**,
4 asialoerythropoietin was as effective as native erythropoietin in providing neuroprotection from 1
5 hour of ischemia. **Figure 8** shows the results of another focal ischemia model in which a
6 comparative dose response was performed with erythropoietin and asialoerythropoietin. At the
7 lowest dose of 250 U/kg, asialoerythropoietin afforded protection whereas unmodified
8 erythropoietin did not.

9

10

Example 5

11

MODIFICATION OF PRIMARY STRUCTURE OF ERYTHROPOIETIN AND

12

EFFECTIVENESS AT NEURONAL PROTECTION

13

14 A number of mutant erythropoietin molecules have been described which do not bind to the
15 erythrocyte erythropoietin receptor and thus do not support erythropoiesis *in vivo* or *in vitro*.
16 Some of these molecules will nevertheless mimic the actions of erythropoietin itself in other
17 tissues or organs. For example, a 17-mer containing the amino-acid sequence of 31-47 of native
18 erythropoietin is inactive for erythropoiesis but fully active for neural cells *in vitro* (Campana &
19 O'Brien, 1998: Int. J. Mol. Med. 1:235-41).

20

21 Derivative erythropoietins desirable for the uses described herein may be generated by
22 guanidination, amidination, trinitrophenylation, acetylation, succinylation, nitration, or
23 modification of arginine residues or carboxyl groups, among other procedures as mentioned

WO 02/053580

PCT/US01/49479

1 herein above, to produce erythropoietins which maintain their activities for specific organs and
2 tissues but not for others, such as erythrocytes. When erythropoietin is subjected to the above
3 reactions, it has been found that in general the resultant molecule lacks both *in-vivo* and *in-vitro*
4 erythropoietic activity (e.g., Satake et al; 1990, *Biochim. Biophys. Acta* **1038**:125-9). Some
5 examples of the preparation of modified erythropoietins are described below.

6

7 Biotinylation at free amino groups of erythropoietin. 0.2 mg D-biotinoyl-L-aminocaproic acid-
8 N-hydroxysuccinimide ester (Boehringer Mannheim #1418165) was dissolved in 100 ul DMSO.
9 This solution was combined with 400 ul PBS containing approximately 0.2 mg erythropoietin in
10 a foil covered tube. After incubation for 4 hours at room temperature, the unreacted biotin was
11 separated by gel filtration on a Centricon 10 column. As shown by Figure 10, this biotinylated
12 erythropoietin protects p19 cells from serum withdrawal.

13

14 In "Biotinylated recombinant human erythropoietins: Bioactivity and Utility as a receptor ligand"
15 by Wojchowski et al. Blood, 1989, 74(3):952-8, the authors use three different methods of
16 biotinylating erythropoietin. Biotin is added to (1) the sialic acid moieties (2) carboxylate groups
17 (3) amino groups. The authors use a mouse spleen cell proliferation assay to demonstrate that (1)
18 the addition of biotin to the sialic acid moieties does not inactivate the biological activity of
19 erythropoietin (2) the addition of biotin to carboxylate groups led to substantial biological
20 inactivation of erythropoietin (3) the addition of biotin to amino groups resulted in complete
21 biological inactivation of erythropoietin. These methods and modifications are fully embraced
22 herein. Figure 9 shows the activity of biotinylated erythropoietin and asialoerythropoietin in the
23 serum-starved P19 assay.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

1
2 Iodination of erythropoietin. Method 1 – Iodo Beads. One Iodo Bead (Pierce, Rockford, IL) was
3 incubated in 100 ul PBS (20mM sodium phosphate, 0.15M NaCl, pH7.5) containing 1 mCi free
4 Na^{125}I for 5 minutes. 100 ug erythropoietin in 100 ul PBS was then added to the mixture. After
5 a ten minute incubation period at room temperature, the reaction was stopped by removing the
6 200ul solution from the reaction vessel (leaving the iodo bead behind). The excess iodine was
7 removed by gel filtration on a Centricon 10 column. As shown in Figure 11, iodo-erythropoietin
8 produced in this manner is efficacious in protecting P19 cells from serum withdrawal.
9
10 Method 2 – Chloramine T. 100 ug erythropoietin in 100 ul PBS was added to 500 uCi Na^{125}I
11 were mixed together in an eppendorf tube. 25 ul chloramines T (2 mg/ml) was then added and
12 the mixture was incubated for 1 minute at room temperature. 50 ul of Chloramine T stop buffer
13 (2.4 mg/ml sodium metabisulfite, 10 mg/ml tyrosine, 10% glycerol, 0.1% xylene in PBS was
14 then added. The iodotyrosine and iodinated erythropoietin were then separated by gel filtration
15 on a Centricon 10 column.
16
17 Lysine modifications: Carbamylation: erythropoietin (100 ug) was modified with potassium
18 cyanate as described in Plapp et al (“Activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease A with
19 modified amino groups” 1971, J. Biol. Chem. 246, 939-845).
20
21 Trinitrophenylation: erythropoietin (100 ug) was modified with 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate as
22 described in Plapp et al (“Activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease A with modified
23 amino groups” 1971, J. Biol. Chem. 246, 939-845)

WO 02/053580

PCT/US01/49479

1
2 Acetylation: erythropoietin (100 ug) was incubated in 0.3M phosphate buffer (pH7.2) containing
3 an equal amount of acetic anhydride at 0 C for 1 hour. The reaction was stopped by dialysis
4 against distilled water.
5
6 Succinylation: erythropoietin (100 ug) in 0.5 M NaHCO₃ (pH 8.0) was incubated with a 15
7 molar excess of succinic anhydride at 15 C for 1 hour. The reaction was stopped by dialysis
8 against distilled water.
9
10 Arginine modifications: erythropoietin was modified with 2,3 butanedione as described in
11 Riordan ("Functional arginyl residues in carboxypeptidase A. Modification with butanedione"
12 Riordan JF, Biochemistry 1973, 12(20): 3915-3923).
13
14 Erythropoietin was modified with cyclohexanone as in Patthy et al ("Identification of functional
15 arginine residues in ribonuclease A and lysozyme" Patthy, L, Smith EL, J. Biol. Chem 1975
16 250(2): 565-9).
17
18 Erythropoietin was modified with phenylglyoxal as described in Werber et al. ("Proceedings:
19 Carboxypeptidase B: modification of functional arginyl residues" Werber, MM, Sokolovsky M
20 Isr J Med Sci 1975 11(11): 1169-70).
21
22 Tyrosine modifications: erythropoietin (100 ug) was incubated with tetranitromethane as
23 previously described in Nestler et al "Stimulation of rat ovarian cell steroidogenesis by high

WO 02/053580

PCT/US01/49479

1 density lipoproteins modified with tetranitromethane" Nestler JE, Chacko GK, Strauss JF 3rd. J
2 Biol Chem 1985 Jun 25;260(12):7316-21).
3
4 Glutamic acid (and aspartic acid) modifications: In order to modify carboxyl groups,
5 erythropoietin (100 ug) was incubated with 0.02 M EDC in 1M glycineamide at pH 4.5 at room
6 temperature for 60 minutes as described in Carraway et al "Carboxyl group modification in
7 chymotrypsin and chymotrypsinogen." Carraway KL, Spoerl P, Koshland DE Jr. J Mol Biol
8 1969 May 28;42(1):133-7.
9
10 Tryptophan residue modifications: erythropoietin (100 ug) was incubated with 20 uM n-
11 bromosuccinimide in 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) at room temperature as
12 described in Ali et al., J Biol Chem. 1995 Mar 3;270(9):4570-4. The number of oxidized
13 tryptophan residues was determined by the method described in Korotchkina (Korotchkina, LG
14 et al Protein Expr Purif. 1995 Feb;6(1):79-90).
15
16 Removal of amino groups: In order to remove amino groups of erythropoietin (100 ug) was
17 incubated with in PBS (pH 7.4) containing 20mM ninhydrin (Pierce Chemical, Rockford, IL), at
18 37 C for two hours as in Kokkini et al (Kokkini, G., et al "Modification of hemoglobin by
19 ninhydrin" Blood, Vol. 556, No 4 1980: 701-705). Reduction of the resulting aldehyde was
20 accomplished by reacting the product with Sodium borohydride or lithium aluminum hydride.
21 Specifically, erythropoietin (100 ug) was incubated with 0.1M sodium borohydride in PBS for 30
22 minutes at room temperature. The reduction was terminated by cooling the samples on ice for 10
23 minutes and dialyzing it against PBS, three times, overnight. (Kokkini, G., Blood, Vol. 556, No

WO 02/053580

PCT/US01/49479

1 4 1980: 701-705). Reduction using lithium aluminum hydride was accomplished by incubating
2 erythropoietin (100 ug) with 0.1M lithium aluminum hydride in PBS for 30 minutes at room
3 temperature. The reduction was terminated by cooling the samples on ice for 10 minutes and
4 dialyzing it against PBS, three times, overnight.

5

6 Disulfide reduction and stabilization: erythropoietin (100 ug) was incubated with 500 mM DTT
7 for 15 minutes at 60 C. 20 mM iodoacetamide in water was then added to the mixture and
8 incubated for 25 minutes, at room temperature in the dark.

9

10 Limited proteolysis: Erythropoietin can be subjected to a limited chemical proteolysis that targets
11 specific residues. Erythropoietin was reacted with 2-(2-nitrophenylsulfenyl)-3-methyl-3'-
12 bromoindolenine which cleaves specifically after tryptophan residues in a 50 times excess in
13 50% acetic acid for 48 hours in the dark at room temperature in tubes capped under nitrogen
14 pressure. The reaction was terminated by quenching with tryptophan and desalting.

15

16

Example 6

17 PROTECTION OF RETINAL ISCHEMIA BY PERIPHERALLY-ADMINISTERED

18

ERYTHROPOIETIN.

19

20 Retinal cells are very sensitive to ischemia such that many will die after 30 minutes of ischemic
21 stress. Further, subacute or chronic ischemia underlies the deterioration of vision which
22 accompanies a number of common human diseases, such as diabetes mellitus, glaucoma, and
23 macular degeneration. At the present time there are no effective therapies to protect cells from

WO 02/053580

PCT/US01/49479

1 ischemia. A tight endothelial barrier exists between the blood and the retina that excludes most
2 large molecules. To test whether peripherally-administered erythropoietin will protect cells
3 sensitive to ischemia, an acute, reversible glaucoma rat model was utilized as described by
4 Rosenbaum et al. (1997; *Vis. Res.* 37:3443-51). Specifically, saline was injected into the anterior
5 chamber of the eye of adult male rats to a pressure above systemic arterial pressure and
6 maintained for 60 minutes. Animals were administered saline or 5000 U erythropoietin/kg body
7 weight intraperitoneally 24 hours before the induction of ischemia, and continued as a daily dose
8 for 3 additional days. Electroretinography was performed on dark-adapted rats 1 week after
9 treatment. **Figure 11-12** illustrate that the administration of erythropoietin is associated with
10 good preservation of the electroretinogram (ERG) (Panel D), in contrast to animals treated with
11 saline alone (Panel C), for which very little function remained. **Figure 11** compares the
12 electroretinogram a- and b-wave amplitudes for the erythropoietin-treated and saline-treated
13 groups, and shows significant protection afforded by erythropoietin.

15 EXAMPLE 7

16 RESTORATIVE EFFECTS OF ERYTHROPOIETIN ON DIMINISHED COGNITIVE 17 FUNCTION ARISING FROM BRAIN INJURY

18
19 In a study to demonstrate the ability of erythropoietin to restore diminished cognitive function in
20 mice after receiving brain trauma, female Balb/c mice were subject to blunt brain trauma as
21 described in Brines et al. PNAS 2000, 97; 10295-10672 and five days later, daily erythropoietin
22 administration of 5000 U/kg-bw intraperitoneally was begun. Twelve days after injury, animals
23 were tested for cognitive function in the Morris water maze, with four trials per day. While both

WO 02/053580

PCT/US01/49479

1 treated and untreated animals performed poorly in the test (with swim times of about 80 seconds
2 out of a possible 90 seconds), **Figure 13** shows that the erythropoietin-treated animals performed
3 better (in this presentation, a negative value is better). Even if the initiation of erythropoietin
4 treatment is delayed until 30 days after trauma (**Figure 14**), restoration of cognitive function is
5 also seen.

7 **Example 8**

8 **KAINATE MODEL**

9
10 In the kainate neurotoxicity model, asialoerythropoietin was administered according to the
11 protocol of Brines et al. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 2000, 97; 10295-10672 at a dose of
12 5000U/kg-bw given intraperitoneally 24 hours before the administration of 25 mg/kg kainate is
13 shown to be as effective as erythropoietin, as shown by time to death (**Figure 15**).

14
15
16 The invention is not to be limited in scope by the specific embodiments described which are
17 intended as single illustrations of individual aspects of the invention, and functionally equivalent
18 methods and components are within the scope of the invention. Indeed various modifications of
19 the invention, in addition to those shown and described herein will become apparent to those
20 skilled in the art from the foregoing description and accompanying drawings. Such
21 modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

22
23 All references cited herein are incorporated by reference herein in their entireties for all purposes.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

1 WHAT IS CLAIMED IS:

2

3 1. Use of an erythropoietin selected from the group consisting of

- 4 i) an erythropoietin having at least no sialic acid moieties;
- 5 ii) an erythropoietin having at least no N-linked or no O-linked
- 6 carbohydrates;
- 7 iii) an erythropoietin having at least a reduced carbohydrate content by virtue
- 8 of treatment of native erythropoietin with at least one glycosidase;
- 9 iv) an erythropoietin with a carbohydrate portion of the erythropoietin
- 10 molecule having at least a non-mammalian glycosylation pattern by virtue
- 11 of the expression of a recombinant erythropoietin in non-mammalian cells;
- 12 v) an erythropoietin has at least one or more oxidized carbohydrates which
- 13 also may be chemically reduced;
- 14 vi) an erythropoietin having at least one or more modified arginine residues;
- 15 vii) an erythropoietin having at least one or more modified lysine residues or a
- 16 modification of the N-terminal amino group of the erythropoietin molecule
- 17 viii) an erythropoietin having at least a modified tyrosine residue;
- 18 ix) an erythropoietin having at least a modified aspartic acid or a glutamic
- 19 acid residue;
- 20 x) an erythropoietin having at least a modified tryptophan residue;
- 21 xi) an erythropoietin having at least one amino group removed;
- 22 xii) an erythropoietin having at least an opening of at least one of the cystine
- 23 linkages in the erythropoietin molecule;

WO 02/053580

PCT/US01/49479

- 1 xiii) an erythropoietin is provided having at least one substitution of at least
2 one amino acid; and
3 xiv) a truncated erythropoietin;
4 for the preparation of a pharmaceutical composition for protecting, maintaining, enhancing or
5 restoring the function or viability of erythropoietin-responsive mammalian cells and their
6 associated cells, tissues and organs.
7
8 2. The use of claim 1 wherein said erythropoietin is asialoerythropoietin.
9
10 3. The use of claim 2 wherein said asialoerythropoietin is human asialoerythropoietin.
11
12 4. The use of claim 1 wherein said erythropoietin has no N-linked carbohydrates.
13
14 5. The use of claim 1 wherein said erythropoietin has no O-linked carbohydrate.
15
16 6. The use of claim 1 wherein said erythropoietin is treated with at least one glycosidase.
17
18 7. The use of claim 1 wherein said erythropoietin is expressed in an insect or plant cell.
19
20 8. The use of claim 1 wherein said erythropoietin is periodate-oxidized erythropoietin.
21
22 9. The use of claim 8 wherein said periodate-oxidized erythropoietin is chemically
23 reduced with sodium cyanoborohydride.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

- 1
- 2 10. The use of claim 1 wherein said erythropoietin comprises a R-glyoxal moiety on the
- 3 one or more arginine residues, wherein R is aryl or alkyl moiety.
- 4
- 5 11. The use of claim 10 wherein said erythropoietin is phenylglyoxal-erythropoietin.
- 6
- 7 12. The use of claim 1 wherein an arginine residue of said erythropoietin is modified by
- 8 reaction with a vicinal diketone selected from the group consisting of 2,3-butanedione
- 9 and cyclohexanedione.
- 10
- 11 13. The use of claim 1 wherein an arginine residue of said erythropoietin is reacted with
- 12 3-deoxyglucosone.
- 13
- 14 14. The use of claim 1 wherein said erythropoietin molecule has at least one biotinylated
- 15 lysine or N-terminal amino group.
- 16
- 17 15. The use of claim 14 wherein said erythropoietin molecule is biotinylated
- 18 erythropoietin.
- 19
- 20 16. The use of claim 1 wherein said erythropoietin is glucitolyl lysine erythropoietin or
- 21 fructosyl lysine erythropoietin .
- 22
- 23 17. The use of claim 1 wherein a lysine residue of said erythropoietin is carbamylated.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

- 1
- 2 18. The use of claim 1 wherein a lysine residue of said erythropoietin is acylated.
- 3
- 4 19. The use of claim 18 wherein a lysine residue of said erythropoietin is acetylated.
- 5
- 6 20. The use of claim 18 wherein a lysine residue of said erythropoietin is succinylated.
- 7
- 8 21. The use of claim 1 wherein a lysine residue of said erythropoietin is modified by 2,4,6
- 9 trinitrobenzenesulfonate sodium or another salt thereof.
- 10
- 11 22. The use of claim 1 wherein a tyrosine residue of said erythropoietin is nitrated or
- 12 iodinated.
- 13
- 14 23. The use of claim 1 wherein an aspartic acid or glutamic acid residue of said
- 15 erythropoietin is reacted with a carbodiimide followed by reaction with an amine.
- 16
- 17 24. The use of claim 21 wherein said amine is glycinamide.
- 18
- 19 25. The use of claim 1 wherein erythropoietin-responsive cell or tissue is neuronal, retinal,
- 20 muscle, heart, lung, liver, kidney, small intestine, adrenal cortex, adrenal medulla,
- 21 capillary endothelial, testes, ovary, or endometrial cells or tissue.
- 22
- 23

WO 02/053580

PCT/US01/49479

- 1 26. A pharmaceutical composition comprising an effective erythropoietin-responsive cell
2 protecting, maintaining, enhancing, or restoring amount of an erythropoietin selected
3 from the group consisting of
- 4 i) an erythropoietin having at least no sialic acid moieties;
 - 5 ii) an erythropoietin having at least no N-linked or no O-linked
6 carbohydrates;
 - 7 iii) an erythropoietin having at least a reduced carbohydrate content by virtue
8 of treatment of native erythropoietin with at least one glycosidase;
 - 9 iv) an erythropoietin with a carbohydrate portion of the erythropoietin
10 molecule having at least a non-mammalian glycosylation pattern by virtue
11 of the expression of a recombinant erythropoietin in non-mammalian cells;
 - 12 v) an erythropoietin has at least one or more oxidized carbohydrates which
13 also may be chemically reduced;
 - 14 vi) an erythropoietin having at least one or more modified arginine residues;
 - 15 vii) an erythropoietin having at least one or more modified lysine residues or a
16 modification of the N-terminal amino group of the erythropoietin
17 molecule;
 - 18 viii) an erythropoietin having at least a modified tyrosine residue;
 - 19 ix) an erythropoietin having at least a modified aspartic acid or a glutamic
20 acid residue;
 - 21 x) an erythropoietin having at least a modified tryptophan residue;
 - 22 xi) an erythropoietin having at least one amino group removed;
 - 23 xii) an erythropoietin having at least an opening of at least one of the cystine

WO 02/053580

PCT/US01/49479

- 1 linkages in the erythropoietin molecule;
- 2 xiii) an erythropoietin is provided having at least one substitution of at least
- 3 one amino acid; and
- 4 xiv) a truncated erythropoietin.
- 5
- 6 27. The pharmaceutical composition of claim 26 wherein said erythropoietin is
- 7 asialoerythropoietin or phenylglyoxal-erythropoietin.
- 8
- 9 28. Use of an erythropoietin for the preparation of a pharmaceutical composition for
- 10 protecting, maintaining, enhancing or restoring the function or viability of an
- 11 erythropoietin-responsive cell or its associated cells, tissues, or organs, wherein said cells,
- 12 cells, tissues, or organs are not excitable cells, tissues, or organs, or do not predominantly
- 13 comprise excitable cells or tissues.
- 14
- 15 29. The use of claim 28 wherein said erythropoietin is an erythropoietin or native
- 16 erythropoietin, or an erythropoietin analog, an erythropoietin mimetic, and erythropoietin
- 17 fragment, a hybrid erythropoietin molecule, an erythropoietin-receptor-binding molecule,
- 18 an erythropoietin agonist, a renal erythropoietin, a brain erythropoietin, an oligomer
- 19 thereof, a multimer thereof, a mutein thereof, a congener thereof, a naturally-occurring
- 20 form thereof, a synthetic form thereof, a recombinant form thereof, a glycosylation
- 21 variant thereof, a deglycosylated variant thereof, or a combination thereof.
- 22
- 23 30. The use of claim 28 wherein said erythropoietin is phenylglyoxal-erythropoietin.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

1

2

3 31. A method for protecting, maintaining or enhancing the viability of a cell, tissue or
4 organ isolated from a mammalian body comprising exposing said cell, tissue or organ to a
5 pharmaceutical composition comprising an erythropoietin.

6

7 32. The method of claim 31 wherein said erythropoietin is an erythropoietin or native
8 erythropoietin, or an erythropoietin analog, an erythropoietin mimetic, and erythropoietin
9 fragment, a hybrid erythropoietin molecule, an erythropoietin-receptor-binding molecule,
10 an erythropoietin agonist, a renal erythropoietin, a brain erythropoietin, an oligomer
11 thereof, a multimer thereof, a mutein thereof, a congener thereof, a naturally-occurring
12 form thereof, a synthetic form thereof, a recombinant form thereof, a glycosylation
13 variant thereof, a deglycosylated variant thereof, or a combination thereof.

14

15 33. The method of claim 32 wherein said erythropoietin is

- 16 i) an erythropoietin having at least no sialic acid moieties;
17 ii) an erythropoietin having at least no N-linked or no O-linked
18 carbohydrates;
19 iii) an erythropoietin having at least a reduced carbohydrate content by virtue
20 of treatment of native erythropoietin with at least one glycosidase;
21 iv) an erythropoietin with a carbohydrate portion of the erythropoietin
22 molecule having at least a non-mammalian glycosylation pattern by virtue
23 of the expression of a recombinant erythropoietin in non-mammalian cells;

WO 02/053580

PCT/US01/49479

- 1 v) an erythropoietin has at least one or more oxidized carbohydrates which
- 2 also may be chemically reduced;
- 3 vi) an erythropoietin having at least one or more modified arginine residues;
- 4 vii) an erythropoietin having at least one or more modified lysine residues or a
- 5 modification of the N-terminal amino group of the erythropoietin molecule
- 6 viii) an erythropoietin having at least a modified tyrosine residue;
- 7 ix) an erythropoietin having at least a modified aspartic acid or a glutamic
- 8 acid residue;
- 9 x) an erythropoietin having at least a modified tryptophan residue;
- 10 xi) an erythropoietin having at least one amino group removed;
- 11 xii) an erythropoietin having at least an opening of at least one of the cystine
- 12 linkages in the erythropoietin molecule;
- 13 xiii) an erythropoietin is provided having at least one substitution of at least
- 14 one amino acid; or
- 15 xiv) a truncated erythropoietin.
- 16
- 17 34. The method of claim 31 wherein said erythropoietin is human erythropoietin.
- 18
- 19 35. The method of claim 31 wherein said erythropoietin is phenylglyoxal-erythropoietin.
- 20
- 21 36. Use of an erythropoietin selected from the group consisting of an erythropoietin or
- 22 native erythropoietin, or an erythropoietin analog, an erythropoietin mimetic, and
- 23 erythropoietin fragment, a hybrid erythropoietin molecule, an erythropoietin-receptor-

WO 02/053580

PCT/US01/49479

1 binding molecule, an erythropoietin agonist, a renal erythropoietin, a brain erythropoietin,
2 an oligomer thereof, a multimer thereof, a mutein thereof, a congener thereof, a naturally-
3 occurring form thereof, a synthetic form thereof, a recombinant form thereof, a
4 glycosylation variant thereof, a deglycosylated variant thereof, or a combination thereof
5 for the preparation of a pharmaceutical composition for the restoration of cognitive
6 dysfunction in a mammal.

7

8 37. The use of claim 36 wherein the cognitive dysfunction is the result of injury caused by
9 a seizure disorder, multiple sclerosis, stroke, hypotension, cardiac arrest, ischemia,
10 myocardial infarction, inflammation, age-related loss of cognitive function, radiation
11 damage, cerebral palsy, neurodegenerative disease, Alzheimer's disease, Parkinson's
12 disease, Leigh disease, AIDS dementia, memory loss, amyotrophic lateral sclerosis,
13 alcoholism, mood disorder, anxiety disorder, attention deficit disorder, autism,
14 Creutzfeld-Jakob disease, brain or spinal cord trauma or ischemia, heart-lung bypass,
15 chronic heart failure, macular degeneration, diabetic neuropathy, diabetic retinopathy,
16 glaucoma, retinal ischemia, or retinal trauma.

17

18 38. The use of claim 36 wherein said erythropoietin is phenylglyoxal-erythropoietin.

19

20 39. The use of claim 36 wherein said erythropoietin is

- 21 i) an erythropoietin having at least no sialic acid moieties;
22 ii) an erythropoietin having at least no N-linked or no O-linked
23 carbohydrates;

WO 02/053580

PCT/US01/49479

- 1 iii) an erythropoietin having at least a reduced carbohydrate content by virtue
- 2 of treatment of native erythropoietin with at least one glycosidase;
- 3 iv) an erythropoietin with a carbohydrate portion of the erythropoietin
- 4 molecule having at least a non-mammalian glycosylation pattern by virtue
- 5 of the expression of a recombinant erythropoietin in non-mammalian cells;
- 6 v) an erythropoietin has at least one or more oxidized carbohydrates which
- 7 also may be chemically reduced;
- 8 vi) an erythropoietin having at least one or more modified arginine residues;
- 9 vii) an erythropoietin having at least one or more modified lysine residues or a
- 10 modification of the N-terminal amino group of the erythropoietin
- 11 molecule;
- 12 viii) an erythropoietin having at least a modified tyrosine residue;
- 13 ix) an erythropoietin having at least a modified aspartic acid or a glutamic
- 14 acid residue;
- 15 x) an erythropoietin having at least a modified tryptophan residue;
- 16 xi) an erythropoietin having at least one amino group removed;
- 17 xii) an erythropoietin having at least an opening of at least one of the cystine
- 18 linkages in the erythropoietin molecule;
- 19 xiii) an erythropoietin is provided having at least one substitution of at least
- 20 one amino acid; or
- 21 xiv) a truncated erythropoietin.

22

23 40. A method for facilitating the transcytosis of a molecule across an endothelial cell

WO 02/053580

PCT/US01/49479

- 1 barrier in a mammal comprising administration to said mammal a composition
2 comprising said molecule in association with an erythropoietin selected from the group
3 consisting of
- 4 i) an erythropoietin having at least no sialic acid moieties;
 - 5 ii) an erythropoietin having at least no N-linked or no O-linked
6 carbohydrates;
 - 7 iii) an erythropoietin having at least a reduced carbohydrate content by virtue
8 of treatment of native erythropoietin with at least one glycosidase;
 - 9 iv) an erythropoietin with a carbohydrate portion of the erythropoietin
10 molecule having at least a non-mammalian glycosylation pattern by virtue
11 of the expression of a recombinant erythropoietin in non-mammalian cells;
 - 12 v) an erythropoietin has at least one or more oxidized carbohydrates which
13 also may be chemically reduced;
 - 14 vi) an erythropoietin having at least one or more modified arginine residues;
 - 15 vii) an erythropoietin having at least one or more modified lysine residues or a
16 modification of the N-terminal amino group of the erythropoietin
17 molecule;
 - 18 viii) an erythropoietin having at least a modified tyrosine residue;
 - 19 ix) an erythropoietin having at least a modified aspartic acid or a glutamic
20 acid residue;
 - 21 x) an erythropoietin having at least a modified tryptophan residue;
 - 22 xi) an erythropoietin having at least one amino group removed;
 - 23 xii) an erythropoietin having at least an opening of at least one of the cystine

WO 02/053580

PCT/US01/49479

- 1 linkages in the erythropoietin molecule;
- 2 xiii) an erythropoietin is provided having at least one substitution of at least
- 3 one amino acid; and
- 4 xiv) a truncated erythropoietin.
- 5
- 6 41. The method of claim 40 wherein said association is a labile covalent bond, a stable
- 7 covalent bond, or a non-covalent association with a binding site for said molecule.
- 8
- 9 42. The method of claim 40 wherein said endothelial cell barrier is selected from the
- 10 group consisting of the blood-brain barrier, the blood-eye barrier, the blood-testes barrier,
- 11 the blood-ovary barrier and the blood-placenta barrier.
- 12
- 13 43. The method of claim 40 wherein said molecule is a receptor agonist or antagonist
- 14 hormone, a neurotrophic factor, an antimicrobial agent, a radiopharmaceutical, an
- 15 antisense oligonucleotide, an antibody, an immunosuppressant or an anti-cancer drug.
- 16
- 17 44. A composition for transporting a molecule via transcytosis across an endothelial cell
- 18 barrier comprising said molecule in association with an erythropoietin selected from the
- 19 group consisting of
- 20 i) an erythropoietin having at least no sialic acid moieties;
- 21 ii) an erythropoietin having at least no N-linked or no O-linked
- 22 carbohydrates;
- 23 iii) an erythropoietin having at least a reduced carbohydrate content by virtue

WO 02/053580

PCT/US01/49479

- 1 of treatment of native erythropoietin with at least one glycosidase;
- 2 iv) an erythropoietin with a carbohydrate portion of the erythropoietin
- 3 molecule having at least a non-mammalian glycosylation pattern by virtue
- 4 of the expression of a recombinant erythropoietin in non-mammalian cells;
- 5 v) an erythropoietin has at least one or more oxidized carbohydrates which
- 6 also may be chemically reduced;
- 7 vi) an erythropoietin having at least one or more modified arginine residues;
- 8 vii) an erythropoietin having at least one or more modified lysine residues or a
- 9 modification of the N-terminal amino group of the erythropoietin
- 10 molecule;
- 11 viii) an erythropoietin having at least a modified tyrosine residue;
- 12 ix) an erythropoietin having at least a modified aspartic acid or a glutamic
- 13 acid residue;
- 14 x) an erythropoietin having at least a modified tryptophan residue;
- 15 xi) an erythropoietin having at least one amino group removed;
- 16 xii) an erythropoietin having at least an opening of at least one of the cystine
- 17 linkages in the erythropoietin molecule;
- 18 xiii) an erythropoietin is provided having at least one substitution of at least
- 19 one amino acid; and
- 20 xiv) a truncated erythropoietin.

21

- 22 45. The composition of claim 44 wherein said association is a labile covalent bond, a
- 23 stable covalent bond, or a non-covalent association with a binding site for said molecule.

WO 02/053580

PCT/US01/49479

1

2 46. The composition of claim 44 wherein said molecule is a receptor agonist or antagonist
3 hormone, a neurotrophic factor, an antimicrobial agent, a radiopharmaceutical, an
4 antisense oligonucleotide, an antibody, an immunosuppressant or an anti-cancer drug.

5

6 47. Use of an erythropoietin selected from the group consisting of

- 7 i) an erythropoietin having at least no sialic acid moieties;
8 ii) an erythropoietin having at least no N-linked or no O-linked
9 carbohydrates;
10 iii) an erythropoietin having at least a reduced carbohydrate content by virtue
11 of treatment of native erythropoietin with at least one glycosidase;
12 iv) an erythropoietin with a carbohydrate portion of the erythropoietin
13 molecule having at least a non-mammalian glycosylation pattern by virtue
14 of the expression of a recombinant erythropoietin in non-mammalian cells;
15 v) an erythropoietin has at least one or more oxidized carbohydrates which
16 also may be chemically reduced;
17 vi) an erythropoietin having at least one or more modified arginine residues;
18 vii) an erythropoietin having at least one or more modified lysine residues or a
19 modification of the N-terminal amino group of the erythropoietin
20 molecule;
21 viii) an erythropoietin having at least a modified tyrosine residue;
22 ix) an erythropoietin having at least a modified aspartic acid or a glutamic
23 acid residue;

WO 02/053580

PCT/US01/49479

- 1 x) an erythropoietin having at least a modified tryptophan residue;
- 2 xi) an erythropoietin having at least one amino group removed;
- 3 xii) an erythropoietin having at least an opening of at least one of the cystine
- 4 linkages in the erythropoietin molecule;
- 5 xiii) an erythropoietin is provided having at least one substitution of at least
- 6 one amino acid; and a truncated erythropoietin
- 7 associated with a molecule for the preparation of a pharmaceutical composition for transporting
- 8 said molecule via transcytosis across an endothelial cell barrier.
- 9
- 10 48. The use of claim 47 wherein said association is a labile covalent bond, a stable
- 11 covalent bond, or a non-covalent association with a binding site for said molecule.
- 12
- 13 49. The use of claim 47 wherein said molecule is a receptor agonist or antagonist
- 14 hormone, a neurotrophic factor, an antimicrobial agent, a radiopharmaceutical, an
- 15 antisense oligonucleotide, an antibody, an immunosuppressant or an anti-cancer drug.
- 16
- 17 50. A composition comprising periodate-oxidized erythropoietin.
- 18
- 19 51. A composition comprising glucitolyl lysine erythropoietin.
- 20
- 21 52. A composition comprising fructosyl lysine erythropoietin.
- 22
- 23 53. A composition comprising 3-Deoxyglucosone erythropoietin.

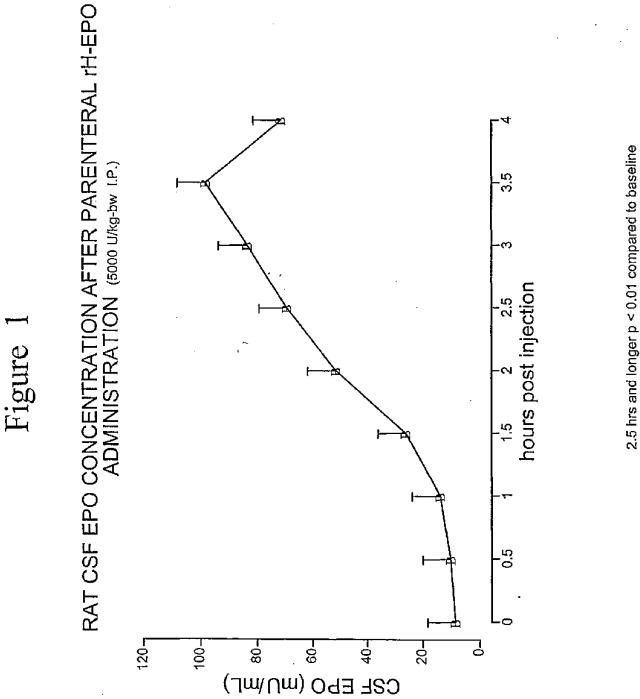
WO 02/053580

PCT/US01/49479

- 1
- 2 54. A composition comprising carbamylated asialoerythropoietin.
- 3
- 4 55. A composition comprising biotinylated asialoerythropoietin.
- 5
- 6 56. A composition comprising succinylated asialoerythropoietin.
- 7
- 8 57. A composition comprising acetylated asialoerythropoietin.
- 9
- 10
- 11

WO 02/053580

PCT/US01/49479



WO 02/053580

PCT/US01/49479

Figure 2

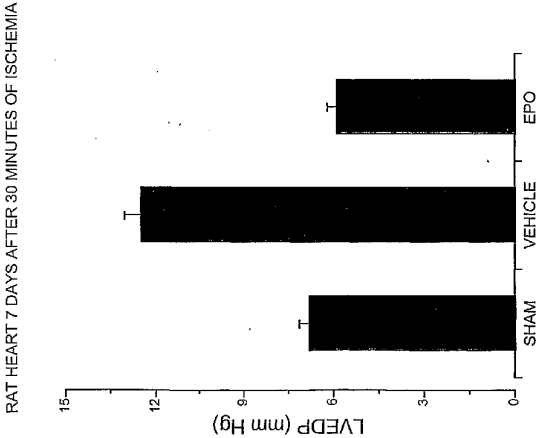
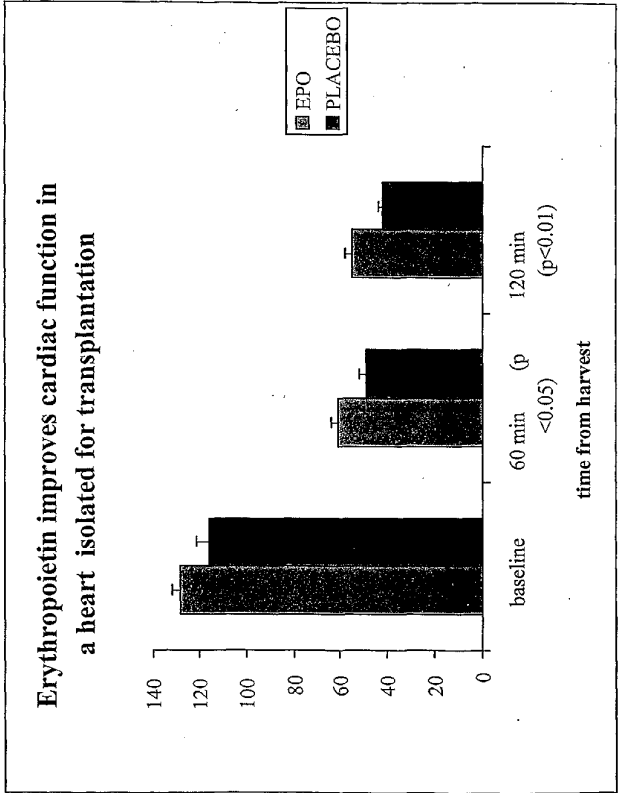
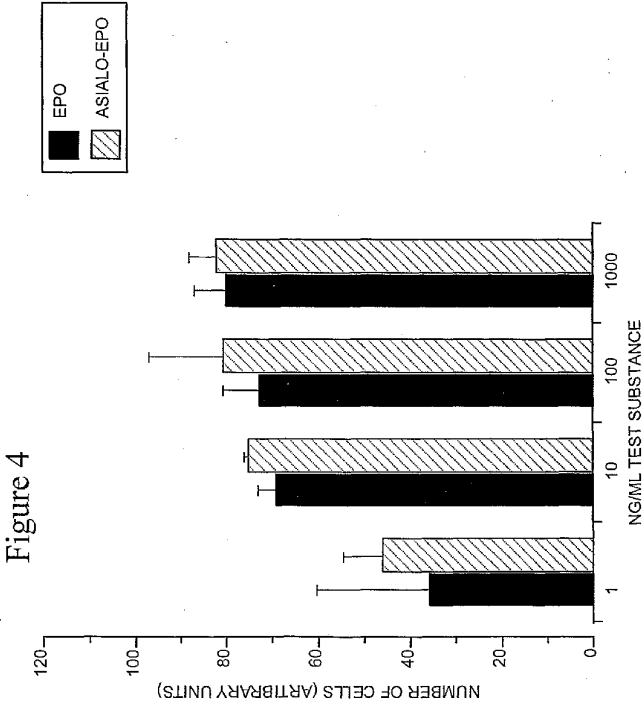


Figure 3



WO 02/053580

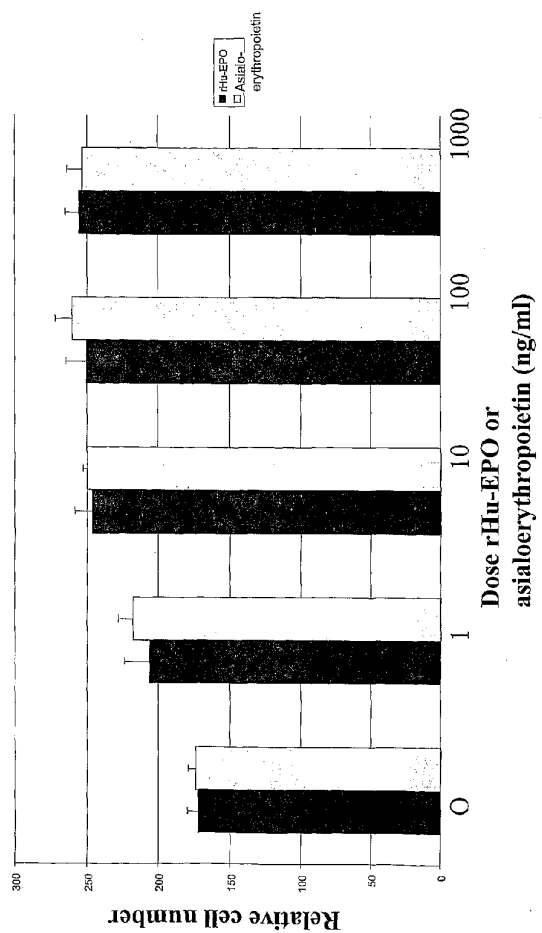
PCT/US01/49479



WO 02/053580

PCT/US01/49479

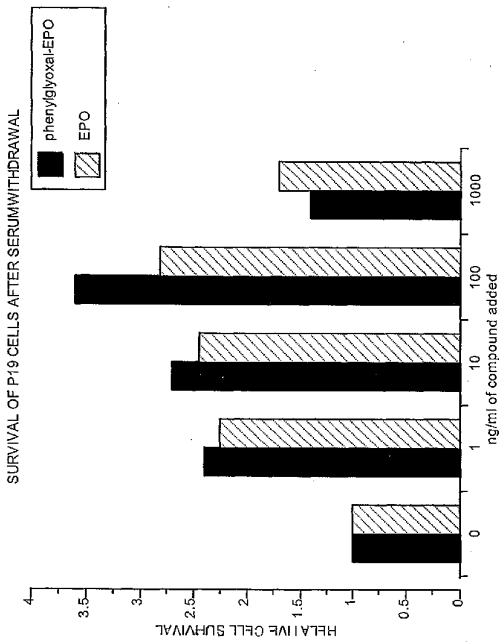
Figure 5



WO 02/053580

PCT/US01/49479

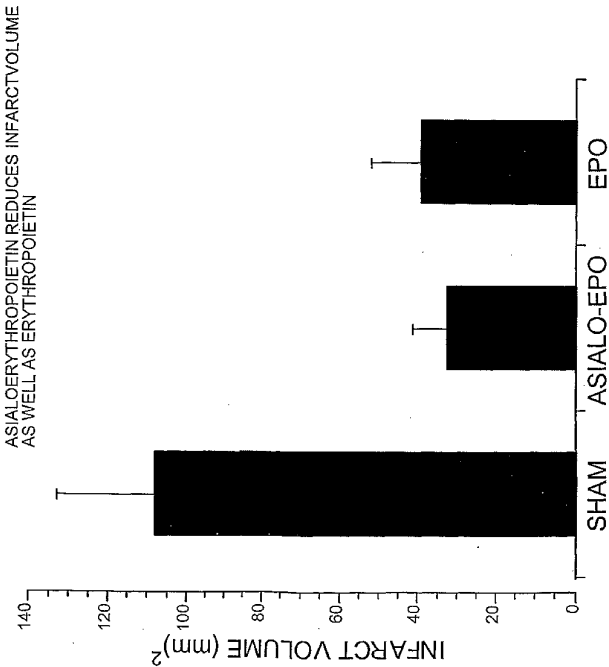
Figure 6



WO 02/053580

PCT/US01/49479

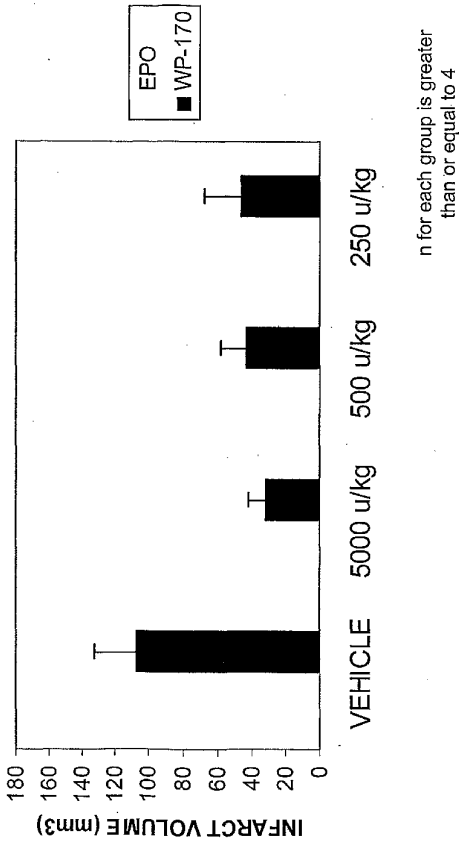
Figure 7



WO 02/053580

PCT/US01/49479

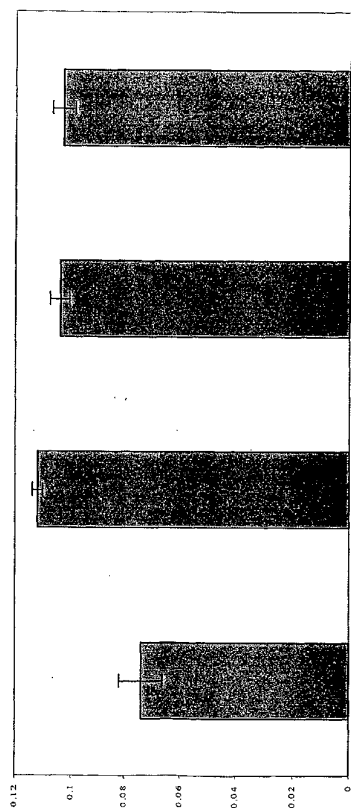
Figure 8
asialoerythropoietin
(dose response)



WO 02/053580

PCT/US01/49479

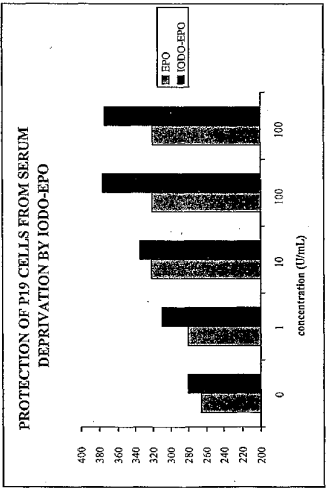
Figure 9
Biotinylated-EPO and Asialo-EPO retain
activity in P19 assay



WO 02/053580

PCT/US01/49479

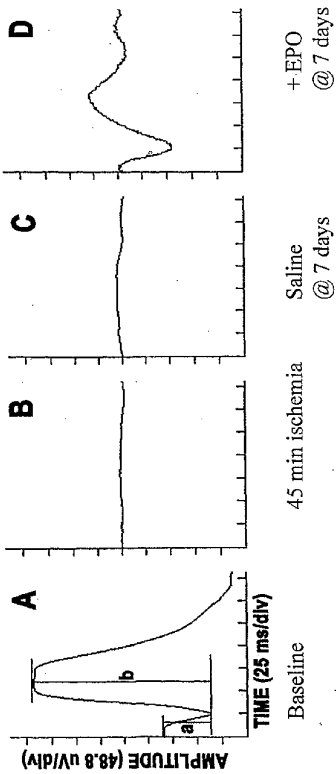
Figure 10



WO 02/053580

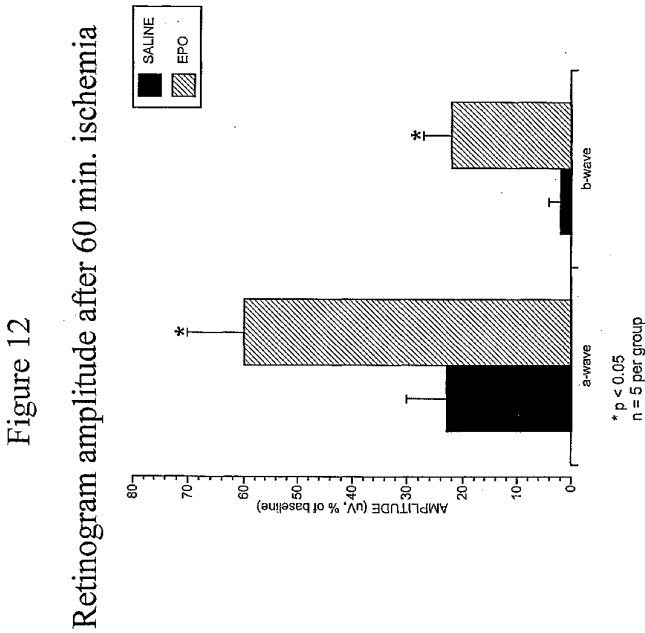
PCT/US01/49479

Figure 11
Electroretinograms from rats subjected to 60 minutes of ischemia



WO 02/053580

PCT/US01/49479

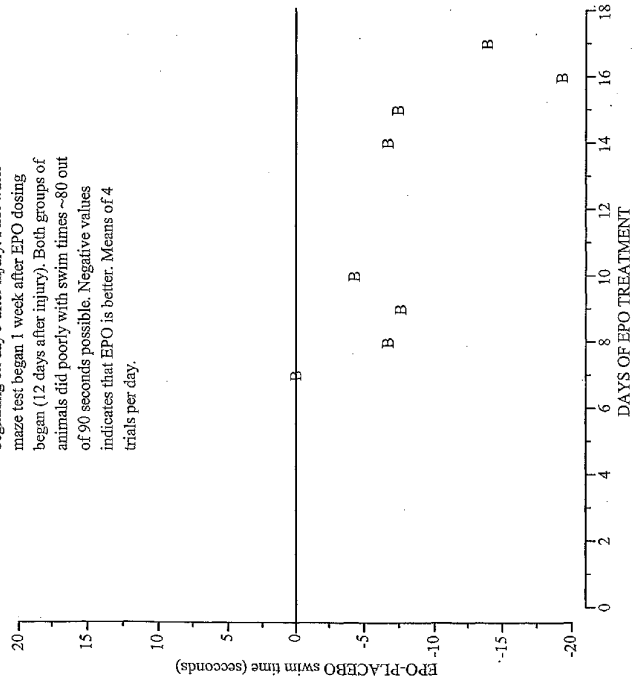


WO 02/053580

PCT/US01/49479

Figure 13

Morris water maze; female Balb/c mice n=16. Blunt brain trauma with EPO rx beginning on day 5 after injury. First water maze test began 1 week after EPO dosing began (12 days after injury). Both groups of animals did poorly with swim times ~80 out of 90 seconds possible. Negative values indicates that EPO is better. Means of 4 trials per day.

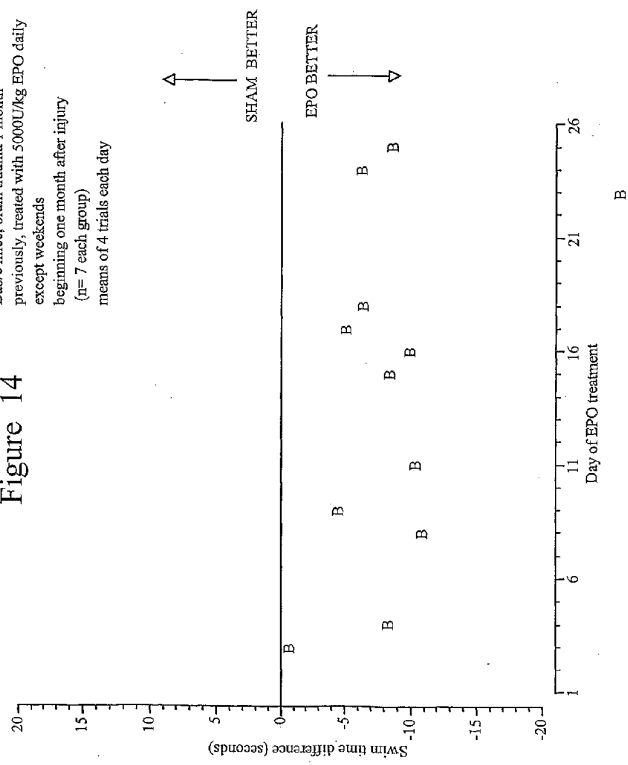


WO 02/053580

PCT/US01/49479

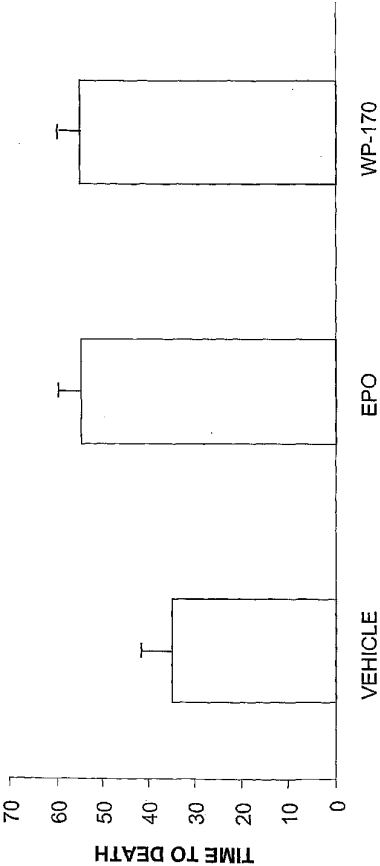
Difference in swimming time to platform in Morris water maze.
 Balb/c mice, brain trauma 1 month previously, treated with 5000U/kg EPO daily except weekends beginning one month after injury (n= 7 each group) means of 4 trials each day

Figure 14



Kainate model

Figure 15



【国際公開パンフレット（コレクション）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
11 July 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2002/053580 A3

- (51) International Patent Classification: **C07K 14/00**, 14/505
- (21) International Application Number: PCT/US2001/049479
- (22) International Filing Date: 28 December 2001 (28.12.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
09/753,132 29 December 2000 (29.12.2000) US
60/259,245 29 December 2000 (29.12.2000) US
- (71) Applicant: THE KENNETH S. WARREN INSTITUTE, INC. [US/US]; 712 Kitchawan Road, Ossining, NY 10562 (US).
- (72) Inventors: BRINES, Michael; 1 Wepawang Road, Woodbridge, CT 06525 (US). CERAMI, Anthony; 170 Mercer Street, New York, NY 10012 (US). CERAMI, Carla; 121 Farrington Avenue, Sleepy Hollow, NY 10591 (US).
- (74) Agents: CORUZZI, Laura, A. et al.; Pennie & Edmonds LLP, 1155 Avenue of the Americas, New York, NY 10036 (US).
- (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 12 February 2004
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

(54) Title: PROTECTION, RESTORATION, AND ENHANCEMENT OF ERYTHROPOIETIN-RESPONSIVE CELLS, TISSUES AND ORGANS

(57) Abstract: Methods and compositions are provided for protecting or enhancing an erythropoietin-responsive cell, tissue, organ or body part function or viability in vivo, in situ or ex vivo in mammals, including human beings, by systemic or local administration of an erythropoietin receptor activity modulator, such as an erythropoietin or a modified erythropoietin.

WO 2002/053580 A3

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/49479												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07K 14/00, 14/505 US CL : 530/350, 351, 397 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 5,955,432 A (LIN) 21 September 1999 (21.09.1999), abstract; column 10, lines 10-37; column 11, lines 1-5 and lines 24-34; column 12, lines 12-19 and column 36, lines 40-49.</td> <td>1-7, 14, 15, 25-29, 31-34, 36, 37, 39-49</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 5,767,078 A (JOHNSON et al.) 16 June 1998 (16.06.1998), abstract; column 2, line 44; column 4, line 22 and column 19, lines 25-30.</td> <td>18</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 5,625,035 A (CLEMONS) 29 April 1997 (29.04.1997) abstract; column 14, line 56; column 15, line 28.</td> <td>22</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 5,955,432 A (LIN) 21 September 1999 (21.09.1999), abstract; column 10, lines 10-37; column 11, lines 1-5 and lines 24-34; column 12, lines 12-19 and column 36, lines 40-49.	1-7, 14, 15, 25-29, 31-34, 36, 37, 39-49	X	US 5,767,078 A (JOHNSON et al.) 16 June 1998 (16.06.1998), abstract; column 2, line 44; column 4, line 22 and column 19, lines 25-30.	18	X	US 5,625,035 A (CLEMONS) 29 April 1997 (29.04.1997) abstract; column 14, line 56; column 15, line 28.	22
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	US 5,955,432 A (LIN) 21 September 1999 (21.09.1999), abstract; column 10, lines 10-37; column 11, lines 1-5 and lines 24-34; column 12, lines 12-19 and column 36, lines 40-49.	1-7, 14, 15, 25-29, 31-34, 36, 37, 39-49												
X	US 5,767,078 A (JOHNSON et al.) 16 June 1998 (16.06.1998), abstract; column 2, line 44; column 4, line 22 and column 19, lines 25-30.	18												
X	US 5,625,035 A (CLEMONS) 29 April 1997 (29.04.1997) abstract; column 14, line 56; column 15, line 28.	22												
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance. "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, each combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family														
Date of the actual completion of the international search 30 October 2003 (30.10.2003)		Date of mailing of the international search report 26 NOV 2003												
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 308-3230		Authorized officer <i>Valerie Bell Harris for</i> Regina M. DeBerry Telephone No. (703) 308-0196												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US01/49479

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST, keywords, erythropoietin, ssialo, periodate-oxidized, carbohydrate, phenylglyoxal, biotin, carbamylated, acetylated, succinylated,

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 9/04	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 21/04	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/02	A 6 1 P 25/02	1 0 1
A 6 1 P 25/08	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 25/14	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/18	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 25/22	A 6 1 P 25/22	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/32	A 6 1 P 25/32	
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 27/06	A 6 1 P 27/06	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ブラインズ, マイケル
 アメリカ合衆国 0 6 5 2 5 コネティカット州, ウッドブリッジ, ウェパウォーグ ロード 1
 (72)発明者 セラミ, アンソニー
 アメリカ合衆国 1 0 0 1 2 ニューヨーク州, ニューヨーク, マーサー ストリート 1 7 0
 (72)発明者 セラミ, カーラ
 アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州, スリーピー ホロー, ファーリントン アベニュー 1 2 1

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA06 AA07 AA19 BA44 CA18 DB56 MA02 NA05 NA06
 ZA022 ZA052 ZA062 ZA152 ZA162 ZA182 ZA332 ZA362 ZA402 ZB112
 ZC032 ZC352 ZC392