



УКРАЇНА

(19) UA (11) 94913 (13) C2

(51) МПК

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ЕРИТРОПОЕТИНУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

1

2

(21) a200801307

(22) 25.07.2003

(24) 25.06.2011

(31) 102 34 192.3

(32) 26.07.2002

(33) DE

(62) a200501760, 25.07.2003

(46) 25.06.2011, Бюл.№ 12, 2011 р.

(72) БАЛЬМАНН ФЕРДІНАНД ХЕРМАНН, DE,
ХАЛЛЕР ХЕРМАНН, DE

(73) ЕПОПЛУС ГМБХ УНД КО., КГ, DE

(56) WO 0214356 A, 21.02.2002

US 2002065214 A1, 30.05.2002

WO 0061164 A, 19.10.2000

WO 9810650 A, 19.03.1998

US 5980887 A, 09.11.1999

BUEMI M ET AL: "Recombinant erythropoietin prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe rabbits with hereditary hypocholesterolemia" NEPHROLOGY DIALYSIS TRANSPLANTATION, Bd. 12, Nr. 9, 1997, Seite A190, XP0009021639

BUEMI M ET AL: "Recombinant human erythropoietin (rHuEPO): More than just the correction of uremic anemia" JOURNAL OF NEPHROLOGY 2002 ITALY, Bd. 15, Nr. 2, 2002, Seiten 97-103, XP0009021789

MASUDA SEIJI ET AL: "Erythropoietic, neurotrophic, and angiogenic functions of erythropoietin and regulation of erythropoietin production" INTERNATIONAL JOURNAL OF HEMATOLOGY, Bd. 70, Nr. 1, Juli 1999 (1999-07), Seiten 1-6, XP0009021621

KRAUSE K ET AL: "Recombinant human erythropoietin and VEGF have equal angiogenic potency: Investigation in a novel in vitro assay of human vascular tissues" EUROPEAN HEART JOURNAL, Bd. 22, Nr. Abstract Supplement, September 2001 (2001-09), Seite 154, XP0001097312

MASCHIO G: "Erythropoietin and systemic hypertension" NEPHROLOGY DIALYSIS TRANSPLANTATION, Bd. 10, Nr. SUPPL. 2, 1995, Seiten 74-79, XP0009021640

DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1997, CONRAD KIRK P ET AL: "Placental cytokines

and the pathogenesis of preeclampsia" XP002275414 Database accession no. PREV199799525116 & AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY, Bd. 37, Nr. 3, 1997, Seiten 240-249 DATABASE EMBASE [Online] ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL; 2000, CASES A: "Recombinant human erythropoietin treatment in chronic renal failure: Effects on hemostasis and vasculature" XP002275415 Database accession no. EMB-2000364537 & DRUGS OF TODAY 2000 SPAIN, Bd. 36, Nr. 8, 2000, Seiten 541-556 DATABASE MEDLINE [Online] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; Mai 1996 (1996-05), BRAGA J ET AL: "Maternal and perinatal implications of the use of human recombinant erythropoietin." XP002275416 Database accession no. NLM8677769 & ACTA OBSTETRICIA ET GYNECOLOGICA SCANDINAVICA. MAY 1996, Bd. 75, Nr. 5, Mai 1996 (1996-05), Seiten 449-3 DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 16. November 2001 (2001-11-16), ARCASOY MURAT O ET AL: "Erythropoietin (EPO) stimulates angiogenesis in vivo and promotes wound healing" XP002275417 Database accession no. PREV200200261552 & BLOOD, Bd. 98, Nr. 11 Part 1, 16. November 2001 (2001-11-16), Seiten 822a-823a, 43RD ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, PART 1; ORLANDO, FLORIDA, USA; DECEMBER 07-11, 2001 ISSN: 0006-4971

(57) 1. Застосування еритропоєтину для одержання фармацевтичної композиції, яка містить субполітемічну дозу ЕПО, що відповідає щотижневій дозі від 1 до 90 міжнародних одиниць (Од) ЕПО/кг маси тіла, для лікування цукрового діабету.

2. Застосування за п. 1, де фармацевтична композиція придатна для парентерального, особливо внутрішньовенного, внутрішньом'язового, інтрадермального або підшкірного введення.

3. Застосування за п. 2, де фармацевтична композиція знаходиться у вигляді ін'єкції або інфузії.

4. Застосування за будь-яким з пп. 1, 2, де фармацевтична композиція придатна для легеневого введення.

(13) C2

(11) 94913

(19) UA

5. Застосування за п. 4, де фармацевтична композиція знаходиться у вигляді водного розчину, неводного розчину або порошку.
6. Застосування за п. 4 або 5, де фармацевтична композиція знаходиться в формі аерозольного препарату.
7. Застосування за п. 1, де фармацевтична композиція придатна для перорального введення.
8. Застосування за п. 7, де фармацевтична композиція знаходиться у вигляді розчину, суспензії, емульсії або таблетки.
9. Застосування за будь-яким з пп. 1-8, де фармацевтична композиція містить щонайменше одну іншу біологічно активну речовину для стимуляції ендотеліальних клітин-попередників.
10. Застосування за п. 9, де іншою біологічно активною речовиною є VEGF, PIGF, GM-CSF, інгібітор HMG-CoA-редуктази і/або донор NO, особливо L-аргінін.

11. Застосування за п. 10, де інгібітором HMG-CoA-редуктази є статин, такий як симвастатин, мевастатин або аторвастатин.
12. Застосування за будь-яким з пп. 1-11, де еритропоетином є людський або тваринний еритропоетин.
13. Застосування за п. 12, де еритропоетином є похідне, аналог, модифікація або мутеїн еритропоетину.
14. Застосування за п. 12 або 13, де еритропоетин виділяють з людської сечі, сечі або плазми пацієнтів, які страждають на апластичну анемію, тканинних культур людських ниркових ракових клітин, що мають здатність до утворення людського еритропоетину людських лімфобластів або гібридної культури, що одержується за рахунок злиття клітин людської клітинної лінії.
15. Застосування за п. 12 або 13, де еритропоетином є еритропоетин, що одержується за допомогою методів рекомбінантних ДНК.

Даний винахід належить до застосування еритропоетину для стимуляції фізіологічної мобілізації, проліферації та диференціювання ендотеліальних клітин-попередників, для стимуляції васкулогенезу, для терапії захворювань, пов'язаних з дисфункцією ендотеліальних клітин-попередників, і для одержання фармацевтичних композицій з метою лікування таких захворювань, а також до фармацевтичних композицій, які включають еритропоетин та інші придатні біологічно активні речовини для стимуляції ендотеліальних клітин-попередників.

Ендотелій судин являє собою шар клітин, який вистилає кровеносні судини. Ендотелій відділяє кров від інших шарів судин, причому ендотелій є не тільки пасивним бар'єром, але і активно бере участь в регуляції судинного тону. Відповідно до цього, також кажуть про залежну від ендотелію вазодилатацію. Внаслідок свого положення ендотелій постійно зазнає гемодинамічного стресу і метаболічного стресу. У випадку патогенних станів, наприклад, у випадку підвищеного кров'яного тиску, підвищених вмістів ліпопротеїнів низької щільності (LDL), обмеженої ниркової функції або підвищеного рівня цукру в крові, виникають функціональні дефекти ендотелію, за якими потім можуть наставати морфологічно конкретні пошкодження, такі як утворення атеросклеротичних бляшок. Дуже ранній симптом зміненої, відповідно, редукованої ендотеліальної функції, відповідно, ендотеліальної дисфункції, являє собою зменшення залежної від ендотелію вазодилатації.

У випадку коронарної хвороби серця (КНХ), а також у випадку факторів ризику без КНХ, які є, таких як, наприклад, гіпертонія, гіперліпопротеїнемія або діабет, дефекти ендотеліальної функції виявляються у зниженому продукуванні NO (= EDRF) і підвищеному продукуванні ендотеліну. Високі рівні ендотеліну в плазмі призводять до аномального росту клітин, запалень, судинного розростання і сильного звуження судин. Порушення ендотеліальної функції до того ж характеризу-

ються посиленням продукуванням адгезивних молекул, таких як ICAM-1 та VCAM-1, за рахунок чого до ендотелію у підвищеній мірі прилипають тромбоцити та моноцити. Зумовлене цим, відбувається підвищення судинного тону. Таким чином, в найрізноманітніших системах виникає нерівновага, що сприяє вазоконстрикції, адгезії, агрегації, коагуляції, атеросклерозу та атеротромбозу. Навіть ментальний стрес призводить до вимірної ендотеліальної дисфункції, яка може продовжуватися аж до 4 годин.

Ендотеліальні клітини беруть участь також в утворенні нових кровеносних судин. Утворення кровеносних судин має значення у випадку множини процесів, наприклад при ембріогенезі, репродуктивному циклі у жінок, загоєнні ран, рості пухлин та неоваскуляризації ішемічних областей. Спочатку постнатальне утворення кровеносних судин, тобто утворення кровеносних судин після родів, зводиться головним чином до ангіогенетичних процесів. Під ангіогенезом розуміють утворення нових кровеносних судин за рахунок появи капілярів з вже існуючої судинної системи. При ангіогенезі передусім за допомогою протеолітичних ферментів руйнується оточуюча кровеносні судини базальна мембрана і позаклітинна матриця фрагментується в периваскулярному просторі. Ангіогенні стимули, що вивільняються при цьому, викликають міграцію ендотеліальних клітин, які вже є і які утворилися шляхом диференціювання, у напрямку хемотактичного подразника, причому вони одночасно проліферують і перестроюються. За рахунок накладення однієї на одну ендотеліальних клітин потім утворюються нові судинні петлі з капілярноподібними просвітами. Після цього відбувається синтез нової базальної мембрани.

Однак проведені у недавній час дослідження показують, що утворення нових кровеносних судин у дорослому організмі ґрунтується не тільки на ангіогенезі, але і також на васкулогенетичних механізмах. Під васкулогенезом розуміють судинне новоутворення з *in situ* ендотеліальних клітин-

попередників, що диференціюються. Догма, що васкулогенез обмежений ембріогенезом, спростована за рахунок виявлення ендотеліальних клітин-попередників (EPC) в периферичній крові здорових людей та тварин. При використанні тваринних моделей підтверджено, що виникаючі з кісткового мозку ендотеліальні клітини-попередники активно беруть участь в неоваскуляризації. Також показано, що в ішемічних областях знаходиться специфічна CD34-позитивна підгрупа лейкоцитів, яка експресує специфічні до ендотелію антигени. Крім того, з клітин CD133⁺ та CD34⁺ *in vitro* можуть виходити ендотеліальні клітини-попередники (EPC), які вносять значний внесок в утворення кровоносних судин у дорослому організмі (Asahara і ін., *Science*, 275, 964-967 (1997); Crosby і ін., *Circ. Res.*, 87, 728-730 (2000); Gehling і ін., *Blood*, 95, 3106-3112 (2000)). Далі, показано, що ін'єкція виділених клітин CD34⁺ або культивованих ендотеліальних клітин-попередників прискорює відновлення кровотоку у хворих діабетом мишей (Schattelman і ін., *J. Clin. Invest.*, 106, 571-578 (2000)) і *in vivo* поліпшує неоваскуляризацію (Asahara і ін., *Circ. Res.*, 85, 221-228 (1999); Crosby і ін., *Circ. Res.*, 87, 728-730 (2000); Murohara і ін., *J. Clin. Invest.*, 105, 1527-1536 (2000)). Крім того, показано, що неоваскуляризація, що індукується за рахунок клітин CD34⁺, поліпшує функцію серця (Kocher і ін., *Nat. Med.*, 7, 430-436 (2001)).

Механізми, які лежать в основі мобілізації та диференціювання ендотеліальних клітин-попередників, однак, ще повністю не з'ясовані. Біологічні дослідження відносно молекул і клітин вказують на те, що різні цитокіни та ангіогенні фактори росту стимулюють впливають на мобілізацію ендотеліальних клітин-попередників у кістковому мозку. Так, відомо, що проангіогенні фактори, такі як VEGF та GM-CSF, можуть підвищувати кількість ендотеліальних клітин-попередників (Asahara і ін., *EMBO J.*, 18, 3964-3972 (1999); Takahashi і ін., *Nat. Med.*, 5, 434-438 (1999)). У випадку VEGF (васкулярний ендотеліальний фактор росту) йдеться про протеїн, що знаходиться в різних ізоформах, який зв'язує обидва рецептори тирозинкінази VEGF-R1 (flt-1) та VEGF-R2 (flk-1), які знаходяться, наприклад, на поверхні зростаючих ендотеліальних клітин (Wernert і ін., *Angew. Chemie*, 21, 3432-3435 (1999)). Активация рецепторів VEGF через шлях Ras-Raf-MAP-кіназа приводить до експресії протеїна і специфічних інтегринів на поверхні ендотеліальних клітин, відповідно, ендотеліальних клітин-попередників і, нарешті, до ініціації проліферації та міграції цих клітин у напрямку ангіогенного стимулу. У випадку GM-CSF (стимулюючий колонії гранулоцитів та макрофагів фактор) йдеться про цитокін, який досі був відомий передусім для стимуляції лейкоцитів, включаючи нейтрофіли, макрофагів та еозинофілів. Про PlGF (плацентарний фактор росту) відомо, що він стимулює мобілізацію ендотеліальних клітин-попередників, але не стимулює їх проліферацію. З досліджень Llevadot і ін. (*J. Clin. Invest.*, 108, 399-405 (2001)) виявляється, що інгібітори HMG-CoA-редуктази, особливо статини, які використовують як лікарські засоби, які знижують рівень ліпідів і знижують захворюва-

ність та смертність у випадку коронарної хвороби, можуть мобілізувати ендотеліальні клітини-попередники. Dimmler і ін. (*J. Clin. Invest.*, 108, 391-397 (2001)), далі, показали, що статини, такі як аторвастатин та симвастатин, *in vitro* та *in vivo* можуть значно поліпшувати диференціювання ендотеліальних клітин-попередників у мононуклеарні клітини та стовбурові клітини CD34⁺, які виділяються з периферичної крові. Так, обробка мишей статинами призводить до підвищеної кількості диференційованих ендотеліальних клітин-попередників, причому статини мають таку ж само сильну дію, як VEGF.

Стимуляція мобілізації і/або диференціювання ендотеліальних клітин-попередників являє собою важливу нову терапевтичну стратегію для підвищення постнатальної неоваскуляризації, особливо васкулогенезу, і для лікування захворювань, які пов'язані з дисфункцією ендотеліальних клітин-попередників і/або ендотеліальних клітин.

В основу винаходу покладена задача одержання засобів та розробки способів для підвищеної стимуляції ендотеліальних клітин-попередників та лікування захворювань, які пов'язані особливо з дисфункцією ендотеліальних клітин-попередників.

Згідно з даним винаходом ця задача вирішується за рахунок застосування еритропоєтину і/або його похідних для стимуляції фізіологічної мобілізації ендотеліальних клітин-попередників, проліферації ендотеліальних клітин-попередників, диференціювання ендотеліальних клітин-попередників в ендотеліальні клітини і/або міграції ендотеліальних клітин-попередників у напрямку ангіогенного або васкулогенного стимулу в організмі людини або тварини. Згідно з даним винаходом, ця задача також вирішується за рахунок застосування еритропоєтину і/або його похідних для лікування захворювань або хворобливих станів, які пов'язані з дисфункцією ендотеліальних клітин-попередників і/або ендотеліальних клітин.

Згідно з винаходом несподівано встановлено, що обробка еритропоєтином приводить до фізіологічної мобілізації ендотеліальних клітин-попередників, причому підвищується кількість циркулюючих ендотеліальних клітин-попередників та індукується їх диференціювання, особливо при порівнянні низьких доз еритропоєтину. Крім того, компенсується виникаючий у випадку певних патологічних станів функціональний дефіцит ендотеліальних клітин-попередників. Згідно з винаходом показано, що у пацієнтів з хронічним захворюванням нирок в кінцевій стадії кількість циркулюючих стовбурових клітин точно така ж висока, як у здорових індивідумів, що випробовуються, однак, у цих пацієнтів ці стовбурові клітини втратили здатність до диференціювання в ендотеліальні клітини з ендотеліальних клітин-попередників. Так, у пацієнтів з хронічним захворюванням нирок кількість клітин, які є адгезивноздатними і належать до ендотеліального клітинного фенотипу, чітко зменшена в порівнянні зі здоровими індивідумами, які випробовуються. Згідно з винаходом, в цей час встановлено, що після обробки цих пацієнтів еритропоєтином кількість циркулюючих стовбурових клітин значно зростає на бі-

льше ніж 50 %. При цьому особливо різко підвищується кількість клітин, які належать до ендотеліального фенотипу. Як виявлено за допомогою функціонального тесту відносно клітинної культури, погіршена у пацієнтів з хронічним захворюванням нирок здатність ендотеліальних клітин-попередників до адгезії за рахунок обробки еритропоетином підвищується в три рази. Здатність ендотеліальних клітин-попередників, що диференціюються, відповідно, ендотеліальних клітин до адгезії являє собою одну з основних передумов утворення нових тканин і/або судин. Еритропоетин, таким чином, може індукувати неоваскуляризацію, особливо васкулогенез, в тканинах або органах, в яких вивільняються відповідні васкулогенні або ангіогенні стимули.

Згідно з винаходом еритропоетин (який в подальшому називається ЕРО) можна використовувати для стимуляції фізіологічної мобілізації ендотеліальних клітин-попередників, проліферації ендотеліальних клітин-попередників, диференціювання ендотеліальних клітин-попередників в ендотеліальні клітини і/або для міграції ендотеліальних клітин-попередників у напрямку васкулогенного або ангіогенного стимулу в організмі людини або тварини, особливо дорослого організму. Згідно з винаходом еритропоетин тому переважно можна використовувати для стимуляції новоутворення судин за рахунок васкулогенезу в тканинах або органах, в яких є патологічні зміни судин. На основі стимуляції ендотеліальних клітин-попередників за рахунок еритропоетину, крім того, можна також індукувати утворення ендотеліальної тканини. Згідно з винаходом еритропоетин тому можна також використовувати для лікування захворювань організму людини або тварини, які пов'язані з дисфункцією ендотеліальних клітин-попередників і/або ендотеліальних клітин.

Згідно з даним винаходом під терміном "еритропоетин", відповідно, "ЕРО" розуміють речовину, яка регулює ріст, диференціювання та дозрівання стовбурових клітин через еритробласти в еритроцити. Еритропоетин являє собою глікопротеїн, який включає 166 амінокислот, три сайти глікозилювання і має молекулярну масу приблизно 34000 Да. У рамках диференціювання еритроцитних клітин-попередників, яке індукується еритропоетином, індукується синтез глобуліну і посилюється синтез гемкомплексу, а також збільшується кількість рецепторів феритину. Завдяки цьому клітина може поглинати більше заліза і синтезувати функціональний гемоглобін. У зрілих еритроцитах гемоглобін зв'язує кисень. Таким чином, еритроцити, відповідно, гемоглобін, що міститься в них, виконують основну роль щодо постачання організму киснем. Ці процеси збуджуються за рахунок взаємодії еритропоетину з відповідним рецептором на поверхні еритроцитних клітин-попередників (Graber і Krantz, Ann. Rev. Med., 29, 51-56(1978)).

Еритропоетин утворюється головним чином в нирках, однак, в менших кількостях також в печінці та в головному мозку. У незначних кількостях еритропоетин знаходиться також в сироватці і в фізіологічних умовах щонайменше частково виділяється в сечі. У пацієнтів з нирковою недостатністю

еритропоетин (який в подальшому називається ЕРО) може утворюватися тільки в недостатній мірі, і внаслідок цього вони страждають анемією. Відомо, що компенсація недостатнього постачання еритропоетином за рахунок введення еритропоетину. Подальші клінічні використання еритропоетину полягають у застосуванні еритропоетину при ятрогенній анемії після хіміотерапії або променевої терапії злоякісних захворювань або вірусних інфекцій (Європейський патент EP 0456153-B1). З патенту США 4732889 відомо використання композицій для лікування асоційованої з ревматоїдним артритом анемії, які містять еритропоетин. З Міжнародної заявки WO-88/03808 відомо лікування гемохроматозу за допомогою композицій, які містять еритропоетин.

Поняття "еритропоетин", що використовується в даному контексті, включає еритропоетин будь-якого походження, особливо людський або тваринний еритропоетин. Поняття, що використовується в даному контексті, включає не тільки форми еритропоетину, що природно зустрічаються, тобто дикого типу, але і також його похідні, аналоги, модифікації, мутанти або інші, якщо вони мають біологічні дії еритропоетину дикого типу.

Згідно з даним винаходом під терміном "похідні" розуміють функціональні еквіваленти або похідні еритропоетину, які при збереженні основної структури еритропоетину одержують шляхом заміщення одного або декількох атомів або молекулярних груп, відповідно, залишків, особливо шляхом заміщення сахаридних ланцюгів, таких як етиленгліколь, і/або амінокислотні залишки яких відрізняються від людського або тваринного еритропоетину, що природно зустрічається, щонайменше однією позицією, які, однак, по суті мають високий ступінь гомології відносно амінокислот і порівнянню біологічну активність. Похідні еритропоетину, які, наприклад, можна використовувати згідно з даним винаходом, відомі, зокрема, з Міжнародної заявки WO-94/25055, Європейського патенту EP 0148605-B1 або Міжнародної заявки WO-95/05465.

Термін "гомологія" означає особливу ідентичність послідовностей щонайменше на 80 %, переважно щонайменше на 85 % і особливо переважно щонайменше більше, ніж на 90 %, 95 %, 97 % та 99 %. Відомий фахівцеві термін "гомологія", таким чином, характеризує ступінь спорідненості між двома або декількома поліпептидними молекулами, який визначається відповідністю між послідовностями. При цьому відповідність може означати як ідентичну відповідність, так і консервативну заміну амінокислоти.

Згідно з винаходом поняття "похідне" включає також злиті протеїни, у яких в N-кінцевій частині, відповідно, в C-кінцевій частині є функціональні домени іншого протеїну. Згідно з одним варіантом здійснення винаходу у випадку цього іншого протеїну мова може йти, наприклад, про GM-CSF, VEGF, PIGF, статин або інший фактор, який має стимулюючий вплив на ендотеліальні клітини-попередники. Згідно з іншим варіантом здійснення винаходу у випадку іншого протеїну мова може йти також про фактор, який виявляє стимулюючий

вплив на ендотеліальні клітини, що утворилися шляхом диференціювання, наприклад, про ангіогенін або bFGF (головний фактор росту фібробластів). Про bFGF відомо, що цей фактор росту надає сильний мітогенний та хемотактичний вплив на ендотеліальні клітини.

Відмінності між похідним еритропоетину та нативним еритропоетином можуть виникати, наприклад, за рахунок мутацій, таких як, наприклад, делеції, заміщення, інсерції, приєднання, обміни основ і/або рекомбінації нуклеотидних послідовностей, що кодують амінокислотні послідовності еритропоетину. Зрозуміло, при цьому мова може йти також про варіації послідовностей, що природно зустрічаються, наприклад, про послідовності з іншого організму або про послідовності, які мутують природним чином, або про мутації, які за допомогою звичайних, відомих у даній галузі засобів, наприклад, хімічних агентів і/або фізичних агентів, цілеспрямовано вводяться у кодуючі еритропоетин нуклеотидні послідовності. Згідно з винаходом поняття "похідне" тому включає також мутовані молекули еритропоетину, отже мутеїни еритропоетину.

Згідно з винаходом можна використовувати також пептидні або білкові аналоги еритропоетину. Відповідно до даного винаходу поняття "аналоги" включає сполуки, які не мають ніякої амінокислотної послідовності, ідентичної амінокислотній послідовності еритропоетину, однак, тривимірна структура яких дуже схожа на таку структуру еритропоетину і які тому мають порівнянну біологічну активність. У випадку аналогів еритропоетину мова може йти, наприклад, про сполуки, які містять відповідальні за зв'язування еритропоетину з його рецепторами амінокислотні залишки в придатній конформації і які тому можуть імітувати основні поверхневі властивості місця зв'язування еритропоетину. Такого роду сполуки описуються, наприклад, Wrighton і ін., Science, 273, 458 (1996).

Еритропоетин, що використовується згідно з винаходом, можна одержувати різним чином, наприклад, шляхом виділення з людської сечі або з сечі і плазми (включаючи сироватку) пацієнтів, які страждають на апластичну анемію (Miyake і ін., J. B. C., 252, 5558 (1977)). Людський еритропоетин, наприклад, також можна одержувати з тканинних культур людських ниркових ракових клітин (JA-OS 555790/1979), з людських лімфоцитів, які мають здатність до утворення людського еритропоетину (JA-OS 40411/1982), і з гібридомної культури, що одержується за рахунок злиття клітин людських клітинних ліній. Еритропоетин також можна одержувати шляхом генно-інженерних способів, тим, що за допомогою придатної ДНК або РНК, яка кодує відповідну амінокислотну послідовність еритропоетину, шляхом генної інженерії одержують бажаний протеїн, наприклад, в бактерії, дріжджах, рослинній або тваринній клітинній лінії. Такого роду способи описуються, наприклад, в Європейських патентах EP 0148605-B2 або EP 0205 564-B2, а також в EP 0411678-B1.

Даний винахід особливо належить до застосування еритропоетину (який в подальшому називається ЕРО) і/або його похідних для стимуляції фі-

зіологічної мобілізації ендотеліальних клітин-попередників, проліферації ендотеліальних клітин-попередників, диференціювання ендотеліальних клітин-попередників в ендотеліальні клітини і/або для міграції ендотеліальних клітин-попередників у напрямку васкулогенного або ангіогенного стимулу в організмі людини або тварини, особливо у дорослому організмі.

Згідно з даним винаходом під виразом "ендотеліальні клітини-попередники" (ендотеліальні клітини-попередники; ЕРС) розуміють циркулюючі в системі кровообігу клітини, які мають здатність до диференціювання в ендотеліальні клітини. У випадку ендотеліальних клітин-попередників, що зустрічаються під час ембріонального розвитку, мова йде про ангіобласти. У випадку ендотеліальних клітин-попередників, що зустрічаються у дорослому організмі, мова йде про подібні до ангіобластів клітини, які можуть виходити з мононуклеарних клітин, особливо моноцитів CD34⁺ CD14⁺ і/або стовбурових клітин CD34⁺, що виділяються з периферичної крові.

Згідно з даним винаходом під терміном "мобілізація" або "фізіологічна мобілізація" розуміють процес активації стовбурових клітин і/або клітин-попередників з кісткового мозку за допомогою факторів росту, причому стовбурові клітини і/або клітини-попередники попадають в коло кровообігу, особливо в периферичну кров.

Згідно з даним винаходом під терміном "проліферація" розуміють здатність клітин до збільшення і до подальшого поділу на дві або більшу кількість дочірніх клітин. Опосередкована еритропоетином стимуляція ендотеліальних клітин-попередників, таким чином, стосується особливо кількості і разом з тим поведінки при поділі ендотеліальних клітин-попередників.

Згідно з даним винаходом під терміном "диференціювання" ендотеліальних клітин-попередників розуміють розвиток виникаючих з кісткового мозку мононуклеарних клітин через ендотеліальні клітини-попередники в ендотеліальні клітини. Під терміном "ендотеліальні клітини" розуміють клітини, які утворюють ендотелій, тобто моношарову клітинну вистілку судин і серозних порожнин. Ендотеліальні клітини відрізняються тим, що вони вивільняють активні відносно судин речовини, наприклад, судинорозширювальні речовини, такі як EDRF (розслаблюючий фактор, що походить від ендотелію), або звужуючі речовини, такі як ендотелії, фактори пригнічення або активації згортання крові і фактори регуляції проникності судин. Ендотеліальні клітини також синтезують компоненти субендотеліальної сполучної тканини, особливо колагени типу IV та V, клітинно-адгезивні протеїни, такі як ламінін, фібронектин та тромбоспондин, фактори росту, наприклад, для гладком'язових клітин, і фактори новоутворення судин.

Згідно з даним винаходом під терміном "міграція" ендотеліальних клітин-попередників розуміють, що ендотеліальні клітини-попередники, що знаходяться в кровообігу, переміщуються у напрямку васкулогенного або ангіогенного стимулу і концентруються в області васкулогенного або ангіогенного стимулу. Під терміном "васкулогенний

стимул" розуміють хімічний подразник в тканині або кровоносній судині організму людини або тварини, який специфічно діє на ендотеліальні клітини-попередники і викликає їх переміщення до місця в організмі, з якого виходить хімічний подразник. За рахунок васкулогенного стимулу, таким чином, індукується процес васкулогенезу. Під терміном "ангіогенний стимул" розуміють хімічний подразник в тканині або кровоносній судині організму людини або тварини, який специфічно діє на ендотеліальні клітини, що утворилися шляхом диференціювання, і викликає їх міграцію до місця в організмі, з якого виходить хімічний подразник. Ангіогенний стимул таким чином спричиняє індукування ангіогенезу.

Згідно з наступним варіантом здійснення винаходу передбачається застосування еритропоетину і/або його похідних для підвищення адгезивної здатності ендотеліальних клітин-попередників, що диференціюються. Згідно з винаходом, еритропоетин особливо застосовують для поліпшення здатності ендотеліальних клітин-попередників до адгезії, тобто до адгезії клітина-клітина. Адгезія ендотеліальних клітин-попередників, які диференціюються, відповідно, які утворилися шляхом диференціювання ендотеліальних клітин, являє собою одну з основних передумов для утворення нових судин або нової ендотеліальної тканини. Клітинна адгезія опосередковується протеїновою молекулою.

Даний винахід належить також до застосування еритропоетину для стимуляції новоутворення судин, особливо стимуляції васкулогенезу. Згідно з даним винаходом під терміном "васкулогенез" розуміють новоутворення судин з *in situ* ендотеліальних клітин-попередників, що диференціюються. Згідно з винаходом за рахунок використання еритропоетину, отже, досягають того, що ендотеліальні клітини-попередники посилено мірою беруть участь в новоутворенні судин, відповідно, у локальному новоутворенні судин для відновлення пошкоджених областей судин. Згідно з винаходом, отже, передбачається, що застосування еритропоетину і/або його похідних сприяє утворенню нових кровоносних судин і/або заміні пошкоджених областей судин за рахунок локального новоутворення кровоносних судин.

Згідно з наступним варіантом здійснення винаходу передбачається застосування еритропоетину і/або його похідних для стимуляції ендотеліальних клітин-попередників з метою утворення ендотеліальної тканини.

Згідно з особливо переважним варіантом здійснення винаходу передбачається застосування еритропоетину і/або його похідних для лікування хворобливих станів або захворювань організму людини або тварини, які пов'язані з дисфункцією ендотеліальних клітин-попередників, або захворювань, що є наслідком попередніх захворювань.

Згідно з даним винаходом під термінами "захворювання", "хворобливі стани" або "хвороби" розуміють порушення життєвих процесів в органах або в усьому організмі з наслідком фізичних, психічних або розумових змін, що суб'єктивно відчуються, відповідно, і об'єктивно встановлюються.

Згідно з винаходом, мова йде особливо про захворювання, які пов'язані з дисфункцією ендотеліальних клітин-попередників, тобто захворювань, які або є наслідком такого роду дисфункції цих клітин, або опосередковуються цими клітинами. Під виразом "захворювання, що є наслідком попередніх захворювань", розуміють вторинні захворювання, тобто друге захворювання, яке приєднується до первинної картини хвороби.

Згідно з даним винаходом під терміном "дисфункція" ендотеліальних клітин-попередників розуміють порушення істотних функцій клітин, таких як інтенсивність обміну речовин, відповідь на подразнення, моторика, поведінка при поділі або поведінка при диференціюванні цих клітин. Дисфункція ендотеліальних клітин-попередників може полягати, наприклад, в тому, що ці клітини не проліферують або проліферують тільки в недостатній мірі. Оскільки завдяки застосуванню еритропоетину стимулюється проліферація ендотеліальних клітин-попередників, за рахунок цього може компенсуватися недостатня поведінка при поділі як ендотеліальних клітин-попередників, так і ендотеліальних клітин, які вже утворилися шляхом диференціювання, і може підвищуватися кількість ендотеліальних клітин-попередників, відповідно, ендотеліальних клітин. Дисфункція ендотеліальних клітин-попередників може полягати, наприклад, в порушеній здатності цих клітин до диференціювання в ендотеліальні клітини. Дисфункція ендотеліальних клітин-попередників може бути також зумовлена їх порушеною здатністю до адгезії і/або їх порушеною здатністю до міграції у напрямку ангіогенного або васкулогенного стимулу. Такі дисфункції ендотеліальних клітин-попередників можуть призводити до того, що, наприклад, погіршується або попереджається новоутворення ендотеліальної тканини і/або васкулогенез. Дисфункція ендотеліальних клітин-попередників може бути також зумовлена патогенно, наприклад, за рахунок гіпертонії, гіперліпидемії, уремії або діабету. Дисфункція ендотеліальних клітин-попередників може виражатися, наприклад, в зменшеному продукуванні NO (= EDRF) за рахунок NO-синтаз (NOS) з L-аргініну, підвищеному продукуванні ендотеліну і/або в посиленому продукуванні адгезивних молекул, таких як ICAM-1 та VCAM-1.

Згідно з винаходом у випадку захворювань, які пов'язані з дисфункцією ендотеліальних клітин-попередників, мова йде особливо про гіперхолестеринемію, цукровий діабет, опосередковані ендотелієм хронічні запальні захворювання, такі як васкуліти, ендотеліоз, включаючи ретикулоендотеліоз, атеросклероз, коронарна хвороба серця, ішемія міокарда, стенокардія, зумовлене віком серцево-судинне захворювання, ішемічні захворювання кінцівок, хвороба Рейно, прееклампсія, викликана вагітністю гіпертонія, хронічна або гостра ниркова недостатність, особливо термінальна ниркова недостатність, серцева недостатність, загоєння ран, а також захворювання, що є наслідком попередніх захворювань.

"Гіперхолестеринемія" характеризується підвищеними концентраціями холестерину в крові.

Набагато більш частою формою первинних гіперхолестеринемій є полігенна гіперхолестеринемія. Вторинні гіперхолестеринемії часто виникають при цукровому діабеті, нефротичному синдромі, гіпотиреозі та захворюваннях печінки.

Під поняттям "цукровий діабет" об'єднують різні форми порушень метаболізму глюкози з різною етіологією і симптоматикою. За виникнення судинно-зумовлених діабетичних ускладнень відповідає особливою системою AGE-RAGE. AGE (утворені з глікацією кінцеві продукти) утворюються за рахунок ряду складних реакцій після тривалої витримки протеїнів або ліпідів з редуруючими цукрами, наприклад, з глюкозою. Утворення AGE відбувається під час нормального процесу старіння, а також в підвищеній мірі при цукровому діабеті та хворобі Альцгеймера. За рахунок зв'язування AGE виникає окислювальний стрес, активація фактора транскрипції NF-κB і разом з цим порушення ендотеліального гомеостазу.

"Опосередковані ендотелієм хронічні запальні захворювання" являють собою захворювання або стани організму людини або тварини, які ґрунтуються на захисній реакції організму і його тканин по відношенню до подразників, які заподіюють шкоду, причому певні сигнальні молекули змінюють властивості ендотеліальних клітин, так що укупі з активацією інших клітинних типів лейкоцити прилипають до ендотеліальних клітин, нарешті, укорінюються в тканині і там спричиняють запалення. Прикладом опосередкованого ендотелієм запалення є лейкоцитарний васкуліт. Центральну роль при активації опосередкованого ендотелієм запального явища відіграє фактор транскрипції NF-κB. Іншою системою, яка призводить до виникнення опосередкованих ендотелієм хронічних запалень, є система AGE-RAGE.

Під терміном "ендотеліоз" розуміють дегенеративні і проліферативні зміни ендотелію при простатиті. Під терміном "ретикуючий ендотеліоз" розуміють захворювання ретикулоцитотарної системи, такі як ретикулоз, ретикульоз, ретикулоцитотоз і хвороба Хенда-Шюлера-Кресчета.

Під терміном "ішемія міокарда" розуміють анемію або недостатній кровотік, отже, порушення кровопостачання м'язової стінки серця внаслідок недостатнього або відсутнього артеріального припливу крові. У випадку "інфаркту серця" або "інфаркту міокарда" мова йде про некроз описаної ділянки серцевого м'яза, який частіше за все з'являється як виникаюче гостре ускладнення при хронічній коронарній хворобі серця. У випадку "коронарної хвороби серця" або "ішемічної хвороби серця" мова йде про дегенеративне коронарне захворювання, яке, зумовлене звуженням або закупоркою вінцевих судин серця, призводить до зменшеного кровопостачання серцевого м'яза. Під терміном "стенокардія" розуміють активну коронарну недостатність або стенокардію, яка може виникати за рахунок диспропорції пропозиції кисню і потреби в кисні при коронарній хворобі серця, коронарних спазмах, порушеннях кровотоку, порушеннях серцевого ритму, гіпертонії або гіпотонії. Під терміном "хвороба Рейно" розуміють зумовлені вазоконстрикцією, тобто спазмами судин, вини-

каючі нападоподібно ішемічні стани частіше за все в артеріях пальців. Первинна хвороба Рейно являє собою чисто функціональне порушення маленьких кровопостачальних судин кінцівок, в той час як основу вторинної хвороби Рейно становить інше захворювання, наприклад васкуліт.

"Преекламсія" являє собою хворобу ендотелію і судин материнського організму і, мабуть, є результатом впливу ендотеліотропних речовин з плаценти. Преекламсія являє собою багатосистемне захворювання, яке призводить до функціональних порушень численних органів і може виражатися в різноманітних симптомах. Типові для захворювання порушення кровопостачання є наслідком підвищеного опору судин, який локально може проявлятися різним чином. Для преекламсії вважається гарантованим, що ендотеліальна дисфункція являє собою центральний компонент патогенезу.

Під терміном "ниркова недостатність" розуміють, згідно з даним винаходом, обмежену здатність нирок до виділення обов'язкових для сечі речовин, причому на прогресуючих стадіях відбувається втрата також здатності регуляції електролітного, водного та кислотно-основного балансу. Термінальна ниркова недостатність характеризується спільним руйнуванням екскреторної та ендокринної ниркової функції.

При нирковій недостатності мова може йти, згідно з винаходом, про активну ниркову недостатність, яку називають також гостра ниркова недостатність, шоків нирка або шоків анурія. Гостра ниркова недостатність характеризується раптовою частковою або повною втратою екскреторної ниркової функції як наслідок частіше за все оборотного пошкодження нирок. Причиною можуть бути недостатня перфузія за рахунок гіповолемії, гіпотонії і дегідратації внаслідок крововтрати (політравма, шлунково-кишкова або постпартальна кровотеча, великі операційні втручання у випадку серця, судин, черевної порожнини або простати), шок (інфаркт міокарда, емболія), важкі інфекції (сепсис, перитоніт, холецистит), гемоліз (гемолітично-уремічний синдром, пароксизмальна гемоглобінурія, проміжне падіння трансфузії), міоліз (краш-синдром, рабдоміоліз, міозит, опіки), зневоднення і втрати електролітів (масивне блювання, діареї, надмірне потіння, кишкова непрохідність, гострий панкреатит). Іншими причинами можуть бути нефротоксини, такі як екзогенні токсини, наприклад, анілін, гліколеві сполуки, метанол і подібні, або ендогенні токсини, наприклад, міоглобін та оксалати. Подальшими причинами гострої ниркової недостатності є захворювання нирок, такі як, наприклад, запальні нефропатії або реакції відторгнення після трансплантації нирки. Гостра ниркова недостатність може виникати також за рахунок затримки сечі внаслідок ускладнень сечовиділення. Лікування гострої ниркової недостатності за допомогою еритропоєтину, що пропонується згідно з винаходом, приводить, згідно з винаходом, до запобігання або щонайменше до зменшення прогресування гострої ниркової недостатності.

При нирковій недостатності, згідно з винаходом, мова може йти також про хронічну ниркову

недостатність. Причинами хронічної ниркової недостатності є судинні, гломерулярні та тубулоінтерстиціальні захворювання нирок, інфекції, а також уроджені або набуті структурні дефекти. Причинами хронічної ниркової недостатності є, зокрема, хронічна гломерулопатія, хронічний пієлонефрит, нефропатія за рахунок анальгетиків, закупорююча уропатія, а також артеріо- та артеріолосклероз. Хронічна ниркова недостатність зрештою переходить в уремію. Лікування хронічної ниркової недостатності за допомогою еритропоетину, що пропонується згідно з винаходом, приводить, згідно з винаходом, до зменшення прогресування хронічної ниркової недостатності.

Згідно з даним винаходом під терміном "серцева недостатність" розуміють картину хвороби, яку також називають як недостатність функціонування міокарда або слабкість серцевого м'яза. Серцева недостатність характеризується недостатньою функцією серця, при якій серце більше не в змозі розвивати відповідну вимогам потужність. Класифікацію серцевої недостатності можна здійснювати з різних точок зору. Відповідно ураженій частині серця здійснюють, наприклад, поділ на праву серцеву недостатність, ліву серцеву недостатність і недостатність з обох сторін (загальна серцева недостатність). У залежності від стабільності рівноваги, на яку впливають фізіологічні і терапевтичні механізми, розрізняють компенсовану і декомпенсовану серцеву недостатність. Відповідно до протікання процесу здійснюють підрозділ на гостру і хронічну серцеву недостатність. Причинами серцевої недостатності є, зокрема, інфаркт серця, кардіоміопатія, уроджений або набутий порок серця, артеріальна або легенева гіпертонія, порушення серцевого ритму, коронарна хвороба серця або міокардит.

Згідно з даним винаходом під терміном "загоєння рани" розуміють фізіологічні процеси для регенерації порушеної тканини, відповідно, для закриття рани, особливо новоутворення сполучної тканини і капілярів. При загоєнні рани мова може йти про первинне загоєння рани (*Sanatio per primam intentionem*), яке характеризується швидким і без ускладнень закриттям і подальшим *Restitutio ad interum* внаслідок мінімального новоутворення сполучної тканини з хорошим кровопостачанням і, у разі необхідності, адаптованими краями чистої рани. У випадку ран з особливо роздавленими або некротичними краями, які знаходяться на відстані один від одного, відповідно, з рановими інфекціями здійснюється уповільнене вторинне загоєння рани (*Sanatio per secundam intentionem*), при якому за рахунок (а) бактерійного запалення відбувається заповнення дефекту тканини за допомогою грануляційної тканини і розширеного утворення рубцевої тканини. Епітелізація краю завершує загоєння рани. Загоєння рани поділяють на три фази, а саме, латентну фазу, фазу проліферації і репаративну фазу. Латентну фазу знову поділяють на ексудативну фазу з утворенням струпа, особливо в перші години після виникнення рани, і резорбтивну фазу з катабольним аутолізом, яка продовжується протягом періоду часу від одного до трьох днів після виникнення рани. Фаза проліфе-

рації характеризується анабольною репарацією з утворенням колагену за рахунок фібробластів і настає на четвертий-сьомий день після виникнення рани. Починаючи з восьмого дня після виникнення рани настає репаративна фаза, яка характеризується перетворенням грануляційної тканини в рубець.

Під терміном "рана" згідно з даним винаходом розуміють порушення сполучності тканин організму з втратою або без втрати речовини, яке відбувається за рахунок механічного поранення або фізично зумовленого пошкодження клітин. Формами рани є механічні рани, термічні рани, хімічні рани, зумовлені випромінюванням рани і зумовлені хворобою рани. Механічні рани утворюються за рахунок зовнішнього насильного впливу і виникають передусім у вигляді різаних і колотих ран, ран від подряпин і укушених ран та вогнепальних ран. Термічні рани виникають за рахунок впливу нагріву або холоду. Хімічні рани виникають особливо за рахунок травлення за допомогою кислот або лугів. Зумовлені випромінюванням рани виникають, наприклад, за рахунок впливу актинічного та іонізуючого випромінювання. Рани, що з'являються в результаті хвороби, являють собою особливо зумовлені застоєм рани, травматичні рани, діабетичні рани і т. д. Згідно з винаходом особливо передбачається, що для загоєння рани еритропоетин переважно застосовують локально або внутрішньовенно.

Даний винахід належить до застосування еритропоетину для лікування гіперхолестеринемії, цукрового діабету, опосередкованих ендотелієм хронічних запальних захворювань, ендотеліозу, включаючи ретикулоендотеліоз, атеросклерозу, коронарної хвороби серця, ішемії міокарда, стенокардії, зумовлених старінням серцево-судинних захворювань, ішемічних захворювань кінцівок, прееклампсії, хвороби Рейно, викликаній вагітністю гіпертонії, хронічної або гострої ниркової недостатності, особливо термінальної ниркової недостатності, серцевої недостатності, загоєння ран і захворювань, що є наслідком попередніх захворювань.

Згідно з винаходом передбачається, що еритропоетин вводять пацієнту в терапевтично ефективній дозі, яка є достатньою для лікування стану вищезгаданого захворювання, особливо захворювання, яке пов'язане з дисфункцією ендотеліальних клітин-попередників, або для профілактики цього стану, припинення прогресування такого захворювання і/або полегшення симптомів такого захворювання. Доза, що вводиться пацієнту, залежить від множини факторів, наприклад, від віку, маси тіла і статі пацієнта, тяжкості захворювань і т. д.

Особливо переважно, згідно з винаходом, еритропоетин у випадку всіх застосувань, способів і композицій, відповідно до даного винаходу, використовують в дуже незначних кількостях, які, як відомо, нижче кількостей, що використовувались, причому особливо вводять *in vivo*, тобто на пацієнта, дози еритропоетину від 200 одиниць до 2000 одиниць (Од.; міжнародні одиниці) на тиждень, переважно дози від 500 до 2000 Од. на тиждень, в

залежності від тяжкості захворювання і в залежності від функції нирок. У випадку доз, що передбачаються згідно з винаходом, від 200 одиниць до 2000 одиниць (Од.) на тиждень і на пацієнта, особливо від 500 до 2000 Од. на тиждень і на пацієнта, мова йде про субполіцитемічні дози, тобто дози, які не призводять до еритроцитозу зі значеннями гематокриту більше, ніж 50 %. Субполіцитемічні дози, що передбачаються згідно з винаходом, відповідають щотижневим дозам приблизно від 1 до 90 одиниць (Од.) ЕРО/кг маси тіла, особливо 1-45 Од. ЕРО/кг маси тіла, або порівнянній тижневій дозі аранеспу 0,005-0,45 мг/кг маси тіла, особливо 0,005-0,225 мг/кг маси тіла. У випадку аранеспу мова йде про вдвічі поліетиленглікольований еритропоетин. Доза 200-2000 Од. на тиждень на пацієнта, особливо 500-2000 Од. на тиждень і на пацієнта, яка передбачається згідно з винаходом для лікування захворювань або хворобливих станів, що протікають з дисфункцією ендотеліальних клітин-попередників, є дуже низькою в порівнянні з початковою дозою 50-150 Од./кг маси тіла на тиждень (як правило, що починається з 4000-8000 Од. на тиждень, при незадовільному результаті лікування, однак, також значно вище), що звичайно використовується для лікування ренальної анемії.

Особливо переважний варіант здійснення винаходу належить до застосування еритропоетину і/або його похідних як біологічно активної речовини для одержання фармацевтичної композиції або лікарського засобу з метою лікування хворобливих станів або захворювань, які пов'язані з дисфункцією ендотеліальних клітин-попередників.

Згідно з винаходом під терміном "біологічно активна речовина" розуміють гомологічну або чужорідну речовину, яка при контакті з молекулами-мішенями або клітинами-мішенями, або тканинами-мішенями впливає на специфічні функції тканин, органів або організмів диференційованим чином. Згідно з винаходом також передбачається, що еритропоетин як біологічно активна речовина фармацевтичної композиції, яка пропонується згідно з винаходом, при контакті з ендотеліальними клітинами-попередниками впливає на їх поведінку у відношенні проліферації, диференціювання і/або міграції в організмі людини або тварини таким чином, що компенсуються дисфункція ендотеліальних клітин-попередників і можна ефективно боротися, полегшувати або усувати виникаючі внаслідок цих дисфункцій захворювання, відповідно, можна ефективно попереджати ці захворювання.

Згідно з даним винаходом під виразом "фармацевтична композиція" або "лікарський засіб" розуміють суміш, яка використовується для діагностичних, терапевтичних і/або профілактичних цілей, отже, яка сприяє або поновлює здоров'я організму людини або тварини, яка включає щонайменше одну природну або синтетично одержану біологічно активну речовину, яка надає терапевтичну дію. Фармацевтична композиція може бути як твердою, так і рідкою сумішшю. Наприклад, фармацевтична композиція, що включає біологічно активну речовину, може містити один або декілька

фармацевтично прийнятних компонентів. Крім того, фармацевтична композиція може включати звичайно домішки, що використовуються в даній галузі, наприклад, стабілізатори, засоби для одержання готової форми, мастила, порофори, емульгатори або інші, що звичайно використовуються для одержання фармацевтичної композиції речовини.

Згідно з винаходом особливо передбачається застосування еритропоетину і/або його похідна як біологічно активна речовина для одержання лікарського засобу з метою лікування гіперхолестеринемії, цукрового діабету, опосередкованих ендотелієм хронічних запальних захворювань, таких як васкуліти, ендотеліоз, включаючи ретикулоендотеліоз, атеросклероз, коронарна хвороба серця, ішемія міокарда, стенокардія, зумовлене старінням серцево-судинне захворювання, ішемічні захворювання кінцівок, хвороба Рейно, прееклампсія, гіпертонія, що викликається вагітністю, гостра або хронічна ниркова недостатність, особливо термінальна ниркова недостатність, серцева недостатність, загоєння рани, а також захворювання, що є наслідком попередніх захворювань.

Фармацевтична композиція, що пропонується згідно з винаходом, може бути придатна як для локального, так і для системного введення.

Згідно з переважним варіантом здійснення винаходу передбачається, що фармацевтична композиція застосовується для парентерального, особливо внутрішньовенного, внутрішньом'язового, інтрадермального або підшкірного введення. Лікарський засіб, який містить еритропоетин, переважно має форму ін'єкції або інфузії.

Згідно з наступним застосуванням передбачається, що фармацевтична композиція, яка містить еритропоетин, вводиться перорально. Наприклад, лікарський засіб, який містить еритропоетин, вводять в рідкій формі застосування, такий як розчин, суспензія або емульсія, або твердій формі застосування, такий як таблетка.

Згідно з наступним застосуванням передбачається, що фармацевтична композиція придатна для легеневого введення або для інгаляції. Згідно з винаходом, отже, передбачається, що еритропоетин терапевтичне ефективним чином вводиться прямо в легені пацієнта. Ця форма введення еритропоетину дозволяє швидко вводити дозу еритропоетину пацієнту без необхідності здійснення ін'єкції. При надходженні еритропоетину через легені в кровообіг можуть вводитися значні кількості еритропоетину через легені, що приводить до підвищених кількостей еритропоетину в системі кровообігу. Згідно з переважним варіантом здійснення винаходу у випадку фармацевтичної композиції, що вводиться через легені, мова йде про водний або неводний розчин або про сухий порошок. При знаходженні лікарського засобу, який вводиться через легені і містить еритропоетин, в формі сухого порошку він включає переважно частинки, які містять еритропоетин, причому частинки мають діаметр менше, ніж 10мкм, так що лікарський засіб може досягати також дистальних областей легень пацієнта. Згідно з особливо переважним варіантом здійснення винаходу

передбачається, що лікарський засіб, що вводиться через легені, знаходиться в формі аерозолі.

Особливо переважний варіант здійснення винаходу належить до застосування еритропоетину для одержання фармацевтичної композиції з метою лікування захворювань, пов'язаних з дисфункцією ендотеліальних клітин-попередників, причому фармацевтична композиція, поряд з еритропоетином як біологічно активною речовиною, містить щонайменше одну іншу додаткову біологічно активну речовину для стимуляції ендотеліальних клітин-попередників.

У випадку іншої біологічно активної речовини мова йде переважно про біологічно активну речовину, яка особливо стимулює фізіологічну мобілізацію ендотеліальних клітин-попередників з кісткового мозку. Згідно з винаходом у випадку іншої біологічно активної речовини, однак, мова також може йти про біологічно активну речовину, яка особливо стимулює поведінку відносно поділу, отже, проліферації ендотеліальних клітин-попередників. Згідно з винаходом, однак, існує також можливість того, що інша біологічно активна речовина стимулює особливо поведінку відносно диференціювання і/або поведінку відносно міграції ендотеліальних клітин-попередників. У випадку іншої стимулюючої ендотеліальні клітини-попередники біологічно активної речовини особливо переважно мова йде про VEGF, PIGF, GM-CSF, інгібітор HMG-CoA-редуктази, особливо про статин, такий як симвастатин, мевастатин або аторвастатин, і/або про донор NO, особливо про L-аргінін.

Згідно з винаходом також передбачається, що щонайменше одна інша біологічно активна речовина стимулює особливо ендотеліальні клітини, що утворилися шляхом диференціювання, тобто їх проліферацію і/або міграцію, але не ендотеліальні клітини-попередники. При цьому особливо переважно мова йде про bFGF (основний фактор росту фібробластів) або ангіогенін.

Наступний варіант здійснення винаходу належить до застосування еритропоетину і/або його похідних як біологічно активної речовини для одержання фармацевтичної композиції для стимуляції ендотеліальних клітин-попередників, особливо з метою стимуляції мобілізації, проліферації, диференціювання в ендотеліальні клітини і/або для міграції у напрямку васкулогенного або ангіогенного стимулу. Згідно з винаходом, далі, передбачається застосування еритропоетину і/або його похідних як біологічно активної речовини для одержання фармацевтичної композиції з метою стимуляції васкулогенезу і/або утворення ендотелію, особливо в організмі дорослої людини або тварини.

Даний винахід таким чином належить також до фармацевтичних композицій для стимуляції ендотеліальних клітин-попередників, особливо для стимуляції їх мобілізації, проліферації, диференціювання в ендотеліальні клітини і/або міграції у напрямку васкулогенного або ангіогенного стимулу, для стимуляції васкулогенезу і/або утворення ендотелію і для лікування захворювань організму людини або тварини, які пов'язані з дисфункцією ендотеліальних клітин-попередників і/або ендоте-

ліальних клітин. Даний винахід особливо належить до фармацевтичних композицій або лікарських засобів, які включають еритропоетин як біологічно активну речовину і щонайменше одну іншу біологічно активну речовину для стимуляції ендотеліальних клітин-попередників і/або ендотеліальних клітин, що утворилися шляхом диференціювання. Згідно з переважним варіантом здійснення даний винахід належить до фармацевтичних композицій, які включають еритропоетин і щонайменше одну іншу біологічно активну речовину, вибрану з групи, яка складається з VEGF, PIGF, GM-CSF, інгібітора HMG-CoA-редуктази, особливо статину, такого як симвастатин, мевастатин або аторвастатин, донора NO, особливо L-аргініну, bFGF і ангіогеніну.

Наступний переважний варіант здійснення винаходу належить до застосування еритропоетину для одержання препарату ендотеліальних клітин, який трансплантується. Згідно з винаходом, при цьому особливо передбачається, що ендотеліальні клітини одержують *in vitro* шляхом культивування ендотеліальних клітин-попередників в присутності еритропоетину і потім трансплантують в організм реципієнта, особливо в організм, який страждає на захворювання, яке пов'язане з дисфункцією ендотеліальних клітин-попередників. Наприклад, мононуклеарні клітини (MNC) можна виділяти з крові за допомогою центрифугування в градієнті щільності і культивувати *in vitro* в придатних культуральних середовищах. Способи виділення і культивування *in vitro* мононуклеарних клітин описуються, наприклад, Asahara, Science, 275, 964-967 (1997); Dimmeler і ін., J. Clin. Invest, 108, 391-397 (2001); і Llevadot і м., J. Clin. Invest., 108, 399-405 (2001). Потім мононуклеарні клітини культивують далі в присутності еритропоетину, щоб стимулювати ендотеліальні клітини-попередники, які містяться в мононуклеарних клітинах, відносно їх поведінки відносно проліферації та диференціювання і особливо підвищувати кількість диференційованих адгезивних ендотеліальних клітин. Згідно з винаходом також передбачається, що культивування мононуклеарних клітин здійснюють в присутності еритропоетину і щонайменше однієї іншої речовини, яка стимулює проліферацію та диференціювання ендотеліальних клітин-попередників. Як іншу речовину особливо переважно використовують VEGF, PIGF, GM-CSF, донор NO, такий як L-аргінін, або інгібітор HMG-CoA-редуктази, такий як статин, особливо симвастатин, мевастатин або аторвастатин.

Згідно з іншим переважним варіантом здійснення винаходу передбачається застосування еритропоетину для попередньої обробки і/або подальшої обробки тканин або органів, що трансплантуються. При цьому трансплантати обробляють еритропоетином перед трансплантацією, переважно безпосередньо перед нею, ще в організмі донора. Організм реципієнта також можна обробляти еритропоетином в момент трансплантації. За рахунок цієї обробки еритропоетином органів або тканин, що трансплантуються, як безпосередньо перед, так і після трансплантації, згідно з винаходом досягають того, що в трансплантаті після

здійсненої трансплантації в організм на основі індукованого васкулогенезу швидко утворюються нові кровоносні судини і ці кровоносні судини, що знову утворилися, швидко зв'язуються з кровоносною системою організму реципієнта. Таким чином, також швидко досягається утворення ендотелію. Обробка трансплантатів органів або тканин за допомогою еритропоєтину спричиняє, таким чином, більш швидке вrostання цих систем в організм, завдяки чому значно зменшується ризик відторгнення.

Згідно з наступним варіантом здійснення винаходу передбачається, що трансплантати органів або тканин перед трансплантацією обробляють еритропоєтином в поєднанні щонайменше з одним іншим фактором, який стимулює ендотеліальні клітини-попередники. У випадку цього фактора переважно мова йде про речовину, вибрану з групи, яка складається з VEGF, PIGF, GM-CSF, інгібітора HMG-CoA-редуктази, такого як, наприклад, статин, особливо симвастатин, мевастатин або аторвастатин, або донора NO, особливо L-аргініну. Згідно з наступним варіантом здійснення передбачається, що трансплантати органів або тканин перед трансплантацією обробляють, поряд з еритропоєтином, за допомогою іншої речовини, яка стимулює проліферацію і міграцію ендотеліальних клітин, що утворилися шляхом диференціювання. У випадку цієї речовини особливо переважно мова йде про ангіогенін або bFGF. Згідно з наступним варіантом здійснення передбачається, що попередню обробку трансплантатів органів або тканин еритропоєтином здійснюють при використанні виділених і, у разі необхідності, культивованих *in vitro* ендотеліальних клітин-попередників.

Згідно з іншим особливо переважним варіантом здійснення винаходу передбачається, що еритропоєтин застосовують для приготування *in vitro* органів або -тканин, що імплантуються або трансплантуються, які містять клітини. Згідно з винаходом, особливо передбачається, що одержаний *in vitro* орган або тканину перед трансплантацією або імплантацією обробляють *in vitro* еритропоєтином, щоб стимулювати ендотеліальні клітини-попередники, що знаходяться в організмі реципієнта, особливо їх фізіологічну мобілізацію, міграцію, проліферацію та диференціювання. Переважно, організм реципієнта після трансплантації, відповідно, імплантації *in vitro*-органа або -тканини обробляють далі еритропоєтином в дозах, що пропонуються згідно з винаходом. За рахунок обробки *in vitro*-органа або -тканини перед трансплантацією, відповідно, імплантацією за допомогою еритропоєтину і, у разі необхідності, додаткової обробки організму реципієнта за допомогою еритропоєтину згідно з винаходом досягають того, що в системі *in vitro*-органа або -тканини після здійсненої трансплантації або імплантації в організм на основі індукованого васкулогенезу швидко утворюються нові кровоносні судини і ці кровоносні судини, що знову утворилися, швидко зв'язуються з кровоносною системою організму реципієнта. Таким чином, також швидко досягається утворення ендотелію і тим самим реендотеліалізація. Обробка систем *in vitro*-органів або -тканин за допомогою еритропоє-

тину, таким чином, спричиняє більш швидке вrostання цих систем в організм, завдяки чому значно зменшується ризик відторгнення, і служить для захисту трансплантата.

Під виразом "система *in vitro*-органа або -тканини" розуміють тканину або орган, що трансплантуються або імплантуються, які містять клітини, яку (який) одержують *in vitro* при застосуванні певних клітин і/або певної тканини і в певних умовах культивування. Під "системою *in vitro*-органа або -тканини, що імплантується" розуміють систему, яка нарівні з клітинами включає чужорідні речовини. Під "системою *in vitro*-органа або -тканини, що трансплантується" розуміють особливо систему, що містить клітини, яка нарівні з клітинами містить гомологічні тканинам або органам одного і того самого або іншого індивідуума речовини. *In vitro*-орган або -тканини відрізняються особливо тим, що відносно їх будови вони значною мірою відповідають нативним органам або тканинам, що замінюються, і, таким чином, *in vivo* можуть брати на себе функцію замінених нативних органів або тканин.

Згідно з варіантом здійснення, що пропонується у винаході, передбачається, що системи *in vitro*-органів або -тканин перед трансплантацією, відповідно, імплантацією обробляють еритропоєтином в поєднанні щонайменше з одним іншим фактором, стимулюючим ендотеліальні клітини-попередники. У випадку цього фактора переважно мова йде про речовину, вибрану з групи, яка складається з VEGF, PIGF, GM-CSF, інгібітора HMG-CoA-редуктази, особливо симвастатину, мевастатину або аторвастатину, і донора NO. Згідно з наступним варіантом здійснення передбачається, що системи *in vitro*-органів або -тканин перед трансплантацією, відповідно, імплантацією обробляють, поряд з еритропоєтином, за допомогою іншої речовини, яка стимулює проліферацію і міграцію ендотеліальних клітин, що утворилися шляхом диференціювання. У випадку цієї речовини особливо переважно мова йде про ангіогенін або bFGF. Згідно з іншим варіантом здійснення, передбачається, що системи *in vitro*-органів або -тканин додатково містять виділені і, у разі необхідності, *in vitro* культивовані ендотеліальні клітини-попередники.

Подальший переважний варіант здійснення винаходу належить до застосування еритропоєтину для одержання протезів судин або серцевих клапанів, причому протези судин або серцеві клапани перед введенням в організм, особливо організм людини, покривають еритропоєтином. За рахунок покривання протезів судин або серцевих клапанів еритропоєтином досягають того, що в організмі реципієнта стимулюються ендотеліальні клітини-попередники, причому стимулюються особливо їх мобілізація з кісткового мозку, їх проліферація, їх диференціювання в ендотеліальні клітини і їх міграція до протезів судин, що використовуються, або серцевих клапанів. Після введення таким чином одержаного протеза судини або серцевого клапана в організм його можна обробляти далі за допомогою еритропоєтину, особливо в дозах, що пропонуються згідно з винаходом. Зу-

мовлене цим швидше відбувається утворення ендотеліальних шарів на протезах судин, що використовуються, і більш швидке вrostання в уражені області організму. Згідно з переважним варіантом здійснення передбачається, що для покриття протезів судин і серцевих клапанів додатково використовують виділені і, у разі необхідності, культивовані *in vitro* ендотеліальні клітини-попередники.

Даний винахід належить також до способу стимуляції утворення ендотеліальних клітин *in vitro*, який включає:

- а) виділення популяцій клітин, які містять ендотеліальні клітини-попередники, з крові за допомогою центрифугування в градієнті щільності;
- б) культивування виділених популяцій клітин, які містять ендотеліальні клітини-попередники, в середовищі для культивування клітин; і
- с) культивування популяцій клітин в присутності еритропоєтину.

Згідно з винаходом культивування популяцій клітин можна здійснювати в присутності іншої речовини, яка стимулює ендотеліальні клітини-попередники.

Даний винахід належить, далі, до способу лікування захворювань, які пов'язані з дисфункцією ендотеліальних клітин-попередників, шляхом введення еритропоєтину в дозі від 200 до 2000 Од. на тиждень, особливо в дозі від 500 до 2000 Од. на тиждень, пацієнту з таким захворюванням. Спосіб, що пропонується згідно з винаходом, особливо придатний для лікування захворювань людського організму, таких як гіперхолестеринемія, цукровий діабет, опосередковані ендотелієм хронічні запальні захворювання, такі як васкуліти, ендотеліоз, включаючи ретикулоендотеліоз, атеросклероз, коронарна хвороба серця, ішемія міокарда, стенокардія, зумовлене віком серцево-судинне захворювання, ішемічні захворювання кінцівок, хвороба Рейно, преєклампсія, викликана вагітністю гіпертонія, гостра або хронічна ниркова недостатність, особливо термінальна ниркова недостатність, серцева недостатність, загоєння ран, а також захворювання, що є наслідком попередніх захворювань.

Згідно з переважним варіантом здійснення способу лікування захворювань, що пропонується у винаході, які пов'язані з дисфункцією ендотеліальних клітин-попередників, передбачається, що пацієнту, поряд з еритропоєтином, вводять щонайменше одну іншу біологічно активну речовину, вибрану з групи, яка складається з VEGF, PlGF, GM-CSF, інгібітора HMG-CoA-редуктази і донора NO. У випадку інгібітора HMG-CoA-редуктази, що вводиться, мова йде переважно про статин, такий як симвастатин, мевастатин або аторвастатин. У випадку донора NO, що вводиться, мова йде переважно про L-аргінін.

Згідно з наступним переважним варіантом здійснення способу лікування захворювань, що пропонується у винаході, які пов'язані з дисфункцією ендотеліальних клітин-попередників, передбачається виділення ендотеліальних клітин-попередників з крові організму людини, культивування *in vitro* при застосуванні еритропоєтину та диференціювання в ендотеліальні клітини і, після очищення і виділення ендотеліальних клітин, що

утворилися за рахунок диференціювання, відповідно, ендотеліальних клітин-попередників, що диференціюються, потім їх цілеспрямоване трансплантування в область організму, тканину або орган пацієнта, яка (який) пошкоджена (пошкоджений) внаслідок дисфункції ендотеліальних клітин-попередників і/або ендотеліальних клітин, щоб індукувати там локальне новоутворення ендотелію. Таким чином, можливо більш цілеспрямоване і більш швидке лікування ушкоджених областей організму, тканин і/або органів пацієнта. Цей варіант здійснення способу лікування захворювань, що пропонується у винаході, які пов'язані з дисфункцією ендотеліальних клітин-попередників, включає наступні стадії:

- а) виділення популяцій клітин, які містять ендотеліальні клітини-попередники, з крові за допомогою центрифугування в градієнті щільності;
- б) культивування популяцій клітин, які містять ендотеліальні клітини-попередники, в середовищі для культивування клітин;
- с) культивування популяцій клітин, які містять ендотеліальні клітини-попередники, в присутності еритропоєтину для стимуляції проліферації ендотеліальних клітин-попередників і/або їх диференціювання в ендотеліальні клітини;
- д) виділення та очищення ендотеліальних клітин, що утворилися шляхом диференціювання; і
- е) трансплантація ендотеліальних клітин, що утворилися шляхом диференціювання, в організм із захворюванням, яке пов'язане з дисфункцією ендотеліальних клітин-попередників.

Після трансплантації ендотеліальних клітин, що утворилися шляхом диференціювання, в організм, його можна обробляти далі еритропоєтином, особливо в дозах, що пропонується згідно з винаходом від 200 до 2000 Од. на тиждень.

Згідно з винаходом популяції клітин, які містять ендотеліальні клітини-попередники, культивують *in vitro* в присутності щонайменше однієї іншої біологічно активної речовини, вибраної з групи, яка складається з VEGF, PlGF, GM-CSF, інгібітора HMG-CoA-редуктази і донора NO. У випадку інгібітора HMG-CoA-редуктази, що використовується для культивування, мова йде переважно про статин, такий як симвастатин, мевастатин або аторвастатин.

Подальший переважний варіант здійснення винаходу належить до способу лікування захворювань судин, який включає:

- а) виділення популяцій клітин, які містять ендотеліальні клітини-попередники, з крові за допомогою центрифугування в градієнті щільності;
- б) культивування популяцій клітин, які містять ендотеліальні клітини-попередники, в середовищі для культивування клітин;
- с) культивування популяцій клітин, які містять ендотеліальні клітини-попередники, в присутності еритропоєтину для стимуляції проліферації ендотеліальних клітин-попередників і/або їх диференціювання в ендотеліальні клітини;
- д) виділення та очищення ендотеліальних клітин, що утворилися шляхом диференціювання; і
- е) трансплантацію ендотеліальних клітин в організм із захворюванням судин. Після трансплан-

тації ендотеліальних клітин в організм із захворюванням судин його можна обробляти далі за допомогою еритропоєтину, переважно в дозах, що пропонуються згідно з винаходом, від 200 Од. на тиждень до 2000 Од. на тиждень.

Згідно з винаходом існує можливість культивування популяцій клітин, які містять ендотеліальні клітини-попередники, в присутності щонайменше однієї іншої біологічно активної речовини, вибраної з групи, яка складається з VEGF, PIGF, GM-CSF і/або інгібітора HMG-CoA-редуктази. У випадку інгібітора HMG-CoA-редуктази, що застосовується для культивування, мова йде переважно про статин, такий як симвастатин, мевастатин або аторвастатин.

Згідно із способом лікування захворювань, що пропонується у винаході, судин, отже, передбачається виділення ендотеліальних клітин-попередників з крові людського організму, культивування *in vitro* при застосуванні еритропоєтину і диференціювання в ендотеліальні клітини і, після очищення та виділення ендотеліальних клітин, що утворилися шляхом диференціювання, відповідно, ендотеліальних клітин-попередників, що диференціюються, їх трансплантація цілеспрямовано в пошкоджену кровоносну судину або ішемічну область, щоб там індукувати локальну неоваскуляризацію. Таким чином, можлива більш цілеспрямована і більш швидка терапія пошкоджених кровоносних судин або ішемічної тканини. Спосіб лікування захворювань судин, що пропонується згідно з винаходом, особливо придатний для лікування таких захворювань судин, як ішемія, особливо церебральна ішемія, ішемічні захворювання кінцівок, ішемія міокарда, інфаркт серця, інсульт, коронарна хвороба серця, стенокардія, гостра обтурація артерії, артеріальне облітеруюче захворювання, хвороба Рейно та ерготизм.

Подальші переважні варіанти здійснення винаходу випливають із залежних пунктів формули винаходу.

Винахід пояснюється детальніше за допомогою нижченаведених фігур і прикладів.

На фіг. 1 представлені результати аналізу при використанні клітинного сортера із збудженням флуоресценції (FACS) циркулюючих стовбурових клітин CD34⁺ (cSC): (A-D): проби пацієнтів; (E-F): ізотипічні контролю. Стовбурові клітини CD34⁺ ідентифікують за допомогою додаткової експресії маркера CD34 (B та F), за допомогою характерною від незначної до середньої експресії антигену CD45 (C та G) і за допомогою характерних властивостей у відношенні світлорозсіювання (D та H). Абсолютну кількість cSC розраховують на 100000 моно- та лімфоцитів.

На фіг. 2 представлено кількісне визначення циркулюючих стовбурових клітин за допомогою проточної цитометрії. На фігурі показана дія обробки еритропоєтином, що залежить від часу, при застосуванні людського рекомбінантного еритропоєтину (rhEPO) через 0, 2, 4, 6 та 8 тижнів, $n = 11$, значення відповідають середнім значенням \pm стандартне відхилення. Медіана представлена у вигляді лінії.

*: $p < 0,01$ в порівнянні з 2 тижнями; $\square\square.p < 0,05$ в порівнянні з 4 тижнями; #: $p < 0,05$ в порівнянні з 8 тижнями.

На фіг. 3 представлено кількісне визначення культивованих ендотеліальних клітин-попередників (EPC). На фігурі показано, що обробка за допомогою rhEPO підвищує відносну кількість ендотеліальних клітин-попередників. Ендотеліальні клітини-попередники виділяють перед обробкою ренальних пацієнтів за допомогою rhEPO, а також через 2, 4, 6 та 8 тижнів після обробки пацієнтів за допомогою rhEPO і характеризують за допомогою їх адгезивної здатності і обох маркерів acLDL-Dil та UEA-1 FITC, $n = 11$, значення відповідають середнім значенням \pm стандартне відхилення. Медіана представлена у вигляді лінії.

*: $p < 0,01$ відносно періоду часу перед обробкою; #: $p < 0,001$ відносно періоду часу перед обробкою.

На фіг. 4 представлено кількісне визначення культивованих ендотеліальних клітин-попередників (EPC). На фігурі показано, що абсолютна кількість EPC до використання терапії за допомогою rhEPO значно зменшена в порівнянні зі здоровими індивідуумами, які досліджуються, підібраними за віком та статтю. Пацієнти з ренальною анемією, отже, виявляють чітку дисфункцію EPC в порівнянні з людьми, які використовуються як контроль. Через 8 тижнів після початку терапії за допомогою rhEPO відносно ренальної анемії це зменшене число функціональних EPC компенсується. EPCs виділяють до терапії ренальних пацієнтів за допомогою rhEPO, а також через 2, 4, 6 та 8 тижнів після терапії пацієнтів за допомогою rhEPO і характеризують за допомогою їх адгезивної здатності та обох маркерів acLDL-Dil і UEA-1 FITC, $n = 11$. Представлений приблизно хід процесу протягом 8 тижнів і всі контролю. Абсолютні значення представлені, з одного боку, у вигляді окремих значень. Додатково представлені гістограми (90-тий/75-тий/50-тий/25-тий та 10-тий процентиля, а також середнє значення). Як здоровий контроль служать підібрані за віком та статтю індивідууми, що випробовуються, у яких аналогічним чином виділяють і характеризують EPCs ($n = 11$).

На фіг. 5 представлений вплив еритропоєтину на загоєння рани. На фігурі показано, що при обробці стандартизованої шкірної рани, яку наносять мишам за допомогою тканинного перфоратора, за допомогою еритропоєтину рана повністю закривається вже через від семи до восьми днів, в той час як при обробці рани за допомогою фізіологічного розчину хлориду натрію (сольовий розчин) рана повністю закривається тільки через від тринадцяти до чотирнадцяти днів. Обробку еритропоєтином, відповідно, фізіологічним розчином хлориду натрію починають за 7 днів до нанесення рани. Рекомбінантний людський еритропоєтин вводять однократно щотижня (група $n = 5$) шляхом підшкірної ін'єкції (0,1 мг/кг аранеспу).

На фіг. 6 показано, що еритропоєтин зменшує втрату ниркової функції після гострої ниркової недостатності. Для дослідження використовували щурів Sprague Dawley (масою 200-300 г). Щурів наркотизували за допомогою кетаміну (120 мг/кг) і

ромпуну (10 мг/кг). Одна з піддослідних груп одержувала 0,1 мг/кг маси тіла аранесп один раз на добу до індукції гострої ниркової недостатності. Як порівняння служила група піддослідних тварин, яким, відповідно, вводили шляхом підшкірної ін'єкції в той самий час розчин хлориду натрію. За допомогою закріплення артеріального затиску на правій нирковій артерії переривали кровотік в нирці на 45 хвилин. У цей час з лівого боку здійснювали нефректомію. Псевдооперацію здійснювали у випадку іншої, контрольної групи. При цьому розкривали черевну порожнину, препарували ліву ниркову артерію, але кровопостачання не переривали і віднімали контралатеральну праву нирку. Всіх тварин наркотизували на 60 хвилин і через 24 години після операції умертвляли. Ішемія протягом 45 хвилин з подальшою реперфузією правої нирки, що залишилася, у випадку оброблених хлоридом натрію тварин призводила до дуже великої втрати ниркової функції. Це позначається на вмісті креатиніну в сироватці, який через 24 години після ішемії-реперфузії в 7 разів більше, ніж значення до ішемії-реперфузії ($p < 0,05$). На противагу цьому, у оброблених аналогом еритропоєтину аранеспом тварин виявили тільки чотирикратне збільшення вмісту креатиніну в сироватці через добу після індукції пошкодження за рахунок ішемії-реперфузії. У лівосторонньо нефректомованих тварин з псевдооперованою правою ниркою не сталося ніякого збільшення значень ретенції. На фігурі представлена концентрація креатиніну в сироватці оброблених еритропоєтином (ЕПО) тварин (IR + ЕПО), оброблених за допомогою NaCl тварин (IR) і псевдооперованих тварин (Schein-OP) до пошкодження за рахунок ішемії-реперфузії (IR) і через 24 години після цього. З фігури виходить, що концентрація креатиніну в сироватці у випадку оброблених аранеспом тварин через 24 години після пошкодження за рахунок ішемії-реперфузії становить майже половину відносно контролю без обробки за допомогою ЕПО (обробка за допомогою NaCl).

На фіг. 7 представлені криві виживаності по Каплану-Майєру двох випробуваних груп після індукції хронічної ниркової недостатності, яких обробляли або за допомогою аранеспу, або за допомогою NaCl. Для дослідження використовували щурів Sprague Dawley у віці 8 тижнів. Щурів наркотизували за допомогою кетаміну (120 мг/кг) і ромпуну (10 мг/кг). У день 0 у них віднімали праву нирку, яку негайно після видалення фіксували в формаліні для гістологічного дослідження. У випадку лівої нирки лігували сегментарні артерії, які забезпечують верхній та нижній полюс нирки. Завдяки цьому спричиняють інфаркт відповідних областей нирки і функціонально зберігається тільки середня третина нирки. Щури одержували один раз на тиждень аранесп (0,1 мг/кг маси тіла) або NaCl шляхом підшкірної ін'єкції. Оброблені за допомогою аналога еритропоєтину аранеспу тварини виявляють значну перевагу у відношенні виживаності в порівнянні з обробленими за допомогою хлориду натрію тваринами ($p = 0,027$; Log Rank-тест).

На фіг. 8-15 показані зрізи нирки, що спостерігаються під мікроскопом, через 6 тижнів після інду-

кції хронічної ниркової недостатності у випадку двох випробуваних груп, які обробляли або за допомогою аранеспу, або за допомогою NaCl, і криві виживаності по Каплан-Майєру, що належать до них, подані на фіг. 7.

На фіг. 8 представлені гістологічні зміни у щура Sprague-Dawley з хронічною нирковою недостатністю після, відповідно, однократної щотижневої обробки за допомогою NaCl, що починається безпосередньо після індукції хронічної ниркової недостатності, протягом періоду часу 6 тижнів. Хронічна ниркова недостатність виникає за рахунок видалення правої нирки і лігування сегментарних артерій, які забезпечують верхній і нижній полюс нирки, лівої нирки. На фігурі представлена середньої величини прегломерулярна артерія з характерною типу цибульного лушпиння проліферацією стінки судини при важкому гіпертензивному пошкодженні, так званому злоякісному нефросклерозі з переходом в ендартеріїт.

На фіг. 9 представлені гістологічні зміни у щура Sprague-Dawley з хронічною нирковою недостатністю після, відповідно, однократної щотижневої обробки за допомогою Nad, що починається безпосередньо після індукції хронічної ниркової недостатності, протягом періоду часу 6 тижнів. Хронічна ниркова недостатність виникає за рахунок видалення правої нирки і лігування сегментарних артерій, які забезпечують верхній і нижній полюс нирки, лівої нирки. На фігурі представлений флоридний фокально-сегментарний гломерулосклероз як так званий проліферативний FSGS (клубочок праворуч). Інший клубочок (зліва) показує ішемічний колапс лігатурної конволюти. У нижній частині представленої картини можна бачити маленьку судину з важкими пошкодженнями ендотелію. Гістологічні зміни, що спостерігаються, відповідають гіпертензивним пошкодженням органа, відповідно, змінам в рамках переважувальної нефропатії після 5/6 нефректомії.

На фіг. 10 представлені гістологічні зміни у щура Sprague-Dawley з хронічною нирковою недостатністю після, відповідно, однократної щотижневої обробки за допомогою NaCl, що починається безпосередньо після індукції хронічної ниркової недостатності, протягом періоду часу 6 тижнів. Хронічна ниркова недостатність виникає за рахунок видалення правої нирки і лігування сегментарних артерій, які забезпечують верхній і нижній полюс нирки, лівої нирки. На фігурі представлений майже повний склероз, відповідно, деструкція компенсуюче збільшеного клубочка з вираженим гіалінозом, відповідно, фібриноїдним некрозом аферентної артеріоли, що належить до цього.

На фіг. 11 представлені гістологічні зміни у щура Sprague-Dawley з хронічною нирковою недостатністю після, відповідно, однократної щотижневої обробки за допомогою NaCl, що починається безпосередньо після індукції хронічної ниркової недостатності, протягом періоду часу 6 тижнів. Хронічна ниркова недостатність виникає за рахунок видалення правої нирки і лігування сегментарних артерій, які забезпечують верхній і нижній полюс нирки, лівої нирки. На фігурі показана маленька прегломерулярна артерія з характер-

ною, у вигляді цибульного лушпиння, проліферацією стінки судини і некрозом стінки при важкому гіпертензивному пошкодженні, так званим злоякісним нефросклерозом (порівнянне зображення праворуч). Зліва можна бачити справжню, (ще) непошкоджену артеріолу.

На фіг. 12 представлені гістологічні зміни у щура Sprague-Dawley з хронічною нирковою недостатністю після, відповідно, однократної щотижневої обробки за допомогою аранеспу (еритропоєтину) (0,1 мкг/кг аранеспу), що починається безпосередньо після індукції хронічної ниркової недостатності, протягом періоду часу 6 тижнів. Хронічна ниркова недостатність виникає за рахунок видалення правої нирки і лігування сегментарних артерій, які забезпечують верхній і нижній полюс нирки, лівої нирки. На фігурі представлений даний клубочок з тонкою аферентною судиною. У тубулоінтерстиції не можна констатувати ніякої патології.

На фіг. 13 представлені гістологічні зміни у щура Sprague-Dawley з хронічною нирковою недостатністю після, відповідно, однократної щотижневої обробки за допомогою аранеспу (еритропоєтину) (0,1 мкг/кг аранеспу), що починається безпосередньо після індукції хронічної ниркової недостатності, протягом періоду часу 6 тижнів. Хронічна ниркова недостатність виникає за рахунок видалення правої нирки і лігування сегментарних артерій, які забезпечують верхній і нижній полюс нирки, лівої нирки. На фігурі представлений даний клубочок з тонкою аферентною судиною (630-кратне збільшення). У тубулоінтерстиції не можна констатувати ніякої патології.

На фіг. 14 представлені гістологічні зміни у щура Sprague-Dawley з хронічною нирковою недостатністю після, відповідно, однократної щотижневої обробки за допомогою аранеспу (еритропоєтину) (0,1 мкг/кг аранеспу), що починається безпосередньо після індукції хронічної ниркової недостатності, протягом періоду часу 6 тижнів. Хронічна ниркова недостатність виникає за рахунок видалення правої нирки і лігування сегментарних артерій, які забезпечують верхній і нижній полюс нирки, лівої нирки. На фігурі представлений даний клубочок з тонкою аферентною судиною. У тубулоінтерстиції не можна констатувати ніякої патології.

На фіг. 15 представлені гістологічні зміни у щура Sprague-Dawley з хронічною нирковою недостатністю після, відповідно, однократної щотижневої обробки за допомогою аранеспу (еритропоєтину) (0,1 мкг/кг аранеспу), що починається безпосередньо після індукції хронічної ниркової недостатності, протягом періоду часу 6 тижнів. Хронічна ниркова недостатність виникає за рахунок видалення правої нирки і лігування сегментарних артерій, які забезпечують верхній і нижній полюс нирки, лівої нирки. На фігурі представлений даний клубочок з тонкою аферентною судиною (630-кратне збільшення). У тубулоінтерстиції не можна констатувати ніякої патології.

Приклад 1

Дія еритропоєтину у випадку пацієнтів з ренальною анемією.

Досліджували дію еритропоєтину у випадку пацієнтів з ренальною анемією ($Hb < 10,5$ г/дл) як наслідок хвороби нирок в кінцевій стадії (претермінальна ниркова недостатність; кліренс креатиніну < 35 мл/хв.). 11 пацієнтів протягом періоду часу щонайменше 8 тижнів обробляли еритропоєтином в щотижневих дозах в середньому 5000 Од. rhEPO (рекомбінантний людський еритропоєтин) внутрішньовенно, відповідно, підшкірно. Після обробки еритропоєтином досліджували протягом 20 тижнів ендотеліальні клітини-попередники в крові пацієнтів, причому через 0, 2, 4, 6 та 8 тижнів ендотеліальні клітини-попередники аналізували відносно їх кількості, а також їх диференціувального статусу, за допомогою проточної цитометрії і тесту на культивування.

У випадку циркулюючих периферичних стовбурових клітин крові (CPBSC) мова йде про маленьку популяцію клітин, які експресують як антиген CD34, так і антиген CD45. На основі рекомендацій ISHAGE розроблений тест для визначення кількості CPBSC за допомогою проточної цитометрії (Sutherland і ін., J. Hematother., 5, 213-226 (1996)). При використанні цього тесту визначали як цей зразок експресії клітин CD34 та CD45, так і морфологію стовбурових клітин. Таким чином визначали як абсолютну кількість CPBSC на мкл, так і відсоткову частку CPBSC в загальній кількості лейкоцитів.

На фіг. 1 представлені результати аналізу при використанні клітинного сортера із збудженням флуоресценції (FACS-аналіз) циркулюючих стовбурових клітин CD34⁺ на основі рекомендацій ISHAGE.

На фіг. 2 показана кількість визначених за допомогою FACS-аналізу стовбурових клітин CD34⁺ протягом періоду часу 8 тижнів.

Тест у відношенні клітинної культури.

Мононуклеарні периферичні клітини крові (PBMC) виділяли шляхом центрифугування в градієнті щільності в фіколі з людських проб крові за способом, описаним Asahara, Science, 275, 964-967 (1997). Клітини вміщували на культуральні планшети з фібронектином і зберігали в базальному середовищі EC. Базальне середовище EC складається з квот базального середовища EBM-2 (фірма Clonetics) і EGM-2 (hEGF; GA-1000 (гентаміцин, амфотерицин-В) FBS, VEGF, hFGF-В (w/гепарин), R³-IGF-1, аскорбінова кислота, гепарин). Після культивування протягом 4 днів неадгезивні клітини видаляли шляхом промивання планшетів. Адгезивні клітини, що залишаються, обробляли трипсином і знову висівали. Потім їх культивували протягом наступних трьох днів. Клітини з ендотеліальним фенотипом в день 7 після виділення ідентифікували шляхом позитивного забарвлення відносно двох різних ендотеліальних маркерів. При цьому мова йде про маркований Dil ацетильований ліпопротеїн низької щільності (acLDL-Dil) і аглютинін-1 Ulex europaeus (UEA-1). Результати цього дослідження представлені на фіг. 3.

Результати показують, що еритропоєтин може мобілізувати ендотеліальні клітини-попередники і підвищувати кількість циркулюючих ендотеліаль-

них клітин-попередників. При цьому може компенсуватися функціональний дефіцит, який виникає при певних патологічних станах, таких як ренальна анемія. Ці результати подані на фіг. 4.

За допомогою проточної цитометрії визначено, що у пацієнтів з нирковою недостатністю в кінцевій стадії кількість циркулюючих стовбурових клітин CD34⁺ відповідає кількості циркулюючих стовбурових клітин CD34⁺ в крові здорових індивідумів, що випробовуються. Після початку обробки еритропоетином значно підвищується кількість стовбурових клітин CD34⁺ в системі кровообігу на більш, ніж 50%. При використанні тесту відносно клітинної культури визначено, що після обробки еритропоетином різко збільшується кількість клітин, які належать до ендотеліального фенотипу. У випадку функціонального тесту відносно клітинної культури дуже погіршена здатність ендотеліальних клітин-попередників збільшується більше ніж в три рази.

Приклад 2

Поліпшене загоєння рани за рахунок систематичного використання рекомбінантного людського еритропоєтину (rhEPO).

Мишей FVB/N наркотизували шляхом інгаляційної анестезії за допомогою ізофлорану. Волосяний покрив обох задніх ніг видаляли за допомогою лосьйону для депіляції і дезінфікували за допомогою 70%-ного спирту. За допомогою стерильного чотириміліметрового одноразового перфоратора для біопсійної тканини в кожному випадку наносили шкіряну рану на правий бік мишей. Протилежна сторона служила як внутрішній контроль. Однократно здійснювали післяопераційний антибіотичний захист за допомогою пеніциліну G (20000 одиниць/кг). Протягом всього періоду дослідження здійснювали один раз на тиждень підшкірні ін'єкції аналога рекомбінантного людського еритропоєтину аранеспу (0,1 мкг/кг маси тіла). Обробку починали за сім днів до взяття перфоратором тканини. Результати подані на фіг. 5. Вони показують, що введення еритропоєтину значно прискорює процес загоєння рани.

Приклад 3

Зменшення прогресування хронічної ниркової недостатності за рахунок терапії еритропоетином.

Щурів Sprague-Dawley у віці восьми тижнів наркотизували за допомогою кетаміну (120 мг/кг) і ромпуну (10 мг/кг). У день 0 у щурів віднімали праву нирку, яку негайно після видалення фіксували в формаліні для гістологічного дослідження. У випадку лівої нирки лігували сегментарні артерії, які забезпечують верхній і нижній полюс нирки. Завдяки цьому викликають інфаркт відповідних об'ластей нирки, причому функціонально зберігається тільки середня третина нирки. Щури

одержували один раз щотижня аналог еритропоєтину аранесп в дозі 0,1 мкг/кг маси тіла або для контролю NaCl, підшкірно (s.c.).

На фіг. 7 представлена крива виживаності по Каплану-Майєру обох випробуваних груп. Оброблені за допомогою аранеспу тварини мають чітко підвищену виживаність в порівнянні з обробленими за допомогою хлориду натрію контрольними тваринами.

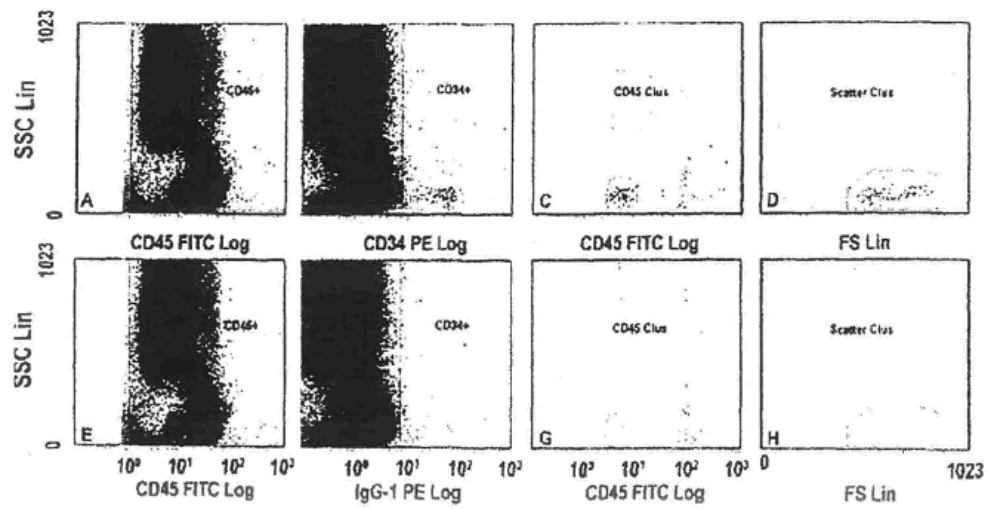
На фіг. 12-15 показано, що після обробки еритропоетином ниркова тканина не показує ніяких патологічних змін, в той час як після обробки за допомогою NaCl видно важкі патологічні зміни (фіг. 8-11, що порівнюються). Подальші гістологічні дослідження показали, що у випадку оброблених аранеспом тварин можна спостерігати чітко більш високу щільність судин (CD31), ніж у оброблених за допомогою хлориду натрію тварин (дані не представлені).

Приклад 4

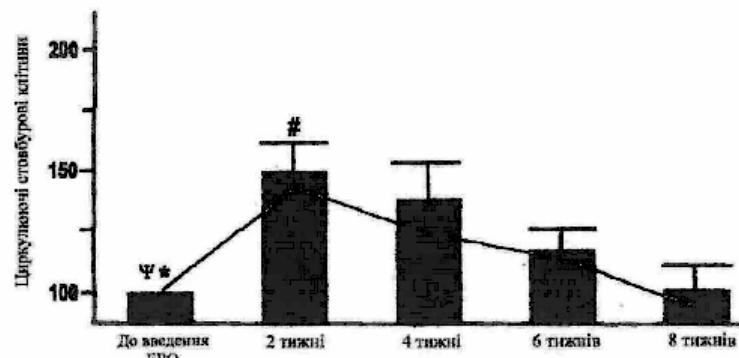
Зменшення прогресування гострої ниркової недостатності.

Для цього дослідження використали щурів Sprague-Dawley з масою тіла 250-300 г. Перед індукцією гострої ниркової недостатності піддослідні тварини одержували один раз на добу аранесп в дозі 0,1 мкг/кг маси тіла. Щурів наркотизували за допомогою кетаміну (120 мг/кг маси тіла) і ромпуну (10 мг/кг). Як порівняння служила група піддослідних тварин, яким, відповідно, в той самий час вводили шляхом підшкірної ін'єкції розчин хлориду натрію. Кровотік в нирці переривали на 45 хвилин тим, що вміщували артеріальний затиск на праву ниркову артерію. У цей час з лівого боку здійснювали нефректомію. Псевдооперацію проводили у випадку іншої, контрольної групи. При цьому розкривали черевну порожнину, препарували ліву ниркову артерію, але кровопостачання не переривали, і віднімали контралатеральну праву нирку. Всіх тварин наркотизували на період часу 60 хвилин і через 24 години після операції умертвляли.

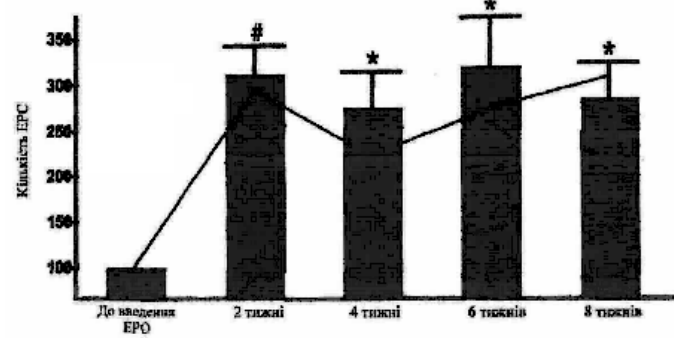
Ішемія протягом 45 хвилин з подальшою реперфузією правої нирки, що залишилася у випадку оброблених хлоридом натрію тварин призводила до дуже великої втрати ниркової функції. Це знайшло своє відображення в підвищенні в 7 разів кількості креатиніну в сироватці ($p < 0,05$). У протилежність цьому, у оброблених аналогом еритропоєтину аранеспом тварин виявили тільки чотирикратне збільшення вмісту креатиніну в сироватці через добу після індукції пошкодження за рахунок ішемії-реперфузії. У лівосторонньо нефректомованих тварин з псевдооперованою правою ниркою не сталося ніякого збільшення значень ретенції. Результати представлені на фіг. 6.



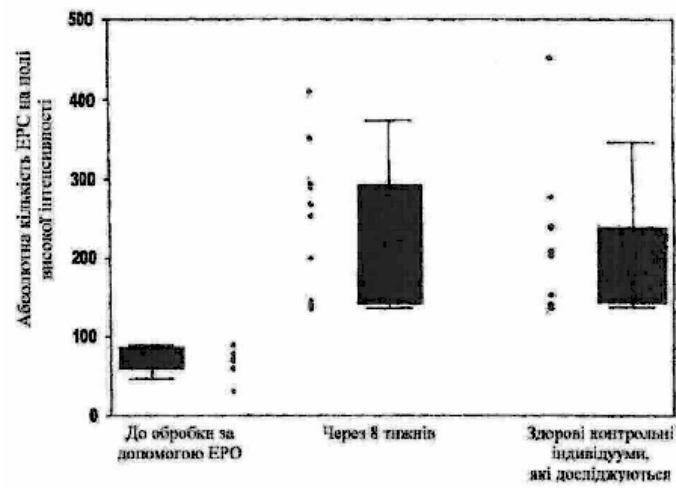
Фиг. 1



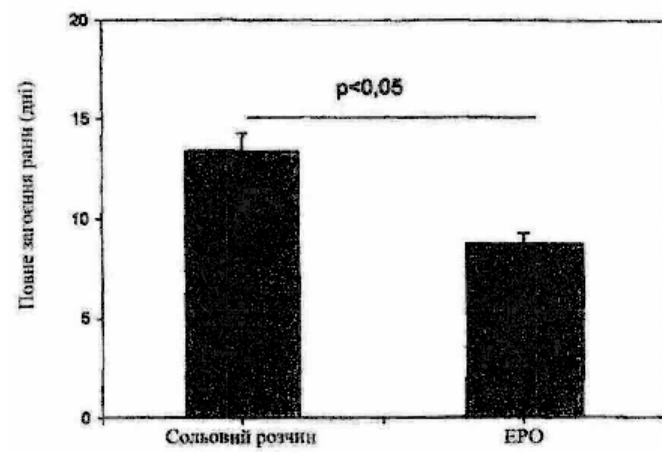
Фиг. 2



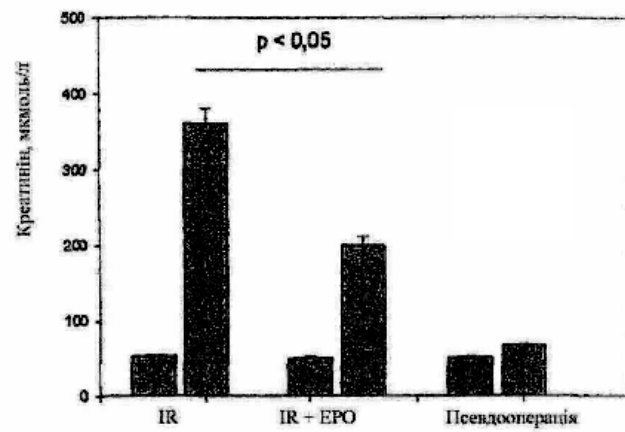
Фиг. 3



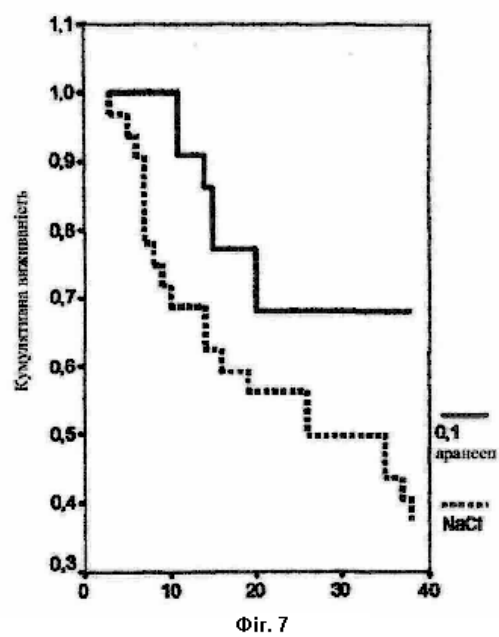
Фіг. 4



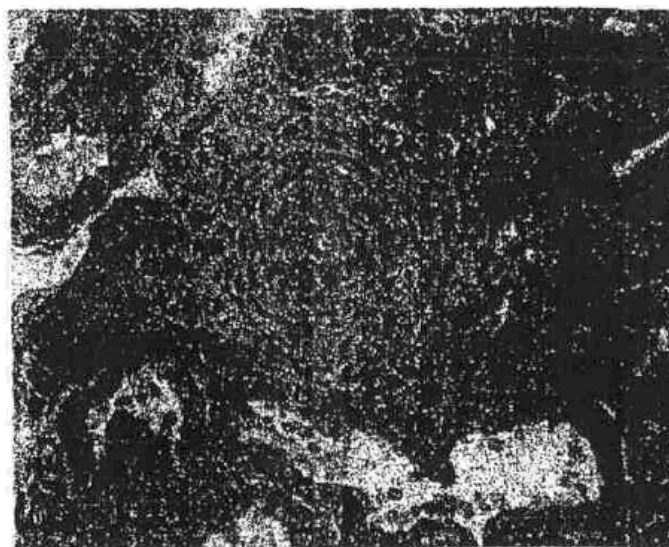
Фіг. 5



Фіг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

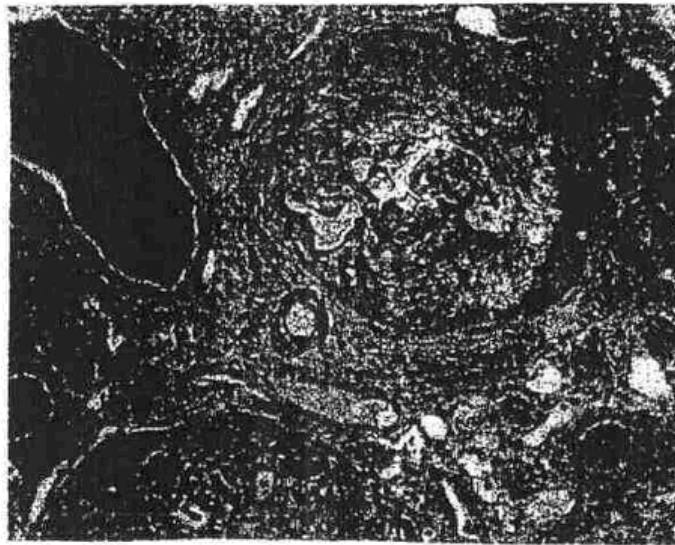


Fig. 10



Fig. 11

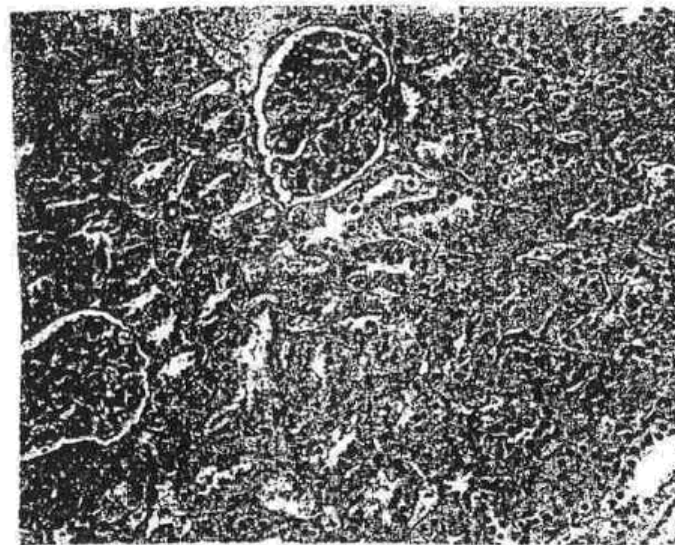


Fig. 12

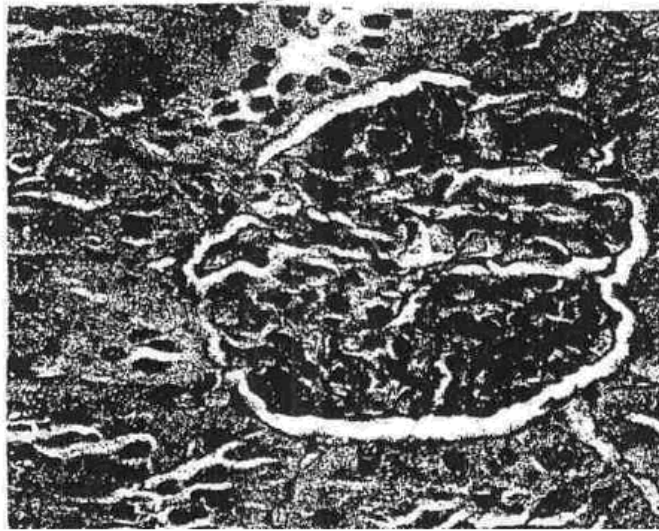


Fig. 13

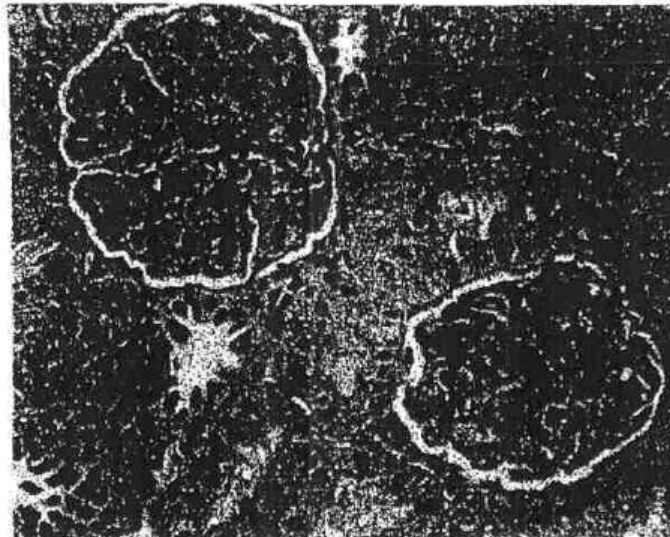


Fig. 14

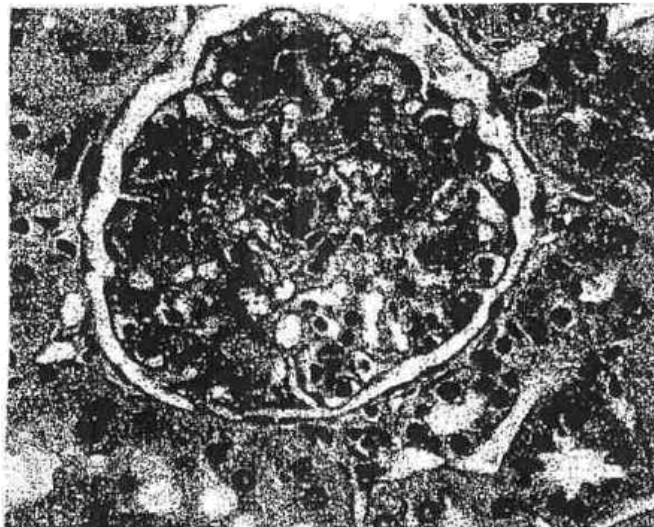


Fig. 15

