



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 89468

(13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 38/22

A61P 25/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) МОДУЛЯЦІЯ ФУНКЦІЇ ТКАНИН, ЩО ЗБУДЖУЮТЬСЯ ЗА РАХУНОК ПЕРИФЕРІЙНОГО ВВЕДЕННЯ ЕРИТРОПОЕТИНУ**

1

(21) 2001117688  
(22) 13.04.2000  
(24) 10.02.2010  
(86) PCT/US00/10019, 13.04.2000  
(31) 09/290,938  
(32) 13.04.1999  
(33) US  
(31) 09/547,220  
(32) 11.04.2000  
(33) US  
(46) 10.02.2010, Бюл.№ 3, 2010 р.  
(72) БРАЙНЗ МАЙКЛ, US, КЕРАМІ ЕНТОНІ, US, КЕРАМІ КАРЛА, US  
(73) ДЗЕ КЕННЕТ С. УОРРЕН ІНСТІТЮТ, ІНК., US  
(56) Grimm G. et al. Improvement of brain function in hemodialysis patients treated with erythropoietin. *Kidney International*. 1990, Vol. 38, pages 480-486  
Nissenson A.R. et al. Recombinant Human Erythropoietin and renal Anemia: molecular Biology, Clinical Efficacy, and Nervous System Effects. *Annals of Internal Medicine*. 01.03.1991, Vol. 114, No. 5, pages 402-416  
Sakanaka M. et al. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Medical Sciences*. 14.04.1998, Vol.95, issue 8, pages 4635-4640  
Bernaudin M. et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999 Jun; No.19, pages 643-651  
(57) 1. Фармацевтична композиція в одиничній дозованій формі, яка включає ефективну нетоксичну кількість ЕРО в діапазоні від 150000 до 500000 одиниць ЕРО, модулятора активності рецепторів ЕРО, модулятора ЕРО-активованого рецептора або їх комбінацій і фармацевтично прийнятний носій, де ЕРО, модулятор активності рецепторів ЕРО, модулятор ЕРО-активованого рецептора або їх комбінація здатні активувати рецептори ЕРО збуджуваної тканини.  
2. Фармацевтична композиція за п.1, де ефективна нетоксична кількість ЕРО складає дозу, ефективну для досягнення циркулюючого рівня ЕРО, який вищий ніж 10000 мОд/мл сироватки.  
3. Фармацевтична композиція за п.2, де циркулюючий рівень ЕРО визначають приблизно через 1,

2

2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 годин після введення ЕРО.

4. Фармацевтичний набір для модуляції збуджуваної тканини або посилення пізнавальної функції, який містить один або більше з контейнерів, які включають композицію за п.1.

5. Спосіб терапевтичного або профілактичного впливу на уражену або піддану розладу збуджувану тканину ссавця, який включає периферичне введення вказаному ссавцю ЕРО в діапазоні від 50000 до 500000 одиниць, модулятора активності рецепторів ЕРО, модулятора ЕРО-активованого рецептора або їх комбінацій у кількості і в режимі введення доз, достатніх для досягнення вказаного терапевтичного або профілактичного ефекту, де ЕРО, модулятор активності рецепторів ЕРО, модулятор ЕРО-активованого рецептора або їх комбінація здатні активувати рецептори ЕРО збуджуваної тканини, і де ураження або розлад вибраний з гіпоксії, зниженого постачання киснем, пренатальної або постнатальної нестачі кисню, удусення, ядухи, майже утоплення, постопераційного розладу пізнавальної функції, інгаляційного отруєння, такого як отруєння оксидом вуглецю або вдихання диму, нападу астми, травми, включаючи травму головного або спинного мозку, хірургічного втручання і радіотерапії, асфіксії, епілепсії, гіпоглікемії, гіпоглікемії, яка викликана або одержана в результаті передозування інсуліну, ятрогенної гіперінсулемії, інсуліноми, дефіциту гормону росту, гіперкортизолізму, передозування ліків, ураження або ушкодження тканин під час хірургічних процедур, таких як видалення пухлини або видалення аневризми, хронічного обструктивного легеневого захворювання, емфіземи, синдрому дихальної недостатності у дорослих, гіпертонічного шоку, контузії, септичного шоку, анафілактичного шоку, інсулінового шоку, серпоподібноклітинної анемії, еклампсії, зупинки серця, аритмії, азотного наркозу або локалізованої гіпоксії тканини, захворювання, пов'язаного з нападами, хронічного захворювання, пов'язаного з нападами, судом, розсіяного склерозу, закупорки судин, гіпертонії, інфаркту міокарда, запалення, нейропсихіатричних захворювань, таких як вікова втрата пізнавальної функції, деменції, включаючи старечу деменцію, радіаційного

(13) C2

(11) 89468

(19) UA

ураження, церебрального паралічу, нейродегенеративного захворювання, загибелі нейрональних клітин, хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона, хвороби Лея, AIDS деменції, вікової втрати пізнавальної функції, втрати пам'яті, бічного аміотрофічного склерозу, туберозного склерозу, алкоголізму, емоційного розладу, занепокоєння, депресії, аутизму, захворювання, пов'язаного з дефіцитом уваги і гіперактивністю, хвороби Вілсона, церебрального і прогресуючого супрануклеарного паралічу, деменції, пов'язаної з тільцями Леві, хвороб, викликаних пріонами, таких як губчасті енцефалопатії, такі як хвороба Крейтцфельда-Якоба, хвороби Хантінгтона, міотонічної дистрофії, атаксії Фрідріха та інших атаксій, синдрому Жилия де ла Туретта, шунтування серця-легень, ушкодження очного нерва в результаті глаукоми, глаукоми, ретинальної ішемії, травми сітківки, ушкодження тканин сітківки, таких як жовті плями на сітківці, відшаровування сітківки, пігментного ретиніту, атеросклеротичної ретинопатії, гіпертонічної ретинопатії, блокади артерії сітківки, блокади вен сітківки, ретинальної гіпотензії, діабетичної ретинопатії, отруєння нейротоксинами, такого як отруєння домоевою кислотою моллюсків, нейрорлатиризму, гуамської (Guam) хвороби, спадкової мітохондріальної дисфункції, набуті мітохондріальної дисфункції, порушень автономних функцій, таких як гіпертонія і порушення сну, розладу сну, такого як зупинка дихання під час сну, і розладу, пов'язаного з подорожами, нейропсихіатричних розладів, таких як шизофренія, шизоафективного розладу, дефіциту уваги, дистимічного розладу, основного депресивного розладу, манії, obsесивно-компульсивного розладу, розладу, пов'язаного з використанням психоактивних речовин, паніки, однополярних або біполярних афективних розладів, інших нейропсихіатричних і нейродегенеративних розладів, субарахноїдальної і аневризмальної кровотечі, наслідків різних енцефалітів і менінгітів, наприклад, запалення мозкових тканин, пов'язаного з захворюваннями сполучної тканини або вовчаком, післяопераційного лікування емболічних або ішемічних уражень і опромінення всього мозку.

6. Спосіб за п.5, де вказаний терапевтичний або профілактичний вплив являє собою лікування або профілактику гіпоксії.

7. Спосіб за п.6, де вказана гіпоксія є пренатальною або постнатальною недостатністю кисню, ядухою, удушенням, майже утопленням, постопераційним розладом пізнавальної функції, отруєнням окисом вуглецю, вдиханням диму, хронічним обструктивним легенеvim захворюванням, емфіземою, синдромом респіраторного дистресу у дорослих, гіпертонічним шоком, септичним шоком, анафілактичним шоком, інсуліновим шоком, серпоподібноклітинною анемією, зупинкою серця, аритмією, азотним наркозом або локалізованою гіпоксією тканин.

8. Спосіб за п.5, де вказаною збуджуваною тканиною є тканини центральної нервової системи, периферійної нервової системи, сітківки або серця.

9. Спосіб за п.8, де вказаною збуджуваною тканиною є тканина центральної нервової системи.

10. Спосіб за п.5, де вказане введення включає пероральне, зовнішнє, внутрішньопорожнинне введення або введення шляхом інгаляції, або парентеральне введення.

11. Спосіб за п.10, де вказане парентеральне введення є внутрішньовенним, внутрішньоартеріальним, підшкірним, внутрішньом'язовим, внутрішньочеревинним під слизову або внутрішньошкірним.

12. Спосіб за п.5, де вказане введення здійснюють в гострому або хронічному періоді.

13. Спосіб за п.5, де вказаний ЕРО вводять в дозі, яка перевищує дозу, необхідну для максимальної стимуляції еритропоезу.

14. Спосіб за п.5, де вказаний ЕРО, модулятор активності рецепторів ЕРО, модулятор ЕРО-активованого рецептора є еритропоетином, аналогом еритропоетину, міметиком еритропоетину, фрагментом еритропоетину, гібридною молекулою еритропоетину, молекулою, яка зв'язує рецептор еритропоетину, агоністом еритропоетину, нирковим еритропоетином, еритропоетином мозку, олігомером, полімером, мутантом, спорідненою сполукою, природною формою, синтетичною формою або рекомбінантною формою перерахованих вище сполук або комбінацією будь-яких з перерахованих вище сполук.

15. Спосіб посилення функції збуджуваної тканини в ссавців, що включає периферичне введення вказаному ссавцю кількості ЕРО в діапазоні від 50000 до 5000000 одиниць, модулятора активності рецептора ЕРО, модулятора ЕРО-активованого рецептора або їх комбінації, де ЕРО, модулятор активності рецепторів ЕРО, модулятор ЕРО-активованого рецептора або їх комбінація здатні активувати рецептори ЕРО збуджуваної тканини, у кількості й у режимі введення доз, достатніх для досягнення вказаного посилюючого ефекту без помітного збільшення гематокриту, де вказане посилення функції збуджуваної тканини застосовується при лікуванні або попередженні гіпоксії, зниженого постачання киснем, пренатальної або постнатальної нестачі кисню, удушення, ядухи, майже утоплення, постопераційного розладу пізнавальної функції, інгаляційного отруєння, такого як отруєння окисом вуглецю або вдихання диму, нападу астми, травми, включаючи травму головно-го або спинного мозку, хірургічного втручання і радіотерапії, асфіксії, епілепсії, гіпоглікемії, гіпоглікемії, що викликана або одержана в результаті передозування інсуліну, ятрогенної гіперінсулемії, інсуліноми, дефіциту гормону росту, гіперкортизолізму, передозування ліків, ризику ураження або ушкодження тканин під час хірургічних процедур, таких як видалення пухлини або видалення аневризми, хронічного обструктивного легеневого захворювання, емфіземи, синдрому дихальної недостатності в дорослих, гіпертонічного шоку, контузії, септичного шоку, анафілактичного шоку, інсулінового шоку, серпоподібноклітинної анемії, еклампсії, зупинки серця, аритмії, азотного наркозу або локалізованої гіпоксії тканини, захворювання, пов'язаного з нападами, хронічного захворювання, пов'язаного з нападами, судом, розсіяного склерозу, закупорки судин, гіпертонії, інфаркту міокарда, запалення, нейропсихіатричних захворювань, та

ких як вікова втрата пізнавальної функції, деменції, включаючи старечу деменцію, радіаційного ураження, церебрального паралічу, нейродегенеративного захворювання, загибелі нейрональних клітин, хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона, хвороби Лея, AIDS деменції, вікової втрати пізнавальної функції, втрати пам'яті, бічного аміотрофічного склерозу, туберозного склерозу, алкоголізму, емоційного розладу, занепокоєння, депресії, аутизму, захворювання, пов'язаного з дефіцитом уваги і гіперактивністю, хвороби Вілсона, церебрального і прогресуючого супрануклеарного паралічу, деменції, пов'язаної з тільцями Леві, хвороб, викликаних пріонами, таких як губчасті енцефалопатії, такі як хвороба Крейтцфельдта-Якоба, хвороби Хантінгтона, міотонічної дистрофії, атаксії Фрідріха й інших атаксій, синдрому Жіля де ла Туретта, шунтування серця-легень, ушкодження очного нерва в результаті глаукоми, глаукоми, ретинальної ішемії, травми сітківки, ушкодження тканин сітківки, таких як жовті плями на сітківці, відшаровування сітківки, пігментного ретиніту, атеросклеротичної ретинопатії, гіпертонічної ретинопатії, блокади артерії сітківки, блокади вен сітківки, ретинальної гіпотензії, діабетичної ретинопатії, отруєння нейротоксинами, такого як отруєння домоєвою кислотою моллюсків, нейролатризму, гуамської (Guam) хвороби, спадкової мітохондріальної дисфункції, набуті мітохондріальної дисфункції, порушення автономних функцій, таких як гіпертонія і порушення сну, розладу сну, такого як зупинка дихання під час сну, і розладу, пов'язаного з подорожами, нейропсихіатричних розладів, таких як шизофренія, шизоафективного розладу, дефіциту уваги, дистимічного розладу, основного депресивного розладу, манії, обсесивно-компульсивного розладу, розладу, пов'язаного з використанням психоактивних речовин, паніки, однополярних або біполярних афективних розладів, інших нейропсихіатричних і нейродегенеративних розладів, субарахноїдальної й аневризмальної кровотечі, наслідків різних енцефалітів і менінгітів, наприклад, запалення мозкових тканин, пов'язаного з захворюваннями сполучної тканини або вовчаком, післяопераційного лікування емболічних або ішемічних уражень або опромінення всього мозку.

16. Спосіб за п.15, де вказане посилення функції збуджуваної тканини застосовується при лікуванні або попередженні емоційних розладів, занепокоєння, депресії, аутизму, дефіциту уваги, хвороби

Альцгеймера, старіння або порушення пізнавальної функції.

17. Спосіб поліпшення, відновлення або підтримки асоціативної здатності до навчання, тренування або збереження вивченої поведінки або запам'ятовування у ссавця, який включає периферичне введення вказаному ссавцеві кількості ЕРО в діапазоні від 50000 до 500000 одиниць, модулятора активності рецептора ЕРО, модулятора ЕРО-активованого рецептора або їх комбінації, де ЕРО, модулятор активності рецепторів ЕРО, модулятор ЕРО-активованого рецептора або їх комбінація здатні активувати рецептори ЕРО збуджуваної тканини, у кількості і у режимі введення доз, достатніх для досягнення вказаного поліпшення, відновлення або підтримки без помітного збільшення гематокриту.

18. Спосіб за п.15 або 17, де вказаною збуджуваною тканиною є тканини центральної нервової системи, периферійної нервової системи, сітківки або серця.

19. Спосіб за п.18, де вказаною збуджуваною тканиною є тканина центральної нервової системи.

20. Спосіб за п.15 або 17, де вказане введення включає пероральне, зовнішнє, внутрішньопорожнинне введення або введення шляхом інгаляції, або парентеральне введення.

21. Спосіб за п.20, де вказане парентеральне введення є внутрішньовенним, внутрішньоартеріальним, підшкірним, внутрішньом'язовим, внутрішньочеревинним під слизову або внутрішньошкірним.

22. Спосіб за п.15 або 17, де вказане введення здійснюють в гострому або хронічному періоді.

23. Спосіб за п.15 або 17, де вказаний ЕРО вводять в дозі, яка перевищує дозу, необхідну для максимальної стимуляції еритропоєзу.

24. Спосіб за п.15 або 17, де вказаний ЕРО, модулятор активності рецепторів ЕРО, модулятор ЕРО-активованого рецептора або їх комбінація є еритропоєтином, аналогом еритропоєтину, міметиком еритропоєтину, фрагментом еритропоєтину, гібридною молекулою еритропоєтину, молекулою, яка зв'язує рецептор еритропоєтину, агоністом еритропоєтину, нирковим еритропоєтином, еритропоєтином мозку, олігомером, полімером, мутантом, спорідненою сполукою, природною формою, синтетичною формою або рекомбінантною формою перерахованих вище сполук або комбінацією будь-яких з перерахованих вище сполук.

25. Спосіб за п.24, де вказана зв'язуюча рецептор ЕРО молекула є антитілом до рецептора еритропоєтину.

## 1. Область винаходу

Даний винахід стосується використання периферійного введення еритропоєтину і інших модуляторів активності рецепторів еритропоєтину, або модуляторів ЕРО-активованих рецепторів для позитивного впливу на функції тканин, що збуджуються. Він включає захист тканин, що збуджуються, таких як нейрональні тканини або тканини серця, від нейротоксинів, гіпоксії і інших шкідливих впливів, і посилення функції тканин, що збуджу-

ються, наприклад, для полегшення навчання і поліпшення пам'яті. Далі даний винахід стосується способів транспортування речовин через бар'єри ендотеліальних клітин за рахунок асоціації з молекулами еритропоєтину, модуляторами активності рецепторів еритропоєтину або іншими модуляторами ЕРО-активованих рецепторів.

## 2. Передумови винаходу

Різні гострі і хронічні стани і захворювання, причинами яких є пошкодження тканин, що збу-

джуються і їх дисфункція, викликаються внаслідок зовнішніх і внутрішніх впливів. Такі впливи включають недостатність відповідної кількості кисню або глюкози, вплив нейротоксинів, інфекційних агентів, або є наслідком старіння, інфекційних агентів або травми. Наприклад, тканини, що збуджуються можуть бути пошкоджені внаслідок епілептичного нападу, або хронічної епілепсії, конвульсій, епілепсії, удару, хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона, вражень центральної нервової системи, гіпоксії, церебрального паралічу, травми головного або спинного мозку, AIDS деменції і інших форм деменції, втрати пізнавальної функції, пов'язаної з віком, втратою пам'яті, бічного аміотрофічного склерозу, розсіяного склерозу, гіпертонії, зупинки серця, загибелі нейронів, вдихання диму і отруєння двоокисом вуглецю.

Загальновідомо, що зменшення постачання мозку доступними йому джерелами енергії, такими як глюкоза або кисень, приводить до серйозного погіршення функцій мозку, включаючи пізнавальну функцію. Багато які (але не всі) нейрони центральної нервової системи легко ушкоджуються при функціонуванні в метаболічно-обмежених умовах, наприклад, в умовах гіпоксії, гіпоглікемії, стресу, і/або тривалого, сильного збудження. У цих умовах електрохімічні градієнти цих клітин часто різко падають, що приводить до безповоротного ураження нейронів і загибелі клітин. Існуюча нині точка зору віддає перевагу цьому загальному механізму як звичайній кінцевій схемі для широкого кола загальних і неврологічних захворювань, що приводять до дебільності, включаючи удар, епілепсію і хворобу Альцгеймера.

Хоча наслідки обмеження запасу енергетичних речовин на функції мозку добре відомі, ефекти поліпшення їх доставляння до нормального, в інших відношеннях, мозку, були використані менш інтенсивно. Існуючі дані дають серйозні основи передбачити, що посилене доставляння як глюкози, так і кисню помітно поліпшує комплексну пізнавальну функцію, як в досліді на тваринних моделях, так і на здорових людях (Korpf et al., 1994, *Behavioral and Neural Biology* 62: 237-243; Li et al., 1998, *Neuroscience* 85: 785-794; Moss et al., 1996, *Psychopharmacology* 124: 255-260). Далі, було продемонстровано, що зростаючий список нейропептидів, продукованих в мозку, безпосередньо забезпечує поліпшення пізнавальної функції здорового мозку. Фізіологічна основа таких поліпшень зрештою залежить від реконструкції нейронних внутрішніх зв'язків за рахунок синаптичних змін.

Цитоархітектура (цитоархітектоніка) тканин мозку демонструє крайню пластичність і зазнає безперервної реконструкції. Ці процеси, опосередковані багатьма трофічними молекулами, відбуваються не тільки після ураження, але також відіграють помітну роль в процесах навчання, пам'яті і в пізнавальних функціях. Хоча прототипом нейротрофіну є фактор росту нервів (NGF), було встановлено, що зростаюча кількість цитокінів здійснює трофічні функції в мозку (Hefti et al. 1997, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 239-67).

Останнім часом декілька незалежних дослідників виявили, що нервові тканини експресують

високі рівні як EPO, так і їх рецепторів (EPO-R; Digicaylioglu et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3717-20; Juul et al., *Pediatr. Res.* 43: 40-9; Marti et al., 1997, *Kidney Int.* 51: 416-8; Morishita et al., 1997, *Neuroscience* 76: 105-16). Хоча представляється, що EPO і кожний з його рецепторних білків є продуктами окремих генів, версій ЦНС значно менше. Фізіологічне значення цього спостереження не було з'ясоване, але масові відмінності мабуть повинні модифікувати біологічну активність. Наприклад, при дослідженнях пацієнтів (людей) дослідники прийшли до висновку, що EPO не транспортується в мозок з периферії (Marti et al., 1997, *supra*). Однак до цього часу ця можливість не була оцінена для EPO в будь-яких прямих дослідженнях. Хоча EPO мозку приблизно на 15% менший, ніж ниркоподібний EPO (за рахунок відмінностей в сіалілуванні), EPO мозку більш активні при стимулюванні еритроїдної колонії низькими концентраціями лігандів (Masuda et al., 1994, *J. Biol. Chem.* 269: 19488-93). З іншого боку, рецептори ЦНС демонструють набагато більш низьку афінність по відношенню до деглікозилованих EPO, ніж більш великі на 30% периферійні рецептори (Konishi et al., 1993, *Brain Res.* 609: 29-35; Masuda et al., 1993, *J. Biol. Chem.* 268: 11208-16).

У мозку EPO експресія була виявлена в астроцитах, і посилена EPO експресія і виділення можуть бути викликані гіпоксією і іншими метаболічними факторами, які викликають стрес (Marti et al., 1996, *Eur. J. Neurosci.* 8: 666-76; Masuda et al., 1993, *J. Biol. Chem.* 268: 11208-16; Masuda et al., 1994, *J. Biol. Chem.* 269: 19488-93), або навіть заняття інших рецепторів, таких як сімейство інсуліноподібних факторів росту (Masuda et al., 1997, *Brain Res.* 746: 63-70). Нейрони є однією мішенню для цих секретованих EPO, оскільки вони експресують EPO-R, що дуже залежить від типу клітин (Morishita et al., 1997, *Neuroscience* 76: 105-16). В протилежність самим EPO, щільність EPO-R, мабуть, не модулюється під час метаболічного стресу (Digicaylioglu et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3717-20).

Останні дослідження продемонстрували, що EPO істотно захищає від гіпоксичних нейрональних пошкоджень *in vitro*, а також *in vivo*, при введенні безпосередньо в церебральні шлуночки (Morishita et al., 1997, *Neuroscience* 76: 105-16; Sadamoto et al., 1998, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253: 26-32; Sakanaka et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:4635-40). Konishi et al. (1993, *Brain Res.* 609: 29-35) продемонстрували, що EPO промотує *in vivo* виживання холінергічних нейронів у дорослих пацюків при ін'єкції безпосередньо в церебральні шлуночки. EPO, введені центрально в церебральні шлуночки, також успішно запобігають дефіциту просторового навчання пацюків, викликаного ішемічним ураженням (Sadamoto et al., 1998, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253: 26-32). Останні публікації висувають припущення, що тільки ділянка з 17 амінокислот EPO необхідна для цих нейротрофічних ефектів в нейронних клітинах (Campana et al., 1998, *Int. J. Mol. Med.* 1: 235-41).

Протягом багатьох років вважалося, що єдиною чіткою фізіологічною роллю еритропоетину (ЕРО) був контроль за продукуванням червоних кров'яних клітин. Останнім часом з'явилися декілька напрямів доведень, які передбачають, що ЕРО, як член суперсімейства цитокінів, виконує інші важливі фізіологічні функції, які опосередковані через взаємодії з рецепторами еритропоетину (ЕРО-Р). Ці дії включають мітогенез, модуляцію притоку кальцію в клітини гладкої мускулатури і в нервові клітини, і впливають на проміжний метаболізм. Вважають, що ЕРО забезпечує компенсаторні реакції, які служать для поліпшення гіпоксичного клітинного мікросередовища. Хоча дослідження встановили, що внутрішньочерепні ін'єкції ЕРО захищають нейрони від гіпоксичного нейронального ураження, внутрішньочерепне введення являє собою той спосіб, що не використовується на практиці і неприйнятний спосіб введення для терапевтичного використання, особливо для здорових індивідуумів. Крім того, більш ранні дослідження анемічних пацієнтів, яким вводили ЕРО, привели до висновку, що периферійно введені ЕРО не транспортуються в мозок; (Marti et al., 1997, *supra*).

Цитування або обговорення посилань, що приводяться тут не потрібно розглядати як визнання того, що вони є відомим рівнем техніки для даного винаходу.

### 3. Короткий зміст винаходу

Даний винахід стосується композиції і способів модулювання функцій тканини, що збуджується у ссавців, а також способів і композицій для доставляння ліків до тканин, що збуджуються. Даний винахід заснований, зокрема, на відкритті заявників, що полягає в тому, що еритропоетин, (ЕРО), введений системно у високих дозах, специфічно захоплюється мозком. Зокрема, заявники виявили, що ЕРО, введений у високих дозах, може долати гематоенцефалічний бар'єр, причому він може посилити пізнавальну функцію, і захистити нервову тканину від пошкодження внаслідок стресових ситуацій, таких як гіпоксія.

Терміни еритропоетин і ЕРО, які тут використовуються взаємозамінно, модулятори активності ЕРО рецепторів і модулятори ЕРО-активованих рецепторів стосуються сполук, які при системному введенні (поза гематоенцефалічним бар'єром) здатні активувати ЕРО-активовані рецептори тканин, що електрично збуджуються для посилення і/або захисту від ураження і загибелі. Так, ЕРО може стосуватися будь-якої форми еритропоетину, яка може модулювати тканини, що збуджуються, а також ЕРО аналогів, фрагментів і імітацій. У переважному варіанті для використання в способах даного винаходу еритропоетин виявляє підвищену специфічність стосовно ЕРО рецепторів мозку. У іншому варіанті еритропоетин є нееритропоетичним. У ще одному варіанті еритропоетин вводять в дозі, яка перевищує дозу, необхідну для максимальної стимуляції еритропоєзу.

У даному винаході запропонована фармацевтична композиція в одиничній дозованій формі, адаптована для модуляції тканини, що збуджується, підвищення пізнавальної функції, або для до-

ставляння сполуки через ендотеліальні щільні сполуки, яка включає для одиничної дози, ефективну нетоксичну кількість в інтервалі від біля 50000 до 500000 одиниць ЕРО, модулятора активності рецептора ЕРО, модулятора ЕРО-активованого рецептора, або їх комбінацій, і фармацевтично прийнятний носій. У одному з варіантів ефективна нетоксична кількість ЕРО у вказаній фармацевтичній композиції складає від 50000 до 500000 одиниць ЕРО. У іншому варіанті ефективна нетоксична кількість ЕРО вказаного фармацевтичного препарату є дозою, ефективною для досягнення циркулюючого рівня ЕРО більше за 10000мОд/мл сироватки. У іншому, варіанті циркулюючий рівень ЕРО досягається приблизно через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 годин після введення ЕРО. У іншому варіанті в даному винаході запропонований фармацевтичний набір, що включає ефективну кількість ЕРО для модулювання тканини, що збуджується, посилення пізнавальної функції або доставляння сполук через ендотеліальні щільні сполуки, упаковані в один або більше контейнерів.

У даному винаході запропонований спосіб модулювання функцій тканини, що збуджується у ссавців, який включає периферійне введення вказаному ссавцеві ефективної кількості еритропоетину. Тканина, що збуджується може бути нормальною, тканиною або тканиною, яка має патологію, хворою тканиною. У одному з варіантів тканина, що збуджується є нейрональною тканиною центральної нервової системи. У інших варіантах тканину, що збуджується - вибирають з групи, що складається з нейрональної тканини периферійної нервової системи і тканини серця.

У одному з варіантів запропонований спосіб посилення функцій тканини, що збуджується у ссавців, зокрема як нормальної, так і ненормальної тканини, що збуджується, шляхом периферійного введення ефективної кількості ЕРО або модулятора активності рецептора ЕРО. Посилення функцій тканини, що збуджується приводить до поліпшення, наприклад, навчання, асоціативного навчання, або пам'яті. Нелімітуючі приклади станів, які можна лікувати відповідно до цього аспекту даного винаходу, включають розлади настрою, неспокій, депресію, аутизм, дефіцит уваги, гіперактивність, хворобу Альцгеймера, старіння і порушення пізнавальної функції.

У іншому варіанті модуляція тканини, що збуджується забезпечує захист від патології, яка виникає внаслідок ураження тканини, що збуджується, наприклад, нейронів центральної нервової системи, периферійної нервової системи, або тканин серця. Така патологія може виникнути внаслідок уражень, включаючи (але ними не обмежуючись) гіпоксію, епілептичний напад, нейродегенеративні захворювання, отруєння нейротоксинами, розсіяний склероз, зупинку серця, радіацію або гіпоглікемію. У одному з варіантів патологія є результатом гіпоксії, і може бути викликана пренатальною або постнатальною недостатністю кисню, удушенням, удушенням, майже утопленням, постопераційним розладом пізнавальної функції, отруєнням окисом вуглецю, вдиханням диму, хронічним обструктивним легеневи-

захворюванням, емфіземою, синдромом респіраторного дистресу у дорослих, гіпертонічним шоком, септичним шоком, інсуліновим шоком, анафілактичним шоком, гострою симптоматикою у хворих серпасто-клітинною анемією, зупинкою серця, аритмією або наркозом азотом. У тих випадках, коли патологією є напад, вона може бути (як нелімітуючий приклад) епілепсією, конвульсіями або хронічною епілепсією. У тому випадку, коли патологією є нейродегенеративне захворювання, вона може бути, наприклад, ударом, хворобою Альцгеймера, хворобою Паркінсона, церебральним паралічем, травмою головного мозку або спинного мозку, AIDS деменцією, віковою втратою пізнавальної функції, втратою пам'яті, бічним аміотрофічним склерозом, епілептичним нападом, алкоголізмом, ішемією сітчатки ока, старінням, глаукомою або загибеллю нервів. У іншому варіанті введення ЕРО можна використати для запобігання ураженню або пошкодженню тканин під час хірургічного втручання, як наприклад, при видаленні пухлини або операції аневризми.

У ще одному варіанті запропоновані способи для полегшення трансцитозу молекул через бар'єр ендотеліальних клітин у ссавців шляхом введення композиції молекул в асоціації з еритропоетином. Асоціація між молекулою, яка підлягає транспорту і ЕРО може бути, наприклад, лабільним ковалентним зв'язком, стабільним ковалентним зв'язком, або нековалентною асоціацією з сайтом зв'язування для даної молекули. У одному варіанті ендотеліальними клітинними бар'єрами можуть бути гематоенцефалічний бар'єр, гематоофтальмічний бар'єр, бар'єр між кровоносною системою і сім'яниками, бар'єр між кровоносною системою і яєчниками або плацентарний бар'єр.

Далі в даному винаході запропонована композиція для транспортування молекул за рахунок трансцитозу через ендотеліальний клітинний бар'єр, що включає вказану молекулу в асоціації з ЕРО, модулятором активності рецептора ЕРО, або модулятором ЕРО-активованого рецептора. У одному з варіантів ЕРО є еритропоетином, аналогом еритропоєтину, імітатором еритропоєтину і фрагментом еритропоєтину, гібридною молекулою еритропоєтину, молекулою, зв'язуючою рецептор еритропоєтину, агоністом еритропоєтину, ниркоподібним еритропоєтином, еритропоєтином мозку, їх олігомерами, їх полімерами, їх мутантами, представниками того ж роду, їх природною формою, їх рекомбінантною формою, або їх комбінаціями. У іншому варіанті молекулою вказаної композиції є гормон, нейротрофічний фактор, протимікробний агент, радіофармацевтичний агент, антисмислова сполука, антитіло, імуносупресор, токсин або протираковий агент. Відповідні молекули для транспорту за способом даного винаходу включають (але ними не обмежуються) гормони, такі як гормон росту, антибіотики, протиракові агенти і токсини.

Ці і інші аспекти даного винаходу будуть більш зрозумілі з посиланням на наступні малюнки і докладний опис.

#### 4. Короткий опис малюнків

Фіг.1А-В. Тест водного лабіринту Морріса А. Результати тесту водного лабіринту Морріса, проведеного на мишах, яким периферійно вводили щодня або ЕРО, або фізіологічний розчин (SHAM). В. Тварини, яким вводили ЕРО, діяли значно краще за тих, яким вводили SHAM. Лінія регресії ( $R^2=0,88$ ) показує нахил (0,68), що значно відрізняється від нахилу 1, явно на користь ЕРО групи.

Фіг.2А-С. Стандартний тест смакової огиди А. Порівняння периферійного введення SHAM і ЕРО стосовно споживання води мишами, яких тестують відповідно зі стандартним тестом смакової огиди. Споживання води виражають як процент від об'єму, споживаного контрольною групою мишей, у яких не спричиняли хворобливого стану введенням хлориду літію. В і С ілюструють значне підвищення навчання за рахунок введення ЕРО, оскільки тварини, яким вводили ЕРО, зазнали набагато більшої спраги, ніж контрольні тварини, уникаючи води, що містить добавку, яка викликає хворобливий стан, хоча проводили більше часу в пошуках води.

Фіг.3А-С. Результати експерименту, який демонструє, що попереднє периферійне введення ЕРО зменшує тяжкість епілептичного нападу, і захищає мишей від конвульсій і загибелі під дією нейротоксину каїнату. Цифри в дужках під кожною колонкою вказують число тварин, кожному з яких вводили дозу каїнату. В показує, що захисний ефект периферійно введеного ЕРО зростає при щоденному введенні ЕРО. С ілюструє затримку початку дії ЕРО, що є характеристикою програми індукування генної експресії.

Фіг.4А-В зображають захисний ефект rhЕРО проти ішемічного ураження мозку (фокальний удар). А. Системне введення ЕРО в різні моменти часу після індукування ішемії мозку зменшує розміри інфаркту. В. Порівняння двох форм ЕРО в захисті мозку від ураження в цій моделі; рекомбінантний людський ЕРО (rhЕРО) і похідне ЕРО, що містить 17 амінокислот (17-мер) ілюструє, що деякі ЕРО аналоги виявляються не ефективними для нейрозахисту.

Фіг.5 представляє захисну дію rhЕРО проти тупої травми, нанесеної на кору головного мозку.

Фіг.6А-В представляє захисну дію ЕРО від ішемічного ураження серця. А. Активність креатинкінази (СК) є індикатором пошкодження клітин міокарда. В. Активність мієлопероксидази (МРО) є мірою запалення.

Фіг.7 демонструє, що оброблення мишей ЕРО сповільнює і зменшує нейрологічні симптоми, супутні експериментально викликаному алергічному енцефаліту в моделі розсіяного склерозу.

Фіг.8А-В А. Мінімальна ефективна доза ЕРО для забезпечення нейрозахисту в моделі фокального удару в експерименті на пацюках. В. Рівні ЕРО в сироватці в різні моменти часу після внутрішньоочеревинного введення 5000 одиниць rhЕРО самицям мишей штаму Balb/c.

Фіг.9А-С А. Імунолокалізація ЕРО-R на капілярах і навколо них. В. Біотинілований ЕРО, введений мишам внутрішньоочеревино, виявляється через 5 годин в мозку, в безпосередньому оточен-

ні капілярів. С. Через 17 годин мітки біотину можна виявити всередині специфічних нейронів.

#### 5. Докладний опис винаходу

У даному винаході запропоновані композиції і способи для використання еритропоетину (ЕРО) для модуляції функцій тканин, що збуджуються, таких, як наприклад, посилення пізнавальних функцій і захист клітин, що збуджуються від впливу токсинів. Зокрема, в даному винаході запропоновані композиції, що включають ЕРО, а також способи їх використання для профілактики і лікування, включаючи доставляння ліків. У тому значенні, як тут використаний термін тканина, що збуджується, він включає (але цим не обмежується) нейрональні тканини центральної і периферійної нервових систем, і тканини серця.

У розкритому тут винаході запропоновані способи модулювання функцій тканини, що збуджується шляхом периферійного введення ЕРО, або молекул, що активують рецептор ЕРО, або молекул, що демонструють активність ЕРО-активованого рецептора, а також молекул, що імітують активність ЕРО, впливаючи через інші, не класичні ЕРО рецептори. Не будучи зв'язаними з будь-яким конкретним механізмом дії, такі молекули можуть посылати сигнал через ЕРО рецептор, наприклад, ініціювати сигнальний каскад трансдукції, зрештою активуючи програму генної експресії, що приводить до захисту або посилення функцій тканини, що збуджується. Молекули, здатні взаємодіяти з ЕРО рецепторами і модулювати активність рецептора, що тут іменуються як ЕРО або модулятори активності рецепторів ЕРО, корисні в контексті даного винаходу для захисту або посилення функцій тканин, що збуджуються. Ці молекули можуть бути, наприклад, природними, синтетичними або рекомбінантними формами ЕРО молекул, розкритими вище, або іншими молекулами, які можуть зовсім не обов'язково нагадувати ЕРО будь-яким чином, за винятком того, що вони модулюють активність ЕРО рецепторів, як тут розкрито. Ці молекули можна використати в комбінації для різних, розкритих тут цілей.

Розкриті тут композиції і способи можна використати для лікування і/або захисту як нормальних, так і тканин, що мають патологію, наприклад, нейронів центральної нервової системи, нейронів периферійної нервової системи, або тканин серця. Зокрема в розділі 5.1 далі розкриті способи використання таких ЕРО композицій, придатних для використання в практиці даного винаходу. У розділі 5.2.1 розкриті способи використання таких ЕРО композицій для посилення функцій тканин, що збуджуються, таких як навчання, пам'ять і інших аспектів пізнавальної функції, і в розділі 5.2.2 розкриті способи захисту тканин, що збуджуються від пошкоджень і травм. У розділі 5.2.3 далі розкрито виявлення того факту, що несподівана здатність ЕРО долати щільні сполуки капілярних ендотеліальних клітин забезпечує способи доставляння сполук через такі бар'єри. І нарешті, в розділі 5.3 описані стани, яких може стосуватися використання способів даного винаходу, і в розділі 5.4 розкриті способи введення і ефективні дози таких ЕРО композицій.

#### 5.1. Композиції, що включають еритропоетин

ЕРО композиції, придатні для використання в способі даного винаходу, включають будь-які сполуки еритропоетину, які при периферійному введенні здатні активувати модуляцію ЕРО-активованих рецепторів, тобто посилювати функцію тканин, що збуджуються, або захищати їх від пошкоджень і травм, або доставляти сполуки до тканин, що збуджуються. Еритропоетин є глікопротеїновим гормоном, який у людини має молекулярну масу від 34 до 38kD. Зрілий протеїн містить 166 амінокислот, і глікозильний залишок складає біля 40% маси молекули. Форми ЕРО, придатні для використання в практиці даного винаходу включають природні, синтетичні і рекомбінантні форми наступних молекул: еритропоетину, аналогів еритропоетину, міметиків еритропоетину, фрагментів еритропоетину, гібридних молекул еритропоетину, молекул, зв'язуючих рецептори еритропоетину, агоністів еритропоетину, ниркоподібний еритропоетин, еритропоетин мозку, їх олігомери і полімери, їх мутанти і представники його роду. Терміни "еритропоетин" і "ЕРО" можна використати взаємозамінно або спільно.

У даному винаході запропоновані синтетичні і рекомбінантні молекули, такі як ЕРО мозку і ниркоподібний ЕРО, рекомбінантні форми ЕРО ссавців, а також їх природні, одержані з пухлин і рекомбінантні ізоформи, такі як рекомбінантно-експресовані молекули і молекули, одержані внаслідок гомологічних рекомбінацій. Крім того, даний винахід включає молекули, включаючи пептиди, які зв'язують ЕРО рецептори, а також рекомбінантні конструкції або інші молекули, які мають частину або всі структурні і/або біологічні властивості ЕРО, включаючи фрагменти і полімери ЕРО або їх фрагменти. Тут ЕРО охоплює молекули із зміненою активністю скріплення з ЕРО рецепторами, переважно з підвищеною спорідненістю до рецептора, особливо якщо вони підходять для посилення транспорту через бар'єри ендотеліальних клітин. Включені сюди і мутанти, що включають молекули, які мають додаткове або зменшене число сайтів глікозилювання. Як було указано вище, терміни "еритропоетин", "ЕРО" і "міметик", а також інші терміни використовуються тут взаємозамінно для позначення молекули, які захищають або які посилюють тканини, що збуджуються, які здатні долати ендотеліальні щільні сполуки, і як такі, корисні для використання як засіб доставляння інших молекул. Крім того, в об'єм винаходу входять також молекули, продуковані трансгенними тваринами. Потрібно зазначити, що молекули ЕРО, як включені сюди, зовсім не обов'язково нагадують ЕРО за будовою або будь-яким іншим чином, за винятком здатності взаємодіяти з ЕРО рецептором або модулювати активність ЕРО рецепторів, або активувати ЕРО-активовані сигнальні каскади, як тут розкрито.

Як не лімітуючий приклад форми ЕРО, придатні для цілей даного винаходу, включають ЕРО мутанти, такі як, ті, у яких змінені амінокислоти за карбоксильним кінцем, і які розкриті в патенті США 5457089 і в патенті США 4835260; ЕРО ізоформи з різним числом залишків сілової кислоти в моле-

кулі, такі як ті, які розкриті в патенті США 5856292; поліпептиди, розкриті в патенті США 4703008; агоністи, розкриті в патенті США 5767078; пептиди, які зв'язуються з EPO рецептором, як розкрито в патентах США 5773569 і 5830851; міметики, що мають невеликі молекули, які активують EPO рецептор, як розкрито в патенті США 5835382; і EPO аналоги, розкриті в WO 9505465, WO 9718318 і WO 9818926. Всі вищезгадані матеріали включені сюди за посиланням, до такої міри, до якої ці розкриття стосуються різних альтернативних форм або способів одержання таких форм еритропоетинів даного винаходу.

EPO можна одержати комерційним шляхом (під торговою маркою PROCRIT вони доступні від Ortho Biotech, і під торговою маркою EPOGEN вони доступні від Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA).

У наступному варіанті даного винаходу включені сюди EPO молекули включають гібридні EPO молекули, які можна одержати, і які мають активність модулювання рецепторів EPO, а також іншу активність, наприклад, активність гормону росту. Такі гібридні молекули з безліччю доменів мають здатність взаємодіяти з EPO рецептором, а також мають активність інших молекул, таких як гормони. Способи одержання таких молекул з двома доменами відомі фахівцям. Як буде більш детально розкрито в розділі 5.2.3 далі, однією особливістю таких молекул є транспорт через бар'єри ендотеліальних клітин, що забезпечується доменом, який модулює активність EPO рецептора, і активністю інших молекул за потрібним сайтом.

Будь-які з розкритих вище сполук можна тестувати для ідентифікації EPO сполук, здатних модулювати тканини, що збуджуються, тобто посилювати функції, захищати від ураження і травми, або доставляти до них сполуки, використовуючи розкриті тут аналізи. Наприклад, EPO сполуки можна тестувати за їх здатністю посилювати функції тканини, що збуджується, такі як навчання, пам'ять і інші аспекти пізнавальної функції, використовуючи способи, розкриті в розділі 5.2.1. Приклади *in vivo* аналізів пізнавальної функції включають тест "водяний лабіринт" Морріса, приклад якого приведений в розділі 6, і стандартний тест смакової оги-ди, приклад якої детально розкритий в розділі 7. Крім того, описані вище EPO сполуки можна тестувати, використовуючи аналізи, розкриті в розділі 5.2.2, для ідентифікації EPO сполук, здатних захищати тканини, що збуджуються від пошкоджень і травм. Приклади, розкриті в розділах 8, 9, 10, 11 і 12, представляють конкретні приклади таких аналізів. EPO сполуки можна також аналізувати за їх здатністю доставляти сполуки через епітеліальні щільні сполуки, такі як гемато-енцефалічний бар'єр, використовуючи аналізи, такі як ті, які розкриті в розділі 5.2.3 і в розділі 9, далі. Таким чином, EPO сполуки, придатні для використання в даному винаході, включають кожну і всі сполуки, які при периферійному введенні здатні посилати сигнал через EPO-активовані рецептори для модулювання тканини, що збуджується, тобто посилити функцію цієї тканини, захистити її від пошкодження або травми, або доставити до неї сполуки.

5.2. Способи профілактичного і терапевтичного використання даного винаходу

У різних варіантах даного винаходу EPO композиції можна використати для захисту тканини, що збуджується від пошкоджень і травм або гіпоксичного стресу, посилення функцій тканини, що збуджується, або для доставляння сполук через ендотеліальні щільні сполуки тканини, що збуджується. Як було розкрито вище, даний винахід заснований, зокрема, на виявленні того факту, що EPO молекули можна транспортувати з люмінальної поверхні на поверхню основ мембран ендотеліальних клітин капілярів органів з щільними сполуками ендотеліальних клітин, наприклад, мозку, сітчастої оболонки і яєчок. Хоча і не бажаючи бути обмеженими будь-якою конкретною теорією, передбачають, що після трансцитозу EPO, EPO можуть взаємодіяти з EPO рецепторами тканини, що збуджується, такими, наприклад, як нейрони центральної нервової системи, периферійної нервової системи, тканин серця, і зв'язування з рецептором може ініціювати каскад сигнальної трансдукції, що приводить до активації програми генної експресії всередині тканини, що збуджується, забезпечуючи захист клітин від уражень, таких як ураження від нейротоксинів, в результаті гіпоксії і т.п. Способи захисту тканини, що збуджується від уражень або гіпоксичного стресу, посилення функцій тканини, що збуджується, і способи доставляння сполук через щільні сполуки тканини, що збуджується, розкриті далі більш детально.

5.2.1. Способи посилення функцій тканини, що збуджується

У одному аспекті даний винахід стосується способу посилення функцій тканини, що збуджується внаслідок введення EPO молекул, здатних активувати програму генної експресії, яка посилює функції тканини, що збуджується. Посилення функцій тканини, що збуджується забезпечує поліпшення навчання, асоціативного навчання і пам'яті. Різні захворювання і стани піддаються лікуванню цим способом, і крім того, цей спосіб корисний для посилення пізнавальної функції при відсутності будь-яких хвороб, або хворобливих станів. Способи використання даного винаходу розкриті далі більш детально і включають поліпшення навчання і тренування як у людей, так і у інших ссавців.

Стани і захворювання, які можна лікувати способами цього аспекту даного винаходу, включають будь-які стани або захворювання, для яких сприятливе посилення нейрональних функцій. Приклади таких захворювань включають захворювання центральної нервової системи, включаючи (але ними не обмежуючись) розлади настрою, неспокій, депресію, аутизм, дефіцит уваги, гіперактивність і порушення пізнавальної функції. Інші, не лімітуючі приклади пізнавальних функцій, які можна поліпшити, використовуючи способи даного винаходу, розкриті в розділі 5.3.

У одному з варіантів, наприклад, EPO молекули можна вводити суб'єкту або пацієнту, страждаючому порушеннями, викликаними втратою пізнавальних функцій, такими як наприклад, хвороба Альцгеймера.



Здатність ЕРО посилювати пізнавальну функцію можна протестувати на експериментальних тваринах, використовуючи будь-які описані тут способи, або будь-які інші прийняті моделі для дослідження навчання або пізнавальних функцій. Як розкрито в прикладах, представлених в розділах 6 і 7, було виявлено, що периферійно введений еритропоетин посилює навчання і пізнавальні функції, що продемонстровано на декількох добре відомих моделях вивчення навчання на здорових експериментальних тваринах. Прикладами таких моделей навчання є тест водного басейну Морріса, приклад якого приведений в розділі 6, і стандартний тест смакової огиди (СТА), приклад якого приведений в розділі 7. Наприклад, в одному з варіантів використовують стандартний тест смакової огиди, дуже чутливий, добре відомий стандартний тест для тестування пізнавальної функції у тварин після введення ЕРО. СТА використовують для тестування здатності тварин запам'ятовувати зв'язок хворобливих відчуттів з новим стимулом, таким як смак, таким чином, щоб тварини уникали цього нового смаку після повторного впливу цим стимулом. СТА включає мозок на різних коркових і підкоркових рівнях. Асоціацію, яка зв'язує висхідну і низхідну інформацію разом, виробляючи огиду, можна або послабити, або посилити, змінюючи вплив будь-якої з взаємозв'язаних одиниць. Як форма асоціативного навчання сила СТА визначається великим числом змінних, включаючи новизну оральних стимулів (наприклад, не новий стимул не може бути таким, що спричиняє огиду), міру "хворобливості" (токсичності), що виробляється, число повторів (тренінг), фізіологічні потреби (такі як спрага). Хоча СТА в дозозалежній формі може виробляти широке коло хімічних і фізичних агентів, хлорид літію надійно виробляє неспокій і анорексію. Подібно природним захворюванням літій викликає СТА, стимулюючи описану раніше схему, включаючи виділення цитокінів. Посилення функцій клітин, що збуджуються, наприклад, пізнавальної функції, надає ряд переваг індивідуумам в області навчання і роботи, і для посилення здібності до тренування і навчання інших ссавців (крім людини).

5.2.2. Способи захисту тканин, що збуджуються від уражень

У іншому варіанті даний винахід стосується способу захисту ссавців від патологій, виникаючих внаслідок ураження тканин, що збуджуються. Такий захист забезпечується шляхом периферійного введення ссавцеві такої кількості еритропоетину, який ефективно захищає тканини, що збуджуються від ураження. Як детально показано в прикладі в розділі 8 далі, ЕРО, введене до введення токсину каїнату, надає помітну нейрозахисну дію на мишей, підвищуючи поріг настання нападу і запобігаючи загибелі. Нейрозахисна дія ЕРО значна і тривала. Потрібно зазначити, що позитивні ефекти, які тут спостерігалися, відбувалися за дуже короткий проміжок часу відносно введення ЕРО, щоб привести до підвищення гематокриту як сліdstва еритропоетичної активності ЕРО. Більш того як було відмічено раніше, даний винахід включає

ЕРО, який не має здатності посилювати гематокрит.

У одному з варіантів даний винахід можна з успіхом використати, як в гострих випадках, так і для профілактики і лікування неврологічних порушень, як тут розкрито, і для посилення пізнавальних функцій здорового або хворого мозку. Як було указано вище, пошкодження і загибель нейронів центральної нервової системи є серйозним фактом і часто приводить до летального випадку, що є відповідальним за високу міру захворюваності і смертності популяції. Гострі неврологічні ураження можуть відбуватися<sup>1</sup> під час або внаслідок епілептичних нападів, конвульсій, епілепсії, удару, кровотечі, пошкоджень центральної нервової системи, гіпоксії, гіпоглікемії, гіпертонії і травми головного або спинного мозку. Даний винахід пропонує швидке введення для лікування в гострих випадках.

Наприклад, в одному варіанті способи даного винаходу можна використати для захисту ссавця від пошкоджень, причиною яких є радіаційне пошкодження мозку.

У іншому варіанті, серйозним станом, який можна лікувати або запобігти, відповідно способу даного винаходу, є профілактика і лікування в матці пренатальних гіпоксичних станів, лікування після народження для захисту мозку від гіпоксичних пошкоджень при тривалих пологах, а також при удушенні, утопленні і інших станах, при яких центральна нервова система випробовує ризик нейротоксичного ураження внаслідок недостатності кисню або в результаті схильності до інших нейротоксичних стимулів. Як добре відомо, індивідууми, які постраждали від гіпоксії під час пологів, або внаслідок не фатальних гіпотоксичних нещасних випадків або інцидентів, можуть відчувати довічний неврологічний дефіцит. Гіпоксія і/або припинення церебрального притоку крові, яка може виникнути після травми або під час хірургічних операцій, також загрожує можливістю викликати довічний неврологічний дефіцит.

Постоперативну пізнавальну дисфункцію, включаючи дефіцит після використання апарату штучне серце-легені, також можна лікувати способами, що пропонуються тут. Крім того, способи даного винаходу можна використати для лікування гіпоксії, внаслідок отруєння окисом вуглецю або вдихання диму.

У іншому варіанті ЕРО використовують для захисту серцевої тканини від тривалих уражень, пов'язаних з ішемією, інфарктом, запаленням або травмою.

Це нелімітуючі приклади пошкоджень тканини, що збуджується, які можна лікувати способами даного винаходу. Інтенсивне і раннє лікування цих порушень можуть здійснити професіонали швидкої медичної допомоги, так що лікування може початися відразу після того, як встановлена підозра на можливе неврологічне пошкодження. Ризик неврологічного пошкодження, пов'язаний з пологами, можна знизити шляхом профілактичного лікування плоду до початку пологів або під час пологів. Фахівцям будуть зрозумілі ці і інші ситуації і можливості застосування способу даного винаходу.

### 5.2.3. Способи доставляння сполук

Далі даний винахід направлений на спосіб полегшення транспорту молекул через бар'єр ендотеліальних клітин у ссавців, шляхом введення композиції, яка включає конкретні молекули, асоційовані з еритропоетином. Як було показано вище, автори виявили досі несподівану і дивну активність периферійно введених ЕРО відносно тканин, що збуджуються, таких як нервові тканини центральної нервової системи, периферійної нервової системи або тканини серця, ідентифікуючи ЕРО як молекули, здатні проникати крізь щільні сполуки таких тканин, що збуджуються, як гематоенцефалічний бар'єр. Як такі, ЕРО можна використати як носії для доставляння інших молекул через гематоенцефалічний бар'єр (BBB) і інші аналогічні бар'єри.

У одному з варіантів молекули, зв'язуючі ЕРО рецептори, що включають молекули, кон'юговані з ЕРО молекулами, можна використати для транспорту таких молекул через гематоенцефалічний бар'єр. Тим самим можна здійснити спільне доставляння таких молекул на ЕРО для подолання BBB. У іншому варіанті антитіло, або інший зв'язуючий з молекулою партнер, може бути асоційований з ЕРО, або з модулятором активності рецептора ЕРО, таким чином асоціюючи підлягаючу транспорту молекулу за рахунок нековалентного зв'язування зі зв'язуючим партнером, який далі асоційований з транспортабельною молекулою ЕРО. У іншому варіанті молекули, зв'язуючі ЕРО рецептор, що включають антитіла до ЕРО рецептора, можна використати в описаному вище способі. Такі антитіла забезпечують транспортний носій, на якому можуть "подорожувати" інші молекули, головним чином таким же чином, як були використані, антитіла до трансферинового рецептора для подолання гематоенцефалічного бар'єра (Pardridge et al, 1991, *Selective transport of an antitransferrin receptor antibody through the blood-brain barrier in vivo*. J. Pharmacol. Exp. Therap. 27: 66).

Фахівцям повинні бути відомі різні способи асоціації молекул з ЕРО і іншими описаними вище агентами, за рахунок ковалентних, нековалентних і інших взаємодій; крім того, можна легко визначити оцінку ефективності композиції в експериментальній системі. Асоціювання молекул з ЕРО і аналогами можна забезпечити будь-яким числом способів, включаючи лабільне, ковалентне зв'язування, зшивання, і т.д. В одному з варіантів, наприклад, асоціація між підлягаючою транспорту через бар'єр молекулою і еритропоетином може бути лабільним ковалентним зв'язком, причому в цьому випадку молекула виділяється з асоціації з ЕРО після подолання бар'єра. У одному з варіантів можна використати взаємодію біотин/авідин. У іншому варіанті, як було показано вище, можна одержати гібридну рекомбінантну або синтетичну молекулу, наприклад, таку, яка включає як домен молекули, що має необхідну фармакологічну активність, так і домен, відповідальний за модуляцію активності ЕРО рецептора. Молекула може бути кон'югована з ЕРО або модулятором активності ЕРО рецептора через поліфункціональну молеку-

лу, наприклад, поліфункціональний зшиваючий агент. У тому значенні, як тут використано, термін "поліфункціональна молекула" охоплює молекули, що містять одну функціональну групу, яка може реагувати більше ніж один раз послідовно, такі, як формальдегід, а також молекули, що містять більше ніж одну реакційноздатну групу. У тому значенні, як тут використано, термін "реакційноздатна група" стосується функціональної групи на зшиваючому агенті, яка реагує з функціональною групою молекули (наприклад, пептиду, білка, вуглеводу, нуклеїнової кислоти, зокрема гормону, антибіотика або протиракового агента, які необхідно доставити через ендотеліальний клітинний бар'єр), з утворенням ковалентного зв'язку між зшиваючим агентом і цією молекулою. Термін "функціональна група" зберігає своє стандартне значення, прийняте в органічній хімії. Поліфункціональні молекули, які можна використати, є, переважно, біосумісними лінкерами, тобто вони не є канцерогенними, вони не токсичні і практично не імуногенні *in vivo*. Поліфункціональні зшиваючі агенти, які відомі фахівцям і тут розкриті, можна легко протестувати в моделях на тваринах для визначення їх біосумісності. Поліфункціональні молекули переважно біфункціональні. У тому значенні, як тут використано, термін "біфункціональна молекула" стосується молекули з двома реакційноздатними групами. Біфункціональні молекули можуть бути гетеробіфункціональними або гомобіфункціональними. Гетеробіфункціональний зшиваючий агент дозволяє забезпечити вертикальну кон'югацію. Він особливо, переважний для того, щоб поліфункціональні молекули були досить розчинні у воді, для забезпечення протікання реакцій зшивання у водних розчинах, таких як водні розчини, буферовані при pH 6-8, і для одержання кон'югата, який залишається водорозчинним для більш ефективного біорозподілу. Звичайно поліфункціональна молекула ковалентно зв'язується з аміно або сульфгідрильною функціональною групою. Однак поліфункціональні молекули, реакційноздатні стосовно інших функціональних груп, таких як групи карбонових кислот або гідроксильні групи, також розглядаються в об'ємі даного винаходу.

Гомобіфункціональні молекули містять, принаймні, дві однакові реакційноздатні функціональні групи. Реакційноздатні функціональні групи гомобіфункціональної молекули включають, наприклад, альдегідні групи і активні складноєфірні групи. Гомобіфункціональні молекули, що містять альдегідні групи, включають, наприклад, глутаральдегід і субаральдегід. Використання глутаральдегіду як зшиваючого агента розкрито Poznansky et al., *Science* 223, 1304-1306 (1984). Гомобіфункціональні молекули, що містять, принаймні, два активних складноєфірних фрагменти, включають складний ефір дикарбонових кислот і N-гідроксисукциніміду. Деякі приклади такого N-сукцинімідильних складних ефірів включають дисукцинімідилсуберат і дитіо-біс-сукцинімідилпропіонат, і їх розчинні сполуки з біс-сульфоновою кислотою і біс-сульфонати, такі як їх натрієві і калієві солі. Ці гомобіфункціональні реагенти доступні від Pierce, Rockford, Illinois.

Гетеробіфункціональні молекули містять, принаймні, дві різні реакційноздатні групи. Реакційноздатні групи реагують з різними функціональними групами, наприклад, присутніми в ЕРО, і в молекулі. Ці дві різні функціональні групи, які реагують з реакційноздатною групою гетеробіфункціонального зшиваючого агента, звичайно є аміногрупою, наприклад, епсилон-аміногрупою лізину; сульфгідрильною групою, наприклад, тіольною групою цистеїну; карбоною кислотою, наприклад, карбоксилатом аспарагінової кислоти; або гідроксильною групою, наприклад, гідроксильною групою серину.

Якщо реакційноздатна група гетеробіфункціональної молекули утворить ковалентний зв'язок з аміногрупою, такий ковалентний зв'язок звичайно буває амідом або імідом зв'язком. Реакційноздатна група, яка утворює ковалентний зв'язок з аміногрупою, може бути, наприклад, активованою карбоксилатною групою, галогенкарбонільною групою, або складноефірною групою. Переважною галогенкарбонільною групою є хлоркарбонільна група. Складноефірні групи є, переважно реакційноздатними складноефірними групами, такими як, наприклад, N-гідроксисукцинімідна складноефірна група.

Іншою функціональною групою звичайно є або тіольна група, або група, здатна перетворюватися в тіольну групу, або група, яка утворює ковалентний зв'язок з тіольною групою. Ковалентний зв'язок звичайно є тіоефірним зв'язком або дисульфідним зв'язком. Реакційноздатна група, яка утворює ковалентний зв'язок з тіольною групою, може бути, наприклад, подвійним зв'язком, який реагує з тіольними групами або активованими дисульфідами. Реакційноздатна група, що містить подвійний зв'язок, здатний взаємодіяти з тіольною групою, є малеїмідною групою, хоча можливі і інші, такі, як акрилонітрил. Реакційноздатна дисульфідна група може бути, наприклад, 2-піридилдитіогрупою, або групою 5,5'-дитіо-біс-(2-нітробензойної кислоти). Деякі приклади гетеробіфункціональних реагентів, що містять реакційноздатні дисульфідні зв'язки, включають N-сукцинімідил 3-(2-піридилдитіо)пропіонат (Carlsson et al., 1978, *Biochem. J.*, 173: 723-737), натрій 5-4-сукцинімідил-оксикарбоніл-альфа-метилбензилтіосульфат, і 4-сукцинімідил-оксикарбоніл-альфа-метилетил(2-піридилдитіо)толуол. N-сукцинімідил 3-(2-піридилдитіо)пропіонат переважний. Деякі приклади гетеробіфункціональних реагентів, що включають реакційноздатні групи, що містять подвійний зв'язок, який взаємодіє з тіольною групою, включають сукцинімідил 4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат і сукцинімідил м-малеїмідобензоат.

Інші гетеробіфункціональні молекули включають сукцинімідил 3-(малеїмідометил)пропіонат, сульфосукцинімідил 4-(п-малеїмідометил)бутират, сульфосукцинімідил 4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат, складний ефір малеїмідобензоїл-N-гідроксисукциніміду. Переважна натрійсульфонатна сіль сукцинімідил м-малеїмідобензоату. Багато які з вищезгаданих гетеробіфункціональних реагентів і їх сульфонатні солі доступні від Pierce.

Фахівці можуть легко визначити, чи є вищезгадані кон'югати оборотними або лабільними. Кон'югати можна тестувати *in vitro* як на модуляторну активність стосовно ЕРО рецепторної активності, так і на необхідну фармакологічну активність. Якщо кон'югат зберігає обидві ці властивості, його, відповідно можна тестувати *in vivo*. Якщо для активності молекули кон'югата необхідне його відділення від ЕРО, переважний лабільний зв'язок або оборотна асоціація з ЕРО. Характеристика лабільності можна також протестувати, використовуючи стандартні *in vitro* процедури перед тестуванням *in vivo*.

Додаткову інформацію стосовно того, як одержати і використати ці і інші поліфункціональні реагенти, можна одержати з наступних публікацій, або інших доступних фахівцям: Carlsson et al., 1978, *Biochem. J.* 173: 723-737; Cumber et al., 1985, *Methods in Enzymology* 112: 207-224; Jue et al., 1978, *Biochem. J.* 17: 5399-5405; Sun et al., 1974, *Biochem. J.* 13: 2334-2340; Blattler et al., 1985, *Biochem. J.* 24: 1517-152; Liu et al., 1979, *Biochem. J.* 18: 690-697; Youle and Neville, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 5483-5486; Lemer et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 3403-3407; Jung and Moroi, 1983, *Biochem. Biophys. Acta* 761: 162; Caulfield et al., 1984, *Biochem. J.* 81: 7772-7776; Staros, J.V., 1982, *Biochem. J.* 21: 3950-3955; Yoshitake et al., 1979, *Eur. J. Biochem.* 101: 395-399; Yoshitake et al., 1982, *J. Biochem.* 92: 1413-1424; Pilch and Czech, 1979, *J. Biol. Chem.* 254: 3375-3381; Novick et al., 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 8483-8487; Lomant and Fairbanks, 1976, *J. Mol. Biol.* 104: 243-261; Hamada and Tsurao, 1987, *Anal. Biochem.* 160: 483-488; and Hashida, 1984, *J. Applied Biochem.* 6: 56-63. Додатково способи здійснення зшивань можна знайти в огляді Means and Feeney, 1990, *Bioconjugate Chem.* 1: 2-12. Бар'єри, які можна подолати, використовуючи вищеприказані способи і композиції, даного винаходу, включають (але ними не обмежуються): гематоенцефалічний бар'єр, гематоофтальмічний бар'єр, бар'єр між кровоносною системою і сім'яниками, бар'єр між кровоносною системою і яєчниками і плацентарний бар'єр.

Відповідні молекули для транспорту через бар'єр ендотеліальних клітин включають, наприклад, гормони, такі як гормони росту, нейротрофічний фактор, антибіотики або протигрибкові агенти, такі як ті, які звичайно виключені з мозку і інших органів, які обмежені бар'єрами, пептидні радіофармацевтичні агенти, антисмислові ліки, антитіла до біологічно активних агентів, фармацевтичні і протиракові агенти. Нелімітуючі приклади таких молекул включають гормон росту, фактор росту нервів (NGF), одержаний з мозку нейротрофічний фактор (BNF), циліарний нейротрофічний фактор (CTF), основний фактор росту фібробластів (bFGF), що трансформує фактор росту  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ), що трансформує фактор росту  $\beta 2$  (TGF $\beta 2$ ), що трансформує фактор росту  $\beta 3$  (TGF $\beta 3$ ), інтерлейкін 1, інтерлейкін 2, інтерлейкін 3, і інтерлейкін 6, AZT, антитіла до фактора некрозу пухлини і імуноспівпроцесори, такі як циклоспорин.

У іншому варіанті для терапевтичного доставлення токсинів для лікування вірусних захворювань або проліферативних захворювань, таких як рак, можна використати рекомбінантні химеричні молекули токсинів, що включають ЕРО. Сполуки, які можна об'єднувати з ЕРО для створення химеричного токсину, який можна використати в такому варіанті, включають (але ними не обмежуються) токсичні речовини, такі як екзотоксин *pseudomonas*, токсин дифтерії і рицин, нарівні з іншими.

### 5.3. Необхідні умови

Як було розкрито раніше, запропоновані тут ЕРО композиції і способи їх застосування можна використати для лікування і профілактики станів, причиною яких є умови гіпоксії, які шкідливо впливають на тканини, що збуджуються, такі як тканини центральної нервової системи, тканини периферійної нервової системи, або кардіальні тканини, такі як, наприклад, тканини мозку, серця або сітчастої оболонки. Тому даний винахід можна використати для лікування або профілактики пошкоджень тканини, що збуджується, які виникають в результаті гіпоксії в різних станах і при різних обставинах. Не лімітуючі приклади таких станів і обставин приводяться далі.

Приклад захисту нейрональних тканин патології, які можна лікувати відповідно з даним винаходом, включає такі патології, які є результатом зниженого доставлення кисню нейрональних тканин. Будь-які стани, які приводять до зниження доступу кисню до нейрональних тканин, що приводять в результаті до стресу, пошкодження, і, зрештою, до загибелі нейрональних клітин, можна лікувати способами даного винаходу. Звичайно звані гіпоксією або ішемією, такі стани виникають із-за, або включають (але ними не обмежуються) удар, закупорку судин, пренатальну або пост-натальну недостатність кисню, удушення, удушення, майже утоплення, отруєння окисом вуглецю, вдихання диму, травму, включаючи хірургічне втручання і радіотерапію, асфікцію, епілепсію, гіпоглікемію, хронічні обструктивні легеневі захворювання, емфізему, синдром дихальної недостатності у дорослих, гіпертонічний шок, септичний шок, анафілактичний шок, серпасто-клітинну анемію, зупинку серця і азотний наркоз.

У одному з варіантів, наприклад, ЕРО можна вводити для запобігання ураженням або пошкодженням тканин, які можуть виникнути внаслідок ризику ураження або пошкодження тканин під час хірургічних процедур таких як наприклад, видалення пухлини або видалення аневризми.

Інші патології, викликані гіпоглікемією, або що є її результатом, які можна лікувати описаними тут способами, включають передозування інсуліну, звану також ятрогенною гіперинсулемією, інсуліномою, дефіцитом гормону росту, гіперкортизолізмом, передозуванням ліків, і деякими пухлинами.

Інші патології, які виникають внаслідок пошкодження нейрональних тканин, що збуджуються, включають такі напади, як епілепсія, судом, або хронічні напади. Інші стани і захворювання, які можна лікувати, включають такі захворювання як удар, розсіяний склероз, гіпертонію, зупинку серця,

хворобу Альцгеймера, хворобу Паркінсона, церебральний параліч, травму головного або спинного мозку, AIDS деменцію, вікову втрату пізнавальної функції, втрату пам'яті, бічний аміотрофічний склероз, напади, алкоголізм, ішемію сітчатки, пошкодження очного нерва в результаті глаукоми, і загибель нервів.

Способи даного винаходу можна використати для лікування хворобливих станів і пошкоджених тканин сітчатки. Такі захворювання включають (але ними не обмежуються) жовті плями на сітчатці, відшарування сітчатки, пігментний ретиніт, атеросклеротичну ретинопатію, гіпертонічну ретинопатію, блокаду артерії сітчатки, блокаду вен сітчатки, гіпотензію і діабетичну ретинопатію.

У іншому варіанті способи даного винаходу можна використати для захисту або лікування уражень, викликаних радіаційними ураженнями тканин, що збуджуються.

Подальше застосування способів даного винаходу складається в лікуванні отруєнь нейротоксинами, таких як отруєння домоєвою кислотою молюсків, нейролатиризм, гуамська (Guam) хвороба, бічний аміотрофічний склероз і хвороба Паркінсона.

Як було указано раніше, даний винахід стосується також способу посилення функцій тканин, що збуджуються у ссавців за рахунок периферійного введення еритропоетину. Різні стани і захворювання піддаються лікуванню з використанням цього способу, і, крім того, цей спосіб можна використати для посилення пізнавальної функції при відсутності будь-яких хворобливих станів або захворювань. Ці застосування даного винаходу розкриті далі більш детально, і вони включають поліпшення навчання і тренування як у людей, так і у інших ссавців.

Хворобливі стани і захворювання, що піддаються лікуванню способами цього аспекту даного винаходу, що стосуються центральної нервової системи, включають (але ними не обмежуються) розлади настрою, неспокій, депресію, аутизм, дефіцит уваги, гіперактивність і пізнавальну дисфункцію. На ці стани сприятливо впливає підвищення нейрональних функцій.

Інші захворювання, які піддаються лікуванню способами даного винаходу, включають порушення сну, наприклад, зупинку дихання під час сну, і розлади, пов'язані з подорожами; субарахноїдальна і аневризмальна кровотеча, гіпертонічний шок, контузії, септичний шок, анафілактичний шок, і наслідки різного енцефаліту і менінгіту, наприклад, запалення мозкових тканин, пов'язані із захворюваннями з'єднувальної тканини, такими як вовчанка. Інші застосування включають профілактику або захист від нейротоксинів, таких як отруєння домоєвою кислотою молюсків, нейролатиризм і гуамська хвороба, бічний аміотрофічний склероз, хвороба Паркінсона; післяопераційне лікування емболічних або ішемічних уражень; опромінення всього мозку; анемію серпастих клітин і екламписю.

Наступна група станів, що піддаються лікуванню способами даного винаходу, включає мітохондріальні дисфункції, як спадкові, так і придбані, які є причиною різних неврологічних захворювань,

прикладами яких є ураження і загибель нейронів., Наприклад, хвороба Лея (Liegh) (субгостра некротуюча енцефалопатія) характеризується прогресуючою втратою зору і енцефалопатією, внаслідок втрати нейронів, і міопатією. У цих випадках дефективний мітохондріальний метаболізм виявляється не в змозі доставити достатню кількість високо-енергетичних речовин для забезпечення метаболізму клітин, що збуджуються. Модулятори активності ЕРО рецепторів оптимізують недостатні функції при різних мітохондріальних захворюваннях.

Як було показано вище, стани гіпоксії шкідливо впливають на тканини, що збуджуються. Тканини, що збуджуються включають (але ними не обмежуються) тканини центральної нервової системи, тканини периферійної нервової системи і тканини серця. У доповнення до вказаних вище станів, способи даного винаходу застосовні для лікування отруєнь дихальних шляхів, таких як вдихання окису вуглецю і диму, приступи астми, респіраторний дистрес-синдром дорослих, удушення і майже утоплення. Інші стани, які створюють стан гіпоксії, або іншими способами викликають пошкодження тканин, що збуджуються, включають гіпоглікемію, яка може бути викликана неправильними дозами інсуліну, або продукує інсулін неоплазмами (інсуліномами).

Способами даного винаходу можна лікувати різні нейрофізіологічні порушення, які, як вважають, виникають внаслідок пошкодження тканин, що збуджуються. Хронічні захворювання, які можуть бути пов'язані з пошкодженнями нейронів, і які можна лікувати способами даного винаходу, включають захворювання, пов'язані з центральною нервовою системою і/або периферійною нервовою системою, включаючи вікову втрату пізнавальної функції і старечу деменцію, хронічні приступи, хворобу Альцгеймера, хворобу Паркінсона, деменцію, втрату пам'яті, бічний аміотрофічний склероз, розсіяний склероз, туберозний склероз, хворобу Вілсона, церебральний і прогресуючий супрануклеарний параліч, гуамську хворобу, Lewy деменцію, хвороби, що викликаються пріонами, такі як губчасті енцефалопатії, наприклад, хвороба Крейтцфельда-Якоба, хвороба Хантінгтона, міотонічна дистрофія, атаксія Фрідріха і інші атаксії, а також синдром Gilles de la Tourette's, захворювання, пов'язані з нападами, такими як епілепсія і хронічні напади, удар, травми головного і спинного мозку, AIDS деменцію, алкоголізм, аутизм, ретинальну ішемію, глаукому, порушення автономних функцій, таких як гіпертонія і порушення сну, які включають (але ними не обмежуються) шизофренію, шизоафективні розлади, дефіцит уваги, дистимічний розлад, основний депресивний розлад, манії, обсесивно-компульсивний розлад, розлади, пов'язані з використанням психоактивних речовин, неспокій, паніку, а також однополярні або біполярні афективні розлади. Додаткові нейропсихіатричні і нейродегенеративні розлади включають, наприклад, ті, які перераховані в American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical manual of Mental Disorders

(DSM), сама остання версія якого включена сюди як посилання.

У іншому варіанті рекомбінантні химеричні молекули токсинів, що включають ЕРО, можна використати для терапевтичного доставляння токсинів для лікування проліферативних захворювань, таких як рак, або вірусних захворювань, таких як підгострий склерозуючий паненцефаліт.

#### 5.4. Фармацевтичні препарати і їх введення

Відповідно з даним винаходом, ЕРО, його аналоги, міметики, фрагменти еритропоетину, гібридні молекули еритропоетину, молекули, зв'язуючі рецептори еритропоетину, агоністи еритропоетину, ниркоподібний еритропоетин, еритропоетини мозку, їх мутанти, і що стосуються цього класу, можна вводити парентерально, через слизову, наприклад, перорально, назально, ректально, внутрішньовагінально, під язик, під слизову або через шкіру. Переважним способом введення є парентеральне введення, наприклад, за допомогою внутрішньовенної або внутрішньоочеревинної ін'єкції, включаючи також (але цим не обмежуючись) внутрішньоартеріальне, внутрішньом'язове, внутрішньошкірне або підшкірне введення. Переважним способом введення невеликих молекул імітаторів ЕРО є пероральне введення.

Суб'єктом, для якого периферійне введення ЕРО є ефективним терапевтичним режимом, переважно є людина, але це може бути і будь-яка тварина, переважний ссавець. Таким чином, як легко зрозуміти фахівцям, способи і фармацевтичні композиції даного винаходу особливо придатні для введення будь-якій тварині, особливо ссавцю, включаючи (але ними не обмежуючись) домашніх тваринних, таких як кішки і собаки, сільськогосподарських тварин, таких як (але ними не обмежуючись) корови, коні, кози, вівці і свині; диких тварин (незалежно від того, зустрічаються вони в дикій природі або в зоологічному саду), тварин, що використовуються для наукових досліджень, таких як миші, пацюки, кролики, кози, вівці, свині, собаки, кішки і т.д. Як було показано вище, одомашнені тварини, включаючи домашніх тварин і робоча худоба, є кандидатами як для з'ясування нейрозахисних переваг даного винаходу, так і для оцінки посилення пізнавальних функцій. Нейрологічні ураження, зумовлені гіпоксією, а також гострі і хронічні розлади, включаючи епілепсію, є звичайним явищем серед таких тварин, і таким чином вони є кандидатами для лікування Крім того, як показано вище, посилення пізнавальних функцій у тварин (не людей) є перевагою даного винаходу, в тому, що навчання, тренування, і збереження вивченої поведінки можна поліпшити, закріпити і зберегти, використовуючи напучення даного винаходу. У результаті витрати і психологічні зусилля власника домашніх улюбленців знижуються. Наприклад, меншає, час, необхідний для тренування собак і інших домашніх тварин. Крім того, дикі тварини, яких звичайно буває важко тренувати, можуть виявитися кращими кандидатами для тренування за способом даного винаходу.

##### 5.4.1. Композиція і ефективна доза

У даному винаході запропоновані також фармацевтичні композиції. Фармацевтичні композиції,

що включають ЕРО і модулятор активності ЕРО рецепторів можна вводити пацієнту в терапевтично-ефективних дозах для захисту тканини, що збуджується від пошкоджень, для посилення функцій тканини, що збуджується, або для доставляння сполуки до тканини, що збуджується. Заявники виявили, що підвищена доза ЕРО переважна для модулювання тканини, що збуджується і для захисту її від ураження.

Вибір переважної ефективної дози визначає фахівець з урахуванням декількох факторів, які повинні бути відомі фахівцеві. Такі фактори включають конкретну форму еритропоєтину і її фармакокінетичні параметри, такі як біодоступність, метаболізм, термін напіврозпаду і т.д., які повинні бути встановлені під час звичайних процедур, які звичайно використовують для одержання регулюючих дозволів для фармацевтичних сполук. Інші фактори, що розглядаються для встановлення дози включають хворобливий стан або захворювання, що підлягає лікуванню, або переваги, яких необхідно досягти для здорового індивідуума, масу тіла пацієнта, спосіб введення, чи проводиться введення в гострий або в хронічний період, супутнє лікування і інші фактори, які, як добре відомо, впливають на ефективність фармацевтичних агентів, що вводяться. Таким чином, точні розміри дози повинні визначатися відповідно з думкою практикуючого лікаря і супутніх кожному пацієнту обставин, наприклад, в залежності від стану і імунного статусу кожного пацієнта, відповідно стандартній клінічній практиці.

У одному варіанті в даному винаході запропонована фармацевтична композиція в одиничній дозованій формі, адаптована для модуляції тканини, що збуджується, посилення пізнавальної функції, або для доставляння сполук через ендотеліальні щільні сполуки, яка включає в одиничній дозі ефективну нетоксичну кількість в інтервалі від біля 50000 до 500000 Одиниць, від 60000 до 500000 Одиниць, від 70000 до 500000 Одиниць, від 80000 до 500000 Одиниць, від 90000 до 500000 Одиниць, від 100000 до 500000 Одиниць, від 150000 до 500000 Одиниць, від 200000 до 500000 Одиниць, від 250000 до 500000 Одиниць, від 300000 до 500000 Одиниць, від 350000 до 500000 Одиниць, від 400000 до 500000 Одиниць, або від 450000 до 500000 Одиниць ЕРО, модулятора активності рецепторів ЕРО, або модулятора ЕРО-активованого рецептора, і фармацевтично прийнятний носій. У переважному варіанті ефективна нетоксична кількість ЕРО знаходиться в інтервалі від біля 500000 до 5000000 Одиниць.

У одному варіанті таку фармацевтичну композицію ЕРО можна вводити систематично для захисту тканин, що збуджуються від уражень, посилення функцій тканин, що пошкоджуються, або для доставляння сполук до тканин, що збуджуються. Таке введення можна здійснювати парентерально, через слизову, наприклад, перорально, через ніс, ректально, внутрішньовагінально, під язик, під слизову або черезшкірно. Переважним способом введення є парентеральне, наприклад, за допомогою внутрішньовенних або внутрішньоочеревинних ін'єкцій, і також включаючи (але ними не об-

межуючись) внутрішньоартеріальне, внутрішньом'язове, внутрішньошкірне і підшкірне введення.

У переважному варіанті ЕРО можна вводити систематично в дозах від 2000 до 10000 одиниць/кг маси тіла, переважно біля 2000-5000 одиниць/кг маси тіла, і найбільш переважно 5000 одиниць/кг маси тіла, за один раз. Цієї ефективної дози повинно бути досить для досягнення рівнів ЕРО в сироватці більше ніж біля 10000, 15000 або 20000 мод/мл сироватки після введення ЕРО. Такі рівні вмісту ЕРО в сироватці можуть бути досягнуті приблизно через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 годин після введення. При необхідності такі дози можна повторювати. Наприклад, введення можна повторювати щодня доти, поки існує клінічна необхідність, або після відповідних інтервалів, наприклад, кожні 1-12 тижнів, переважно кожні 3-8 тижнів. У одному з варіантів ефективну кількість ЕРО і фармацевтично прийнятного носія можна вмістити в одну дозову ампулу або інший контейнер. У одному з варіантів ЕРО є нееритропоєтичним, тобто він здатний виявляти вказану вище активність, але не спричиняє при цьому підвищення концентрації гемоглобіну, або не викликати гематокрит. У іншому варіанті ЕРО вводять в дозі, яка перевищує дозу, необхідну для максимальної стимуляції еритропоезу.

Фармацевтичні композиції даного винаходу можуть включати терапевтично ефективну кількість сполуки і фармацевтично прийнятного носія. У конкретному варіанті термін "фармацевтично прийнятний" означає затверджений регулюючим органом федерального уряду або уряду штату, або перерахований в фармакопеї США або інших загальновідомих фармакопіях для використання для тварин, і більш конкретно, для людей. Термін "носій" стосується розчинювача, ад'юванта, ексципієнта або носія, з якими вводять ліки. Такі фармацевтичні носії можуть бути стерильними рідинами, такими як сольові розчини у воді або маслах, включаючи мінеральні, тваринні, рослинні або синтетичні масла, такі як арахісове масло, соєва молія, мінеральне масло, кунжутна олія і т.п. Сольовий фізіологічний розчин є переважним носієм, якщо фармацевтичну композицію вводять внутрішньовенно. Фізіологічні сольові розчини і водні розчини декстрази і гліцерину можна також використати як рідкі носії, особливо для розчинів для ін'єкцій. Відповідні фармацевтичні ексципієнти включають крохмаль, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, крейду, силікагель, стеарат натрію, моностеарат гліцерину, тальк, хлорид натрію, сухе знежирене молоко, гліцерин, пропіленгліколь, воду, етанол і т.п. При бажанні композиція може також містити невеликі кількості змочувальних і емульгуючих агентів або агентів, буферуючих величину рН. Такі композиції можуть бути в формі розчинів, суспензій, емульсій, таблеток, пілюль, капсул, порошків, композицій з уповільненим виділенням активної речовини і т.п. Композиції можуть бути приготовані в формі супозиторій з традиційними зв'язуючими і носіями, такими як тригліцериди. Сполуки даного винаходу можуть бути в нейтральній формі або в формі со-

лей. Фармацевтично прийнятні солі включають солі, утворені з вільними аміногрупами, як ті, які одержані з хлористоводневої, фосфорної, оцтової, щавлевої, винної кислотами і т.п., і ті, які утворені з вільною карбоксильною групою, такі, які одержані з гідроксидами натрію, калію, амонію, кальцію, заліза, ізопропіламіном, триетиламіном, 2-етиламіноетанолом, гістидином, прокаїном і т.д. Приклади відповідних фармацевтичних носіїв розкриті в "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin. Такі композиції повинні містити терапевтично ефективну кількість сполуки, переважно в чистому вигляді, разом з відповідною кількістю носія, з тим, щоб забезпечити потрібну форму для відповідного введення пацієнту. Композиція повинна відповідати способу введення.

Фармацевтичні композиції, адаптовані для перорального введення, можуть бути представлені у вигляді капсул або таблеток; у вигляді порошків або гранул; у вигляді розчинів, сиропів або суспензій (у водних або не водних рідинах); у вигляді їстівних пінок або кремів; або у вигляді емульсій. Таблетки або тверді желатинові капсули можуть містити лактозу, крохмаль або їх похідні; стеарат магнію, натрійсахарин, целюлозу, карбонат магнію, стеаринову кислоту або їх солі. М'які желатинові капсули можуть включати рослинні масла, віск, жири, напівтверді або рідкі поліюлі і т.д. Розчини і сиропи можуть містити воду, поліюлі і цукор.

Активний агент, призначений для перорального введення, може бути покритий (або може бути в суміші з) матеріалом, який сповільнює руйнування і/або абсорбцію активного агента в шлунково-кишковому тракті (наприклад, гліцерил моностеарат або гліцерил дистеарат). Так, можна досягнути уповільненого виділення активного агента протягом багатьох годин і, при необхідності, активний агент можна захистити від розкладання всередині шлунка. Фармацевтичні композиції для перорального введення можуть бути створені так, щоб полегшити виділення активного агента в конкретному, місці шлунково-кишкового тракту за рахунок специфічних значень рН або умов ферментування.

Фармацевтичні композиції, адаптовані для чerezшкірного введення можуть бути представлені у вигляді окремих пластирів, які повинні залишатися в тісному контакті з епідермісом реципієнта протягом тривалого проміжку часу. Фармацевтичні композиції, адаптовані для зовнішнього застосування, можуть бути представлені у вигляді мазей, кремів, суспензій, лосьйонів, порошків, розчинів, паст, гелей, спреїв, аерозолей або масел для поверхневого нанесення на шкіру, рот, очі або інші зовнішні тканини, звичайно використовують мазь для зовнішнього застосування або крем. Якщо композиція приготована у вигляді мазі, активний інгредієнт може бути використаний або з парафіновою, або з мазевою основою, що змішується з водою. У іншому варіанті активний інгредієнт може бути введений в крем на основі масла-в-воді або води-в-маслі. Фармацевтичні композиції, адаптовані для зовнішнього введення для очей, включають очні краплі. У цих композиціях активний інгредієнт може бути розчинений або суспендований у відпові-

дному носії, наприклад, у водному розчинювачі. Фармацевтичні композиції, адаптовані для поверхневого введення в рот, включають коржик, пастилки і полоскання для рота.

Фармацевтичні композиції, адаптовані для введення через ніс, можуть включати тверді носії, такі як порошки (переважно з розміром частинок в інтервалі від 20 до 500мкм). Порошки можна вводити шляхом вдихання через ніс, тобто швидкою інгаляцією через ніс з контейнера з порошком, який тримають близько до носа. У іншому варіанті композиції, адаптовані для введення через ніс, можуть містити рідкий носій, наприклад спреї для носа або краплі для носа. Ці композиції можуть включати водні або масляні розчини активного інгредієнта. Композиції для введення шляхом інгаляції можуть постачатися в спеціальних пристроях, включаючи (але ними не обмежуючись) аерозолі під тиском, розпилювачі або пристрої для вдихання, які можуть бути сконструйовані таким чином, щоб забезпечити певну дозу активного інгредієнта. У переважному варіанті фармацевтичні композиції даного винаходу вводять через носову порожнину в легені.

Фармацевтичні композиції, адаптовані для ректального введення, можуть бути представлені у вигляді супозиторій або клізм. Фармацевтичні композиції, адаптовані для вагінального введення, можуть бути представлені композиціями у вигляді песарій, тампонів, кремів, гелей, паст, пінок або спреїв.

Фармацевтичні композиції, адаптовані для парентерального введення, включають водні і не водні стерильні розчини або суспензії для ін'єкцій, які можуть містити антиоксиданти, буфери, бактеріостати і розчинені речовини, які роблять композиції практично ізотонічними з кров'ю передбачуваного реципієнта. Інші компоненти, які можуть бути присутнім в таких композиціях, включаючи, наприклад воду, спирти, поліюлі, гліцерин і рослинні масла. Композиції, адаптовані для парентерального введення, можуть бути представлені в контейнерах, що містять одиничну або множинні дози, наприклад, в запаяних ампулах і пробірках, і можуть зберігатися у висушеному заморожуваному (ліофілізованому) стані, і при цьому безпосередньо перед використанням необхідно всього лише додати стерильний рідкий носій, наприклад, стерильний фізіологічний сольовий розчин для ін'єкцій. Розчини і суспензії для негайного введення можна приготувати з стерильних порошків, гранул або таблеток.

У переважному варіанті композиції приготовляють відповідно до рутинних процедур приготування фармацевтичних композицій, адаптованих для внутрішньовенного введення людям. Звичайно композиції для внутрішньовенного введення є розчинами в стерильних ізотонічних водних буферах. При необхідності композиції можуть також включати сприяючі розчиненню агенти і локальні анестезуючі агенти, такі як лідокаїн, для полегшення болю на ділянці ін'єкції. Звичайно інгредієнти постачають або окремо, або змішаними разом в одиничній дозовій формі, наприклад, у вигляді сухого ліофілізованого порошку, або концентрату,

що не містить води в герметизованих контейнерах, таких як ампули або саше, з зазначенням кількості активного агента. Якщо композиції вводять за допомогою вдування, вони можуть бути розподілені у флакони для вдування, які містять стерильної чистоти воду або фізіологічний сольовий, розчин. Якщо композицію вводять за допомогою ін'єкції, ампула зі стерильною водою або фізіологічним розчином для ін'єкції може бути представлена такою, щоб інгредієнти можна було змішувати перед введенням.

Супозиторії звичайно містять активний інгредієнт в інтервалі від 0,5 до 10ваг.%; композиції для перорального введення переважно містять від 10 до 95ваг.% активного інгредієнта.

У даному винаході запропоновані також фармацевтична упаковка або набір, що включає один або більше контейнерів, заповнені одним або більше інгредієнтів фармацевтичної композиції даного винаходу. Необов'язково такий контейнер (контейнери) супроводяться анотацією в формі, наказаній урядовим агентством, регулюючим виробництво, застосування і продаж фармацевтичних або біологічних продуктів, причому в цій анотації відображене затвердження агентством виготовлення, застосування або продажу для введення людям.

#### 5.4.2. Способи введення

У даному винаході запропоновані композиції і способи периферійного введення, ЕРО для посилення функцій або захисту тканин, що збуджуються і для доставляння сполук до таких тканин. Як було вказано вище, даний винахід заснований частково на виявленні того факту, що периферійно введені ЕРО мають безпосередні нейрозахисні або нейропідсилюючі властивості в тканинах, що збуджуються, таких як тканини центральної нервової системи, тканини периферійної нервової системи або тканин серця. Тканини, що збуджуються, в тому значенні як тут використаний цей термін, включають (але ними не обмежуються) нейрональні тканини центральної і периферійної нервових систем і тканини серця. У цьому розділі розкриті такі сполуки і способи їх введення.

Даний винахід пропонує введення ЕРО і модулаторів активності ЕРО способом введення, який відрізняється від безпосереднього введення в центральну нервову систему, і терміни "периферійна" і "системна" включають ці різні способи. Периферійне введення включає пероральне або парентеральне введення, таке як внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, підшкірне, внутрішньом'язове, внутрішньоочеревинне, ректальне, під слизову або внутрішньошкірне. Інші способи придатні для введення описаних вище агентів. Тут запропоновано введення як в гострих випадках, так і при хронічних захворюваннях.

У одному з варіантів, наприклад, ЕРО можна доставляти в системі з виділенням, що контролюється. Наприклад, поліпептид можна вводити, використовуючи внутрішньовенні вливання, осмотичні насоси, що імплантуються, черезшкірні пластирі, ліпосоми або інші способи введення. У одному з варіантів можна використати насос (див. Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomecl

Eng. 14: 201; Buchwald et al., 1980, Surgery 88: 507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574). У іншому варіанті сполуки можна доставити в носії, зокрема в ліпосомі (див. 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; патент США No.4704355; Lopez-Berestein, ibid., pp.317-327; see generally ibid.). У іншому варіанті можна використати полімерні матеріали [див. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, Florida, 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley: New York (1984); Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61, 1953; див також Levy et al., 1985, Science 228: 190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 7.1: 105).

У ще одному варіанті систему з системою виділення, що контролюється можна вмістити поблизу терапевтичної цілі, тобто поблизу мозку, що зажадає лише частину системної дози (див., наприклад, Goodson, pp.115-138 in Medical Applications of Controlled Release, vol.2, supra, 1984). Інші системи з виділенням, що контролюється розкриті в огляді Longer (1990, Science 249: 1527-1533).

У іншому варіанті ЕРО у відповідній формі можна вводити через ніс, перорально, ректально, вагінально або сублінгвально.

У специфічному варіанті може виявитися бажаним вводити ЕРО композиції даного винаходу локально в ділянку, що потребує лікування; цього можна досягти, наприклад (але не як обмеження) локальним вливанням під час хірургічного втручання, поверхневим нанесенням, наприклад, разом з пов'язкою на рану після операції, шляхом ін'єкції за допомогою катетера, за допомогою супозиторій або використовуючи імпланти, причому вказані імпланти є пористим або не пористим матеріалом, включаючи сіаластикові мембрани або волокна.

Даний винахід можна краще зрозуміти, звернувшись до наступних, не лімітуючих прикладів, які представлені як приклади винаходу. Наступні приклади представлені для того, щоб більш повно проілюструвати переважні варіанти винаходу. Однак їх ніяким чином не потрібно розглядати, як обмежуючі широту об'єму винаходу.

Як тут буде розкрито далі, дослідження, які були розпочаті винахідниками, є стандартними, загальноприйнятими тестами в моделях на тваринах, які дозволяють передбачити профілактичні і лікувальні переваги.

#### 6. Приклад 1

Периферійне введення його підвищує пізнавальну функцію

У цьому прикладі експеримент за просторовою орієнтацією, відомий як тест водного лабірину Морріса, демонструє ЕРО-індуковане посилення пізнавальної функції у мишей. У цьому тесті невелику прозору платформу вміщують в один сектор плавального басейну з непрозорою водою. Миші, вміщені в плавальний басейн, повинні пливати до-



ти, поки вони не досягнуть платформи для відпочинку, поверхні, що знаходиться нижче, яка невидима для пливучих мишей. Тест зводиться до визначення часу, який потрібний тварині, щоб досягти платформи (тобто проміжку часу, який вони проводять плаваючи). У послідовних дослідах час, необхідний для кожної миші для досягнення платформи, буде зменшуватися як функція пізнання ними місцеположення. Цей тип експерименту по навчанню включає гіпокамп, оскільки ураження гіпокампа заважають навчанню в цьому тесті.

Експерименти проводять в круглому чорному басейні діаметром 150см. Довільно визначають чотири точки: північ, південь, захід і схід. Виразні візуальні мітки розташовують біля кожного з чотирьох секторів: наприклад спалахи світла, яскрава стрічка, вміщена в сектор, і т.д. для орієнтування мишей в басейні. Платформу довільно вміщують в один з секторів. Дослід полягає в тому, що тварину вміщують вперед головою в один з секторів басейну і відпускають. Тривалість досліду складає всього 90 секунд. Якщо тварина сама не досягає платформи, її вміщують на платформу ще на 15 секунд. Випробувані відпочивають протягом години, потім їх вміщують для тестування в інший сектор. Протягом денного досліду використовують всі 4 сектори, і тварин тестують протягом 12 послідовних днів (тобто всього 48 дослідів)

Сам експеримент складається у введенні мишам за допомогою внутрішньоочеревинної ін'єкції 5000 Одиниць/кг рекомбінантного людського ЕРО (в продажу під торговою маркою PROCRIT, Ortho-Biotech, Inc.) за 4 години до щоденного тестування, кожний день протягом 12 днів дослідів. Контрольним тваринам ін'єкують сольовий фізіологічний розчин (імітатор).

Міру навчання визначають, вимірюючи тривалість часу, який кожна з мишей проводить на платформі. На Фіг.1А одержані результати представлені як діаграма часу, проведеного на платформі ЕРО-обробленою групою, і групою з ін'єкцією імітатора. Одержані результати показують, що обидві групи тварин проводять на платформі більше часу, тобто вони навчаються більш швидкому досягненню платформи з кожним послідовним днем навчання, але тварини, яким вводили ЕРО, роблять це швидше за групу з ін'єкцією імітатора. Тобто у оброблених ЕРО тварин спостерігається набагато більш швидка "крива навчання", ніж для групи з ін'єкцією імітатора. Якщо виразити результати як різницю між ЕРО-обробленою групою і групою з ін'єкцією імітатора і порівняти результати для цих двох груп, лінія регресії ( $R^2=0,88$ ) показує нахил (0,68), помітно відрізняється від нахилу 1, що явно свідчить на користь ЕРО групи (Фіг.1В).

#### 7. Приклад 2

Периферійне введення ЕРО посилює навчання в стандартному тесті смакової огиди

Стандартний тест смакової огиди (СТА), здійснений в цьому прикладі, демонструє, що ЕРО різко впливає на здатність мишей до запам'ятовування і навчання уникати відчуттів неприємного смаку, в цьому випадку речовини, що викликає хворобливе почуття. У цьому прикладі хлорид літію використо-

вують для того, щоб викликати СТА, оскільки хлорид літію надійно спричиняє нездужання і анорексію дозозалежним чином. Подібно природному хворобливому стану, літії викликає СТА, стимулюючи описану вище схему, включаючи виділення цитокінів.

Самиць мишей штаму Balb/c тренували на обмеження їх повного денного споживання води до одного 5-хвилинного періоду пиття в день, і навчали випивати в цей проміжок часу достатню кількість води, щоб зберігати рівновагу. Тварин ділять на дві групи, і вводять їм внутрішньоочеревинно (ІР) або ін'єкцію імітатора (фізіологічний розчин), або ЕРО (5000 одиниць/кг) за 4 години перед тим, як їм дають нову цукрово-ванільну рідину. Відразу після того, як скінчене пиття цієї солодкої рідини, тваринам вводять або фізіологічний розчин, або дозу літію, що викликає хворобливі відчуття (20мг/кг 0,15М LiCl, внутрішньоочеревинно). Після цього тварин розбивають на три групи. Першій групі (контрольній) не вводять літії після пиття. Другій групі вводять і літії і ЕРО. Третій групі (імітатор) вводять фізіологічний розчин (без ЕРО) і літії.

Умовний рефлекс огиди (стандартний тест смакової огиди) визначають, вимірюючи зменшення споживання води після подальшого надання розчину, що викликає хворобливість нової цукрово-ванільної рідини. Після 5 днів відновлення від прийому літію або імітатора тваринам, що зазнають спраги знову надають нову цукрово-ванільну рідину. Порівняння" результатів, одержаних для груп 2 і 3 в порівнянні з групою 1 (контроль), представлені на Фіг.2А. День 2 відповідає базовій лінії споживання води після мешкання в клітці для тестування. На 3 день тваринам вводять внутрішньоочеревинно ін'єкцію або фізіологічний розчин, або ЕРО (5000 одиниць/кг) за 4 години до надання нової цукрово-ванільної рідини, з подальшим обробленням літієм або імітуючим фізіологічним розчином (стрілка). Таке оброблення приводить до невеликого зниження споживання рідини всіма групами на 3 день, що відповідає раніше документованому шкідливому впливу ін'єкцій і новизни рідини. Після видужання перший тест на встановлення СТА не показує будь-якого зменшення споживання рідини в контрольній групі. Однак тварини, яким вводили літії, демонструють практично повну оgidу до рідини, незважаючи на відчуття спраги (день 4). Продовження позбавлення води зрештою спричиняє згасання СТА (дні 5-9), але характеризуються помітно уповільненим відновленням тварин, яким вводили ЕРО, що показує крива чорних кругів на Фіг.2А.

Встановлену тут стійкість СТА можна краще оцінити, враховуючи міру водного дефіциту, що спостерігається кожного дня тестування, оскільки ЕРО-оброблені тварини переносять дефіцит води приблизно в два рази краще, ніж тварини, яким вводили імітатор (Фіг.2В). Незважаючи на помітну акцентуованість СТА, продемонстровану ЕРО групою, тварини в цій групі з більшою готовністю досягали поїлки в порівнянні з групою з ін'єкцією імітатора, як видно на Фіг.2С. Стійкість СТА була продемонстрована при повторних ін'єкціях одного тільки літію

(без ЕРО), що приводило до ослабленого СТА, величина якого була більша для ЕРО групи (Фіг.2А, день 10). Ці результати показують, що попереднє оброблення ЕРО пов'язане з помітним потенціюванням СТА, що викликається літієм.

#### 8. Приклад 3

Периферійно введені ЕРО захищають мозок від екситоксину

Цей приклад демонструє, що ЕРО долає гематоенцефалічний бар'єр і має нейрозахисну дію для мишей, оброблених нейротоксином каїнатом. У природі існує безліч сполук, які демонструють специфічну токсичність стосовно нейронів. Ці молекули звичайно взаємодіють з ендогенними рецепторами для амінокислотного трансмітера, глутамату, викликаючи потім надмірну стимуляцію і нейрональне ураження. Одна з них, каїнат, речовина, яка широко використовується для вивчення нейрональних уражень, пов'язаних з екцитотоксичністю, є аналогом глутамату. Каїнат є ефективним нейротоксином, який специфічно руйнує нейрони, особливо ті, які розташовані в ділянках з високою щільністю каїнатних рецепторів, таких як гіпокамп, і викликає судому, ураження мозку і смерть.

Дослідження нейротоксичності, що проводяться нижче проводили на мишах, використовуючи каїнат. Цю модель використовують для оцінки захисної дії для таких станів, як скронева епілепсія. Парентеральні ін'єкції експериментальним тваринам, таким як пацюки і миші, викликають часткові (лімбічні) судоми дозозалежним чином, які можуть потім розповсюдитися і привести до смерті. Експерименти, представлені в цьому розділі, здійснюють для з'ясування того, чи може периферійно введений ЕРО подолати гематоенцефалічний бар'єр, і якщо так, то чи впливає ЕРО на нейрональну енергетичну рівновагу, і конкретно, чи має він нейрозахисну дію у відношенні каїнату.

Отже, самиць мишей штаму Balb/c (вагою в середньому 15-20г) заздалегідь обробляють дозою в 5000 одиниць/кг рекомбінантного людського еритропоєтину (rhEPO; в продажу під торговою маркою PROCRI, Ortho-Biotech, Inc.) або фізіологічним розчином (імітація), які вводять внутрішньоочеревинною ін'єкцією в конкретні моменти часу до, під час або після введення каїнату (Sigma Chemical), також внутрішньоочеревинно, в певних концентраціях (маса/кг ваги тіла). Потім за тваринами спостерігають і оцінюють за розвитком активності конвульсій через 20 хвилин після введення каїнату. Кожний дослід закінчують через 60 хвилин після введення дози каїнату. Як представлено на Фіг.3А, попереднє оброблення ЕРО різко знижує міру судом і затримує настання status epilepticus у мишей, оброблених каїнатом. Порівняння тварин, оброблених ЕРО і імітатором, демонструє значно меншу кількість смертей тварин, якій ввели дози каїнату в інтервалі 20-30мг/кг, що вказує на нейрозахист, забезпечений попереднім обробленням ЕРО. Цифри в дужках під кожним стовпчиком вказують число тварин, яким ввели кожну з доз каїнату. Дозозалежний нейрозахист від каїнату внаслідок введення ЕРО представлений на Фіг.3В. Мишам вводили ЕРО (5000 одиниць/кг; внутрішньоочеревинно щоденно протягом п'яти днів).

Нейрозахисний ефект кожної дози ЕРО оцінюють, визначаючи виживання після введення каїнату (20мг/кг), що приводить до приблизно 50% смертності для контрольних тварин (без ЕРО; див. Фіг.3А). Стовпчики вказують на збільшення виживаємості ЕРО-оброблених тварин в порівнянні з симуляторно-обробленими тваринами. Як видно на Фіг.3В, нейрозахист зростає з додатковими ЕРО дозами по 5000 Одиниць/кг.

Нейрозахист, що забезпечується ЕРО, характеризується уповільненням настання, що характерно для активації програми генної експресії. Фіг.3С показує, що пов'язана з ЕРО затримка (в хвилини) загибелі від судом, викликаних однією дозою ЕРО, введеною одночасно з введенням каїнату (20мг/кг), не забезпечує будь-якого негайного захисту, тоді як введення ЕРО за 24 години до введення каїнату підвищує латентність і знижує тяжкість судом і збільшує проміжок часу до смерті. Цей ефект триває аж до 7 днів.

#### 9. Приклад 4

Периферійне введення ЕРО захищає мозок від пошкоджень, пов'язаних з ішемією

Дослідження, що передували *in vivo* з використанням моделі загальної реперфузії на піщанках показали, що припинення притоку крові до мозку приводить до загибелі клітин і що ЕРО, введений безпосередньо в церебральні шлуночки, захищає мозок від такої загибелі клітин. (Sakanaka et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 4635). Описані в прикладі експерименти вперше показують, що ЕРО, введений периферійно, захищає нервові клітини від загибелі *in vivo* в моделі ішемії на тваринах.

Експеримент, що описується далі був здійснений з використанням моделі оклюзії середньої церебральної артерії, прийнятої моделі локального ішемічного удару. За протоколом, самців пацюків (вагою 250г) анестезують фенотарбінатом і витримують при 37°C. Оголяють сонні артерії і перманентно перебивають інсальтатеральну сонну артерію. Інсальтатеральну середню сонну артерію (MCA) оголяють і вводять в її початок катетер. Контралатеральну артерію перебивають затиском на 1 годину. Тварин умертвляють через 24 години, мозок витягують і розрізають на послідовні шари товщиною 1мм. Живі тканини візуалізують *in situ* відновленням трифенілтетразолієм для того, щоб відрізнити живі тканини від некротичних ділянок. У ішемічній кірці і навколишній напівтемряві клітини загинули.

Використовуючи цю MCA модель, ЕРО вводили за допомогою парентеральних ін'єкцій в різні часи до і відразу після ураження і об'єм ураження кількісно визначали за допомогою аналізу комп'ютерного зображення. Результати цього аналізу, представлені на Фіг.4А, вказують на вплив обробки ЕРО в наступні моменти часу після удару: за 24 години до удару, під час удару і через 3,6 і 9 годин після удару.

Як видно на Фіг.4А, ЕРО захищає тканини від некротичного ураження при введенні аж до 6 годин після удару.

Цікаво і суперечливо те, що 17-мер, одержаний з ЕРО, який, як повідомлялося раніше, має

нейрозахисну активність, промотує ріст нейритів *in vitro* і мієлінізацію нервових клітин *ex vivo* (Сатрапа *et al.*, 1998, *Int. J. Mol. Med.* 1: 235-41; патент США 5700909, виданий 23 грудня 1997), не впливає на захист проти ураження в цій системі (Фіг.4В, "17-мер"). Таким чином ця модель, а також інші способи оцінки впливу ЕРО на функції тканини, що збуджується, представлені даним винаходом, можна використати для ідентифікації ЕРО і модуляторів активності ЕРО рецепторів, які можна використати для модулювання функцій тканини, що збуджується, наприклад, для захисту їх від уражень, або для посилення навчання і пізнавальної функції.

#### 10. Приклад 5

Периферійне введення ЕРО захищає мозок від гострої травми

У моделі механічної травми (модель кортикального удару) попереднє оброблення ЕРО, що систематично вводиться захищає мишачий мозок від тупої травми. Для створення травми використовують пневматичний пістон (Clippard Valves), 3мм діаметром, який може завдати точного удару в череп. Кожну з мишей анестезують і вміщують, жорстко закріпивши в стереотаксичному пристрої так, щоб запобігти рухам голови. Скальп розтинають для визначення положення тімені, що є порівняльною точкою, за допомогою якої здійснюють початкову установку пістона. Потім пістон встановлюють, переміщуючи його на 2мм назад і 2мм вниз відносно тімені, і здійснюють удар, використовуючи точний імпульс азоту. Такий пристрій дозволяє точно вибрати швидкість пістона (4м/сек.) і ударне зміщення (2мм).

Мишей обробляють ЕРО (5000 Одиниць/кг) за 24 години до, під час ураження, через 3, 6 і 9 годин після, і продовжують далі як денні дози. Через 10 днів після процедури мишей умертвляють, потім досліджують мозок і визначають об'єм некрозу мозку. У мишей, оброблених ін'єкцією імітатора, спостерігається обширна площа некрозу (Фіг.5), що супроводиться сильною інфільтрацією, моноцитів. Навпаки, у тварин, яких захистили від такого ураження, визначалося небагато одноядерних клітин на ділянці ураження, якщо тварин заздалегідь обробляли ЕРО, або ЕРО вводили аж до 3 годин після ураження.

#### 11. Приклад 6

Периферійне введення ЕРО захищає міокард від ішемічного ураження

Цей приклад демонструє ефект ЕРО стосовно захисту тканин серця від гіпоксичного ураження. Для його проведення пацюків до тестування заздалегідь обробляють ЕРО (5000 Одиниць/кг) за 24 години до процедури, яку здійснюють за способом Latini *et al.*, (1999, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 31: 601-8). Потім тварин анестезують, підключають до апарату штучного дихання і здійснюють торактомію. Визначають серце і його внутрішню циркуляцію, і кетгут, що видалається вміщують навколо найближчої ділянки низхідної лівої коронарної артерії, і потім його перев'язують. Потім вводять додаткову дозу ЕРО (5000 одиниць/кг 5 і оклюзію зберігають протягом 30 хвилин. У цей час лігатуру ослаблюють і тварин витримують в стані глибокого наркозу ще 6 годин, а потім умертвляють. Відразу

після смерті серце витягують і частину ураженої ділянки (AAR), а також не ураженої ділянки (перегородка) видалають і препарують для біохімічного аналізу. Визначають два параметри: креатинкіназу (СК) як показник виживаємості міокарда (чим нижча СК, тим менша виживаємість тканини) і мієлопероксидазу, яка є продуктом інфільтрату моноядерних клітин. Результати представлені на Фіг.6А і Фіг.6В. Як видно на цих малюнках, оброблення ЕРО приводить до збереження СК активності, що відповідає підвищенню життєздатності тканини і зниженню МРО активності, в порівнянні з контролем, як в площі інфаркту (AAR), так і вільної стінки перфузованого лівого шлуночка (LV), що вказує на значно меншу інфільтрацію запальними клітинами.

#### 12. Приклад 7

Периферійне введення ЕРО ослабляє експериментальний алергічний енцефаліт

Експериментальний алергічний (або аутоімунний) енцефаломієліт (ЕАЕ) у пацюків є прийнятою моделлю на тваринах для вивчення розсіяного склерозу (MS). Були розроблені різні моделі з ЕАЕ на тваринах з використанням різних імунологічних, вірусологічних, токсичних і травматичних параметрів для з'ясування особливостей MS.

Для з'ясування того, чи захищає ЕРО проти симптомів ЕАЕ, здійснюють наступний експеримент. Самиць пацюків штаму Льюїс у віці 6-8 тижнів (Charles River, Caico, Italy) імунізують під легкою анестезією, вводючи за допомогою ін'єкцій в подушечки стоп обох задніх лап по 50мкг мієлінового основного білка морських свинок (MBP; Sigma, St. Louis, MO) у воді, емульгованого в рівних об'ємах повного ад'юванту Фрейнда (CFA, Sigma) з 7мг/мл термічно убитих *Mycobacterium tuberculosis*, доданих до H37Ra (Difco, Detroit, MI) в кінцевому об'ємі 100мкл.

Після оброблення пацюків щодня оцінюють за ознаками експериментального аутоімунного енцефаломієліту (ЕАЕ) і оцінюють результати таким чином: 0, немає захворювання; 1, млявий хвіст; 2, атаксія; 3, повний параліч задніх кінцівок з нетриманням сечі. Контролюють також вагу тіла. Пацюкам вводять ЕРО (5000 одиниць/кг, внутрішньоочеревино, раз в день), починаючи на 3 день після 5 імунізації, і продовжують до 18 днів. Контрольним пацюкам вводять один тільки носій. Як видно на Фіг.7, пацюки, оброблені ЕРО, демонструють підвищену оцінку (тобто менший номер) і стосовно тривалості захворювання. Крім того, для пацюків, яким вводили ЕРО, відмічається помітна затримка в настанні симптомів.

#### 13. Приклад 8

Мінімальна ефективна доза фармакокінетика ЕРО, необхідного для захисту тканин, що збуджуються

Оптимальну і ефективну дози ЕРО оцінюють, використовуючи описану вище модель ішемічного шоку на тваринах. Як видно на Фіг.8А, доза ЕРО менша, ніж 450 одиниць/кг маси тіла ненадійно захищає тканини, що збуджуються від некротичних уражень. Як видно на Фіг.8В, для досліджених тварин доза в приблизно 5000 одиниць/кг маси тіла, введена внутрішньоочеревинно чотирьом самицям мишей, приводить до циркулюючого рів-

ня ЕРО більше ніж 20000 мОдиниць/мл сироватки через 5 годин після його введення, більше ніж 10000 мОдиниць через 10 годин після його введення, але менше ніж 5 мОдиниць через 24 години після його введення.

#### 14. Приклад 9

Доставляння в ЦНС за допомогою еритропоетину

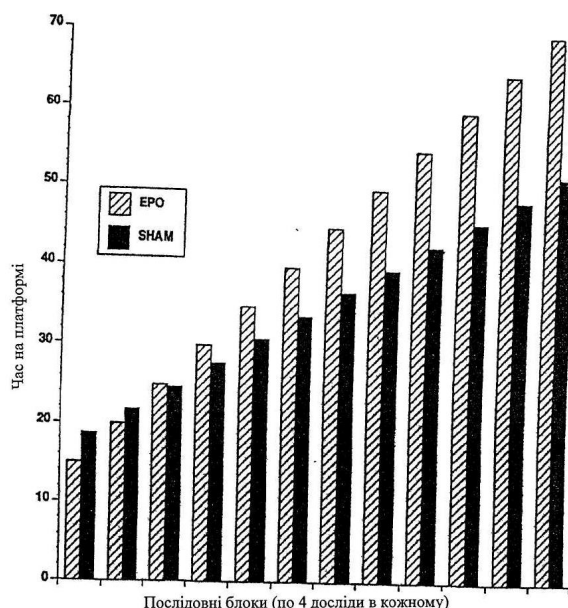
Представлені далі приклади демонструють успішний транспорт кон'югованих з ЕРО молекул через гематоенцефалічний бар'єр і їх локалізацію всередині базальної мембрани. Як видно на Фіг.9А, зрізи мозку були забарвлені антитілами до ЕРО рецептора (ЕРО-R), що показує, що капіляри мозку експресують високі рівні ЕРО-R. Для з'ясування того, чи може ЕРО долати гематоенцефалічний бар'єр, ЕРО мітять біотином таким чином. Об'єм, що містить rhЕРО, концентрують, використовуючи фільтр Centricon-10 (Millipore), і одержане вимірюють, зчитуючи значення поглинання при довжині хвилі 280нм. Потім 0,2мг біотину з довгим ланцюжком (Vector Labs) розчиняють в 100мкл ДМСО, додають до концентрованого розчину rhЕРО і негайно обертають. Потім цю суміш інкубують при кімнатній температурі протягом чотирьох годин при обережному перемішуванні в темряві. Незв'язаний біотин видаляють з розчину, використовуючи колонку Centricon-10. Потім біотинілований ЕРО вводять внутрішньоочеревинно тваринам і через 5 годин тварин умертвляють. У зрізи мозку вводять авідин, сполучений з пероксидазою, і додають діамінобензидин доти, поки достатня кількість продукту реакції не виявляється для спостереження за допомогою світлового мікроскопа. ЕРО виявляються вздовж тих же самих капілярів, які забарвлені позитивно для ЕРО-R (Фіг.9В). Для більш пізніх проміжків часу мітки біотину, з'являються з локалізацією всередині специфічних ней-

ронів (наприклад, 17 годин. Фіг.9С). Навпаки, якщо холодний ЕРО додають в 1000-кратному надлишку по відношенню до міченого ЕРО, все специфічне забарвлення зникає.

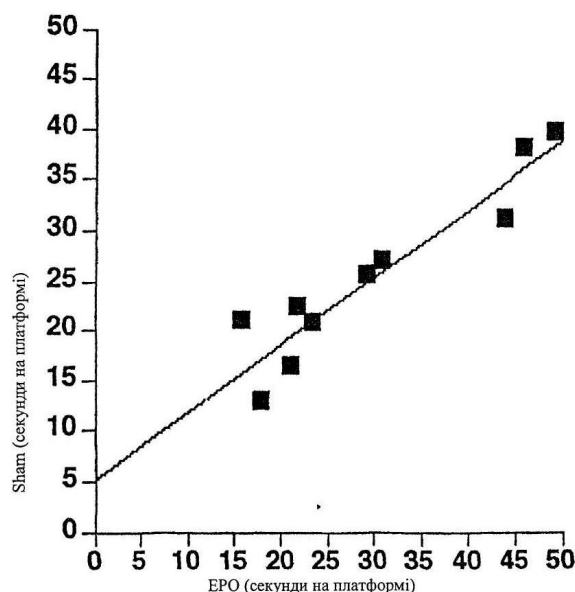
Одержані результати демонструють успішне доставляння системно введеної кон'югованої з ЕРО сполуки через гематоенцефалічний бар'єр.

Успішне доставляння системно введеного кон'югату ЕРО-біотин через гематоенцефалічний бар'єр в мозок демонструє, що аналогічним способом можна доставляти через гематоенцефалічний бар'єр інші терапевтичні сполуки, створюючи комплекси ЕРО з представляючою інтерес сполукою. Як один з прикладів одержаний з мозку нейротрофічний фактор (BNF) можна ковалентно зв'язати з ЕРО внаслідок карбодіімідного приєднання, використовуючи стандартні способи. Після очищення цей кон'югат можна вводити тваринам за допомогою внутрішньоочеревинних ін'єкцій. Позитивний вплив BNF на центральну нервову систему можна виміряти стосовно контрольних тварин, для вимірювання успішного транспорту цієї молекули в асоціації з ЕРО, в протилежність недостатності активності центральної нервової системи при введенні не кон'югованого BNF.

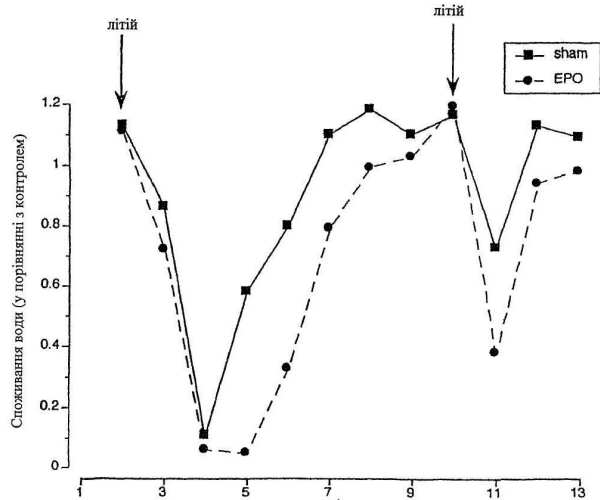
Даний винахід не повинен бути обмежений об'ємом розкритих тут конкретних варіантів, які повинні служити лише ілюстрацією окремих аспектів винаходу, і функціональність еквівалентних методів і компонентів включені в об'єм винаходу. Дійсно, фахівцям будуть зрозумілі різні модифікації даного винаходу в доповнення до тих, які тут представлені і розкриті в попередньому описі і в супроводжуючих малюнках. Такі модифікації повинні бути включені в об'єм прикладеної формули винаходу. Всі приведені посилальні матеріали включені сюди за посиланням в своїй повноті для всіх цілей.



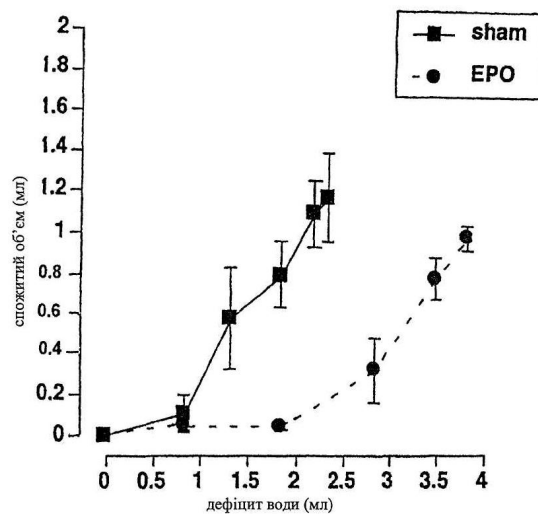
Фіг. 1А



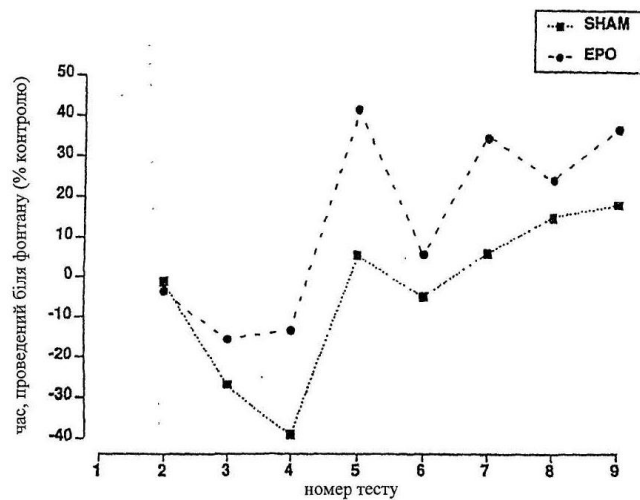
Фіг. 1В



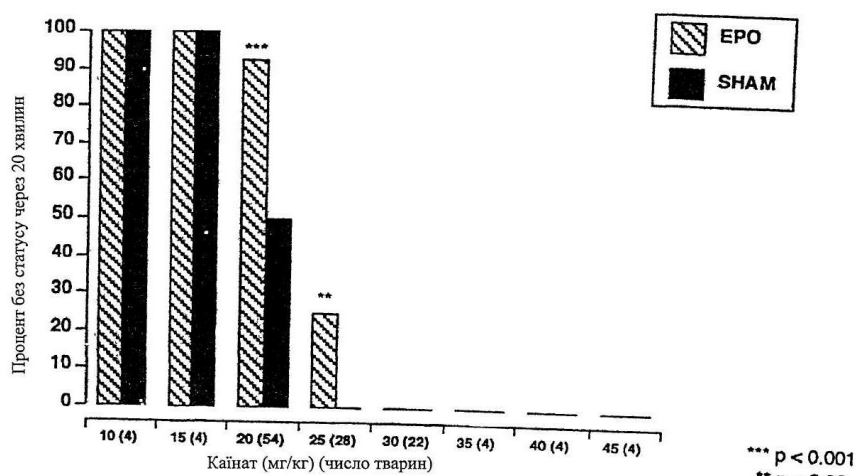
Фиг. 2A



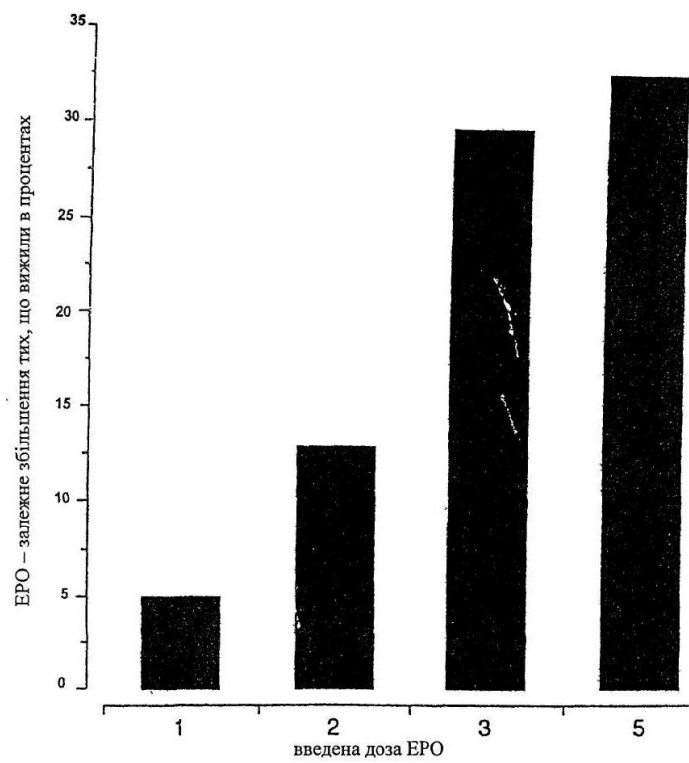
Фиг. 2B



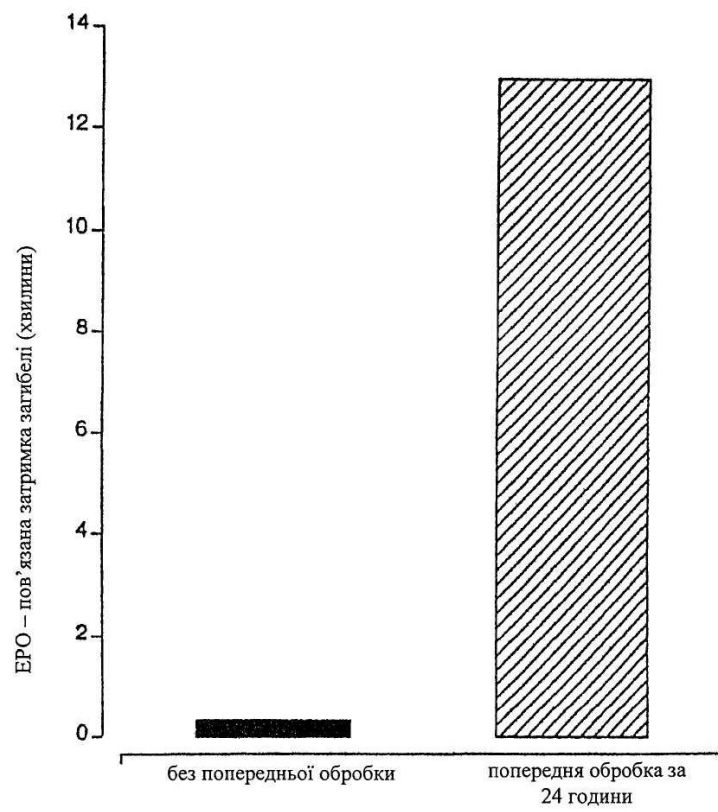
Фиг. 2C



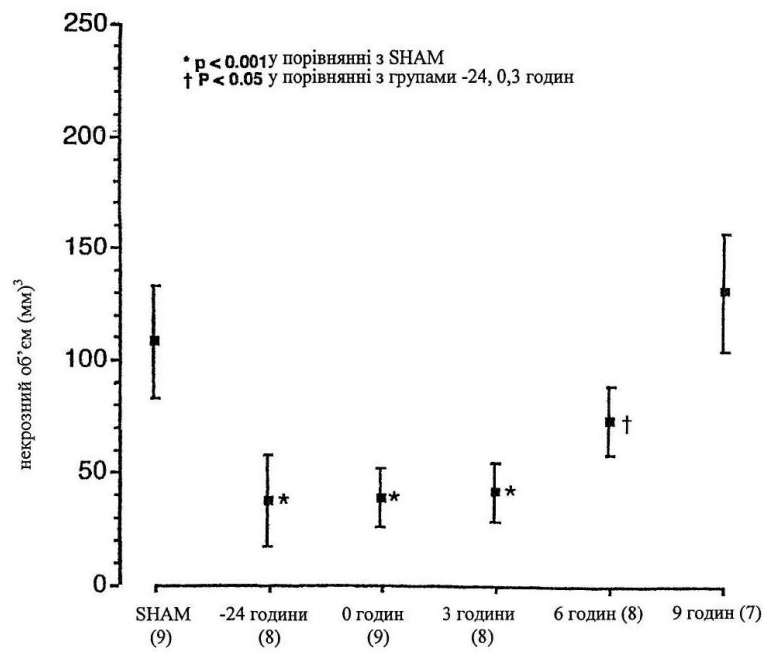
Фиг. 3A



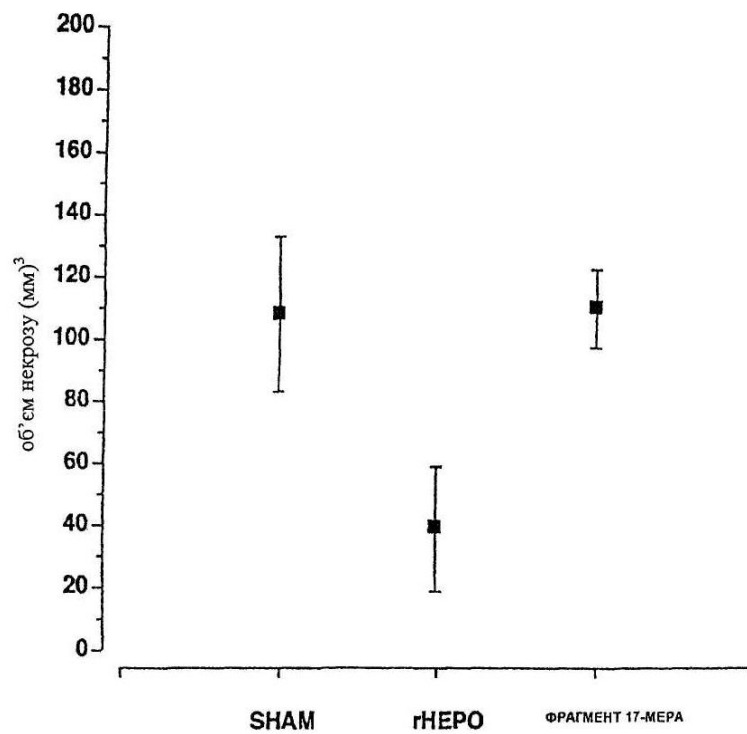
Фіг. 3В



Фіг. 3С



Фіг. 4А



Фіг. 4В

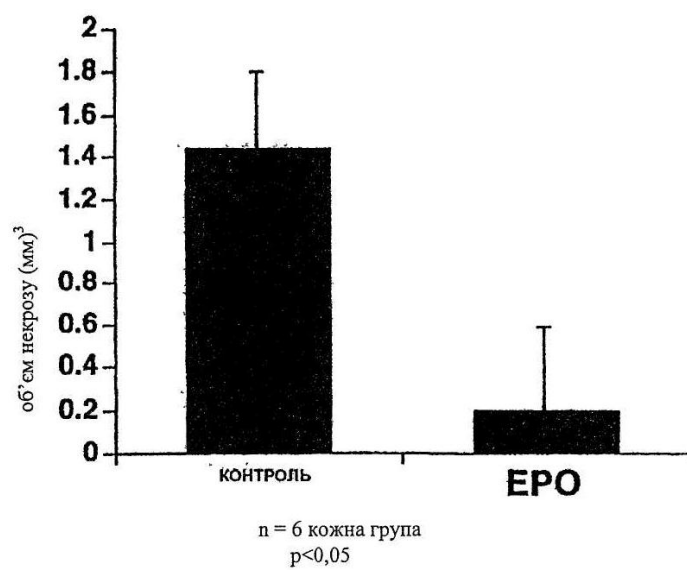


Fig. 5

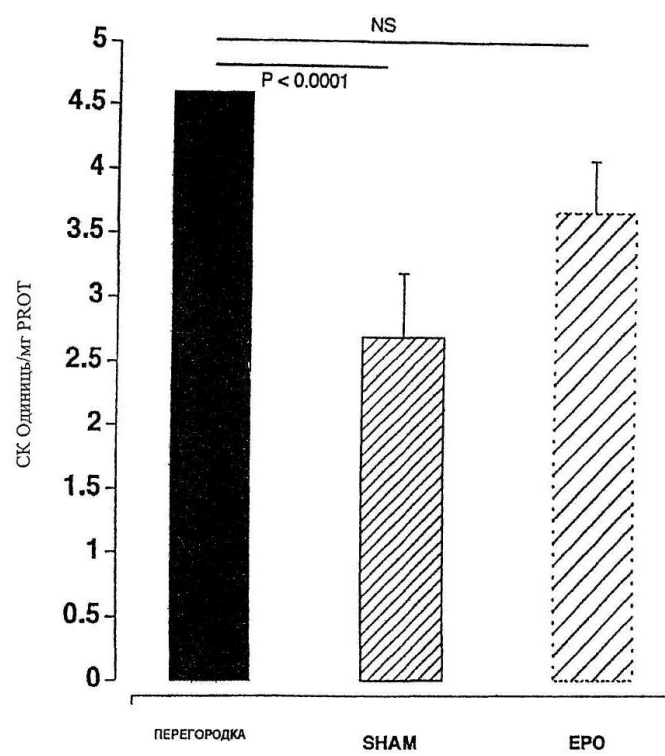
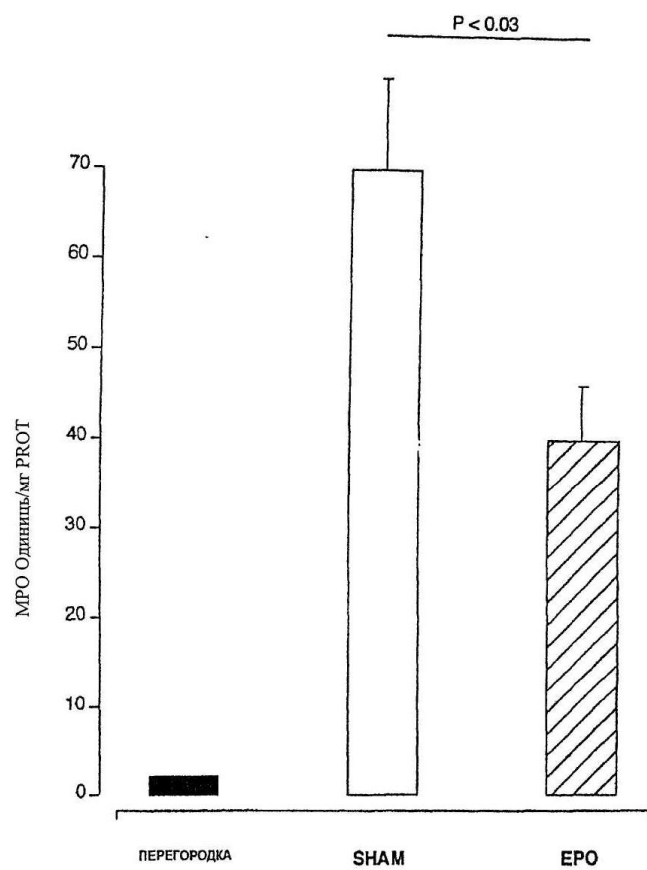
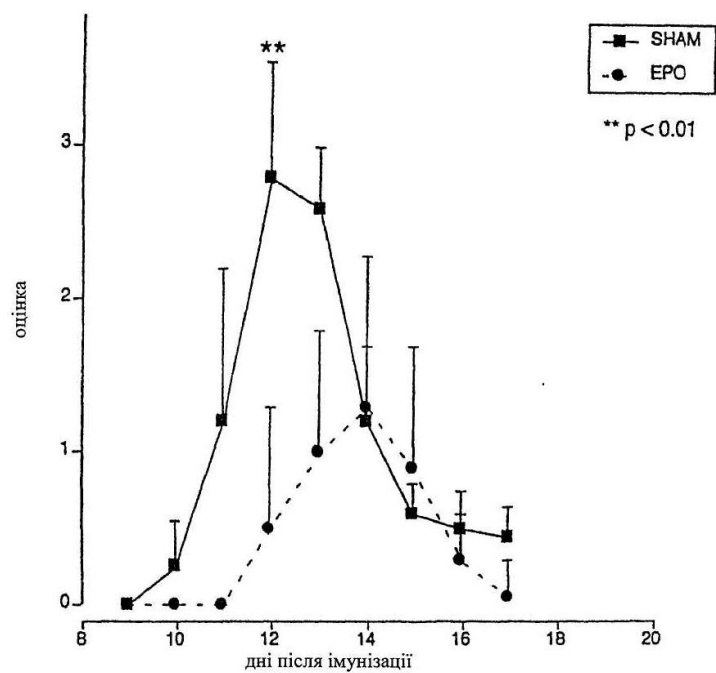


Fig. 6A





Фиг. 6В



Фиг. 7

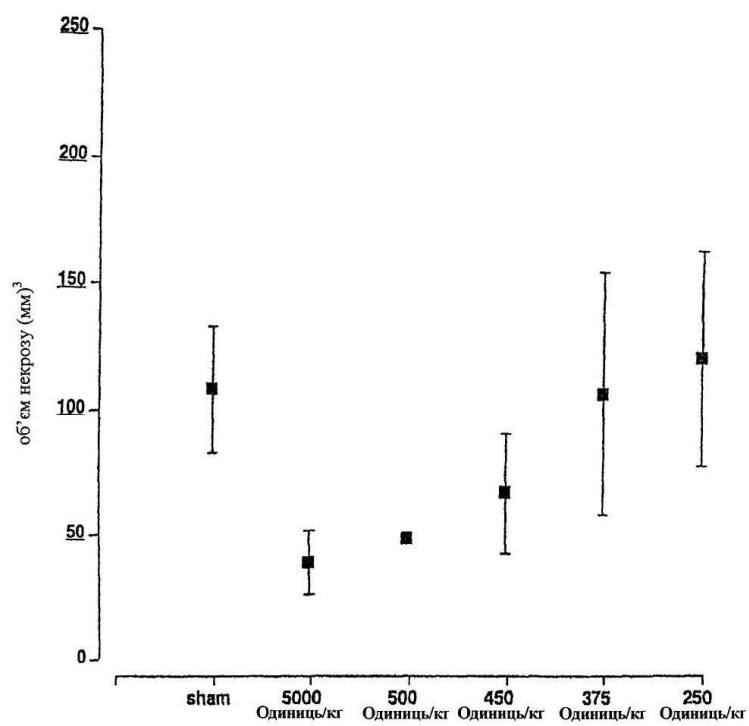


Fig. 8A

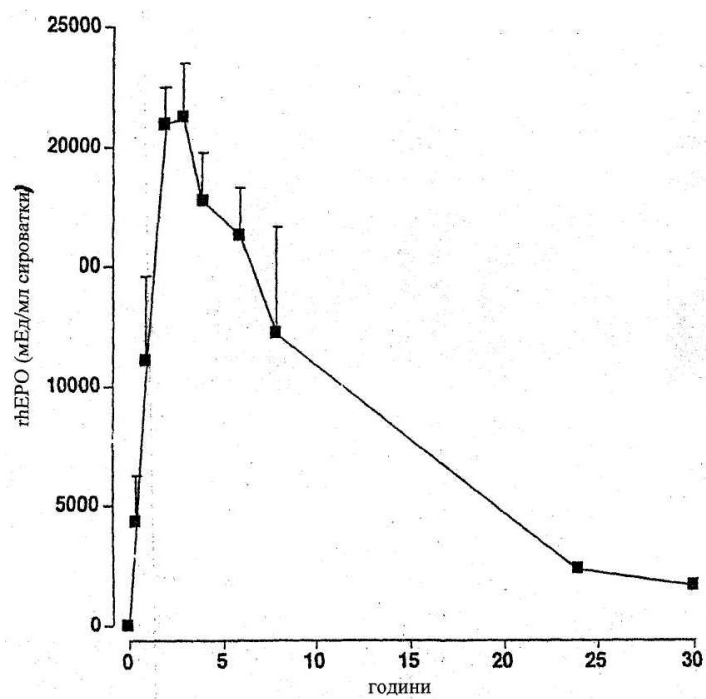


Fig. 8B



Фіг. 9А



Фіг. 9В



Фіг. 9С