

## ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗ ΣΤΑ ΝΕΟΤΕΡΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ

### Βασιλική Κυριαζή

Αιματολόγος, Μ.Δ.Ε., E-mail: [kyriazivasiliki@yahoo.com](mailto:kyriazivasiliki@yahoo.com)

Τηλέφωνο: 210-2584869

### Περίληψη

Η κλινική χρήση παραγόντων που διεγείρουν την ερυθροποίηση (Erythropoiesis Stimulating Agents, ESAs) άλλαξε ριζικά τον τρόπο αντιμετώπισης της αναιμίας. Η ερυθροποιητίνη (EPO) αλληλεπιδρά άμεσα με τον υποδοχέα της (Erythropoietin Receptor, EPOR) στην επιφάνεια των πρόδρομων κυττάρων της ερυθράς σειράς, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό, την τελική διαφοροποίηση και την προστασία από την απόπτωση. Η αύξηση της ερυθροκυτταρικής μάζας κατά τη χορήγηση ανασυνδυασμένης ανθρώπινης EPO (recombinant human EPO, rhEPO), ελέγχεται κυρίως από το χρόνο διατήρησης στο ορό των επιπέδων της EPO και όχι από τα επίπεδα της EPO κάθε αυτά. Η υποδόρια (sc) σε σχέση με την ενδοφλέβια (iv) χορήγηση των προϊόντων αυτών χαρακτηρίζεται από βραδύτερη απορρόφηση, μικρότερη μέγιστη τιμή στο πλάσμα και σημαντική παράταση στο χρόνο ημιζωής ( $t_{1/2}$ ). Η κάθαρση της EPO φαίνεται να εμπλέκει διάφορους μηχανισμούς μεταξύ των οποίων την αλληλεπίδραση με τον EPOR. Η epoetin α ήταν το πρώτο παράγωγο που χρησιμοποιήθηκε στην κλινική πράξη, με σχετικά βραχύ  $t_{1/2}$ , που απαιτούσε χορήγηση δύο ή τρεις φορές εβδομαδιαίως. Η Darbepoetin α ήταν ένα δεύτερης γενεάς παράγωγο με μεγαλύτερο  $t_{1/2}$ , που επέτρεπε τη χορήγηση μία φορά εβδομαδιαίως ή κάθε δύο εβδομάδες. Περισσότερο πρόσφατα είναι τα πεγκυλωμένα παράγωγα, γνωστά ως συνεχείς ενεργοποιητές του EPOR (Continuous Erythropoietin Receptor Activator, CERA) με σημαντικά περαταταμένο  $t_{1/2}$ . Οι προσπάθειες παρασκευής άλλων παραγόντων που διεγείρουν την ερυθροποίηση συνεχίζονται και κάποιοι έχουν εγκριθεί και χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη. Το Hematide είναι ένα συνθετικό πεπτιδίο, αγωνιστής για τον EPOR. Άλλοι παράγοντες είναι οι σταθεροποιητές του παράγοντα που επάγεται από την υποξία (Hypoxia-Inducible Factor, HIF), οι αναστολείς του παράγοντα GATA και οι αναστολείς της φωσφατάσης των αιμοποιητικών κυττάρων. Σκευάσματα κατάλληλα για χορήγηση από το στόματος δεν είναι ακόμη διαθέσιμα, ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι προσπάθειες γονιδιακής θεραπείας της αναιμίας.

*Λέξεις-Κλειδιά:* Ερυθροποίηση, Ερυθροποιητίνη, Αναιμία, Νεφρική ανεπάρκεια, Αναιμία χρόνιας νόσου

### Εισαγωγή

Η θεραπευτική χρήση της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ερυθροποιητίνης (recombinant human EPO, rhEPO) στα τέλη της δεκαετίας του '80, μετέβαλλε τον τρόπο διόρθωσης της αναιμίας σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο και σύνδρομο ανεπάρκειας του μυελού των οστών. Η θεραπεία με ερυθροποιητίνη (EPO) ήταν αποτελεσματική και ασφαλής, οι παρενέργειες ήταν ασυνήθεις και εύκολα αντιμετωπίσιμες, περιορίζοντας σημαντικά τον αριθμό των μεταγγίσεων και τα ανεπιθύμητα συμβάματα εξ αυτών.

Οι πρώτες rhEPO (epoetin α και epoetin β) είχαν χρόνο ημίσειας ζωής ( $t_{1/2}$ ) στο πλάσμα περίπου 6-8 ώρες. Ο βραχύς  $t_{1/2}$  υπαγόρευε την ανάγκη χορήγησης δύο ή τρεις φορές εβδομαδιαίως, γεγονός που καθιστούσε χρήσιμη την παρασκευή παραγόντων με μεγαλύτερο  $t_{1/2}$  για μεγαλύτερα μεσοδιαστήματα χορήγησης. Στην κλινική πράξη οι παράγοντες που διεγείρουν την ερυθροποίηση (Erythropoiesis Stimulating Agents, ESAs) έχουν τον ίδιο μηχανισμό δράσης ως προς τη σύνδεση και την ενεργοποίηση του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης (Erythropoietin Receptor, EPOR), αλλά διαφέρουν στη μοριακή δομή, στη συγγένεια πρόσδεσης στον υποδοχέα, στο χρόνο  $t_{1/2}$ , στην κάθαρση, στη βιοδιαθεσιμότητα και στην in vivo ισχύ<sup>1</sup>.

Οι ερευνητές προσπάθησαν με διάφορους τρόπους να βελτιώσουν τα αρχικά προϊόντα. Η αύξηση της δόσης των ταχέως καθαιρόμενων μορίων ήταν ένας τρόπος, αλλά αυτό δεν ήταν αποτελεσματικό, λόγω των υψηλών δόσεων που απαιτούνταν. Οι πρώτες προσπάθειες βελτίωσης των rhEPO αφορούσαν στην ενίσχυση της σταθερότητας και στην αύξηση της συγγένειας για τον EPOR. Οι επιλογές αύξησης του  $t_{1/2}$  περιλάμβαναν την προσθήκη πολυαιθυλενο-γλυκόλης (PolyEthylene-Glycol, PEG), την υπεργλυκοζυλίωση, το διμερισμό και το σχηματισμό υβριδίων του πεπτιδικού τμήματος των ESAs με άλλα μόρια, όπως αντισώματα και αλβουμίνη<sup>2,3</sup>.

Περιορισμοί των πρωτεϊνικών παραγόντων, όπως η ανοσογονικότητα, η σταθερότητα, οι συνθήκες συντήρησης και η παρεντερική χορήγηση, συντήρησαν τις ερευνητικές προσπάθειες παρασκευής και χρήσης εξελιγμένων ερυθροποιητικών παραγόντων<sup>4</sup>.

## Η ερυθροποίηση

Η ερυθροποίηση αποτελεί μέρος μίας γενικότερης διαδικασίας, της αιμοποίησης, η οποία ξεκινά στο λεκιθικό ασκό και μεταναστεύει στον μυελό των οστών τη  $10^{11}$ - $12^{11}$  εμβρυική εβδομάδα<sup>5</sup>. Τα αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο (Hemopoietic Stem Cell, HSC) είναι πολυδύναμο με δυνατότητα διαφοροποίησης προς όλες τις αιμοποιητικές σειρές. Από το κοινό προγονικό κύτταρο MEP (Megakaryocyte-Erythroid Progenitor), προέρχονται οι “δεσμευμένες” για την ερυθρά σειρά αποικίες κυττάρων BFU<sub>E</sub> (Burst Forming Units-Erythroid) και CFU<sub>E</sub> (Colony Forming Units-Erythroid)<sup>6</sup>. Στο στάδιο CFU<sub>E</sub> η EPO είναι απαραίτητη για την επιβίωση των κυττάρων, ενώ παρατηρείται αντίστοιχη αύξηση στην έκφραση του EPOR<sup>7</sup>. Το πρώτο αναγνωρίσιμο κύτταρο της ερυθράς σειράς στο μυελό των οστών είναι η προερυθροβλάστη. Μεταξύ της προερυθροβλάστης και της μη διαιρούμενης ερυθροβλάστης μεσολαβούν τέσσερις κυτταρικοί κύκλοι και προκύπτουν το περισσότερο 16 ώριμα ερυθροκύτταρα, αφού κάποια χάνονται με την απόπτωση και τη μη αποτελεσματική ερυθροποίηση. Τα δικτυοερυθροκύτταρα (ΔΕΚ) και τα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια δεν εκφράζουν τον EPOR και συνεπώς δεν ανταποκρίνονται στην EPO<sup>8</sup>.

Συνολικά, η διαδικασία διαφοροποίησης των ερυθροβλαστών χαρακτηρίζεται από την προϊούσα ελάττωση του μεγέθους των κυττάρων, την αύξηση στη συμπύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης και την αύξηση της αιμοσφαιρίνης. Κατά την ωρίμανση αυξάνει η έκφραση γονιδίων που χαρακτηρίζουν την ερυθρά σειρά, όπως αντιγόνα ομάδων αίματος, πρωτεΐνες της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού (σπεκτρίνη, αγκυρίνη, ακτίνη) και ένζυμα της γλυκολυτικής οδού.

Τα κύτταρα της ερυθράς σειράς αποτελούν το 20% των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών με φυσιολογικό χρόνο επιβίωσης 120 ημέρες. Η παραγωγή και η σταθερότητα του αριθμού τους υπόκειται στη ρυθμιστική λειτουργία του μηχανισμού απάντησης στην υποξία μέσω του παράγοντα που επάγεται από την υποξία (Hypoxia-Inducible Factor, HIF) και της οδού αλληλεπίδρασης της EPO με τον EPOR.

## Μηχανισμός απάντησης στην υποξία

Ο HIF-1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που μεσολαβεί μεταξύ της κατάστασης οξυγόνωσης και της απάντησης του κυττάρου σε αυτή. Πρόκειται για ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από μία  $\alpha$ -υπομονάδα με σύντομο  $t_{1/2}$  παρουσία  $O_2$  και μία  $\beta$ -υπομονάδα που εκφράζεται συνεχώς ανεξάρτητα από τα επίπεδα  $O_2$ <sup>9</sup>. Ο “αισθητήρας  $O_2$ ” (“oxygen sensor”) είναι πιθανώς μία πολυδροξυλάση, η οποία παρουσία  $O_2$  (21%  $O_2$ ) υδροξυλιώνει τις  $\alpha$ -υπομονάδες του παράγοντα HIF-1. Οι υδροξυλιωμένες HIF-1 $\alpha$  υπομονάδες δέχονται μόρια ουβικιτίνης από την πρωτεΐνη von Hippel-Lindau (vHL), με συνέπεια την πρωτεασωματική αποδόμησή τους.

Σε κατάσταση υποξίας οι  $\alpha$ -υπομονάδες παραμένουν ακέραιες και συσσωρεύονται, δημιουργώντας ετεροδιμερή με τις υπομονάδες HIF-1 $\beta$ . Τα ετεροδιμερή ενεργοποιούν μια σειρά γονιδίων που απαντούν στην υποξία (hypoxia response genes), όπως γονίδια που κωδικοποιούν την EPO και τον EPOR, ένζυμα της γλυκολυτικής οδού, τον υποδοχέα της τρανσφερίνης και τον αγγειογενετικό παράγοντα VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)<sup>10</sup>.

## Η οδός EPO - EPOR

Η κύρια θέση παραγωγής της EPO είναι ο νεφρός, ενώ ένα ποσοστό, περίπου 10%, παράγεται στο ήπαρ. Τα επίπεδά της στον οργανισμό ρυθμίζονται από την τάση του  $O_2$  στο νεφρό. Η EPO δεν υφίσταται σε αποθηκευτική μορφή και έχει  $t_{1/2}$  στο πλάσμα 6-9 ώρες. Οι μηχανισμοί ρύθμισης των επιπέδων της ανταποκρίνονται ταχέως στις μεταβολές της οξυγόνωσης. Ο EPOR ανήκει στην υπερικογένεια των υποδοχέων κυτταροκινών και τα επίπεδα του, όπως της EPO, αυξάνουν σε κατάσταση υποξίας.

Κατά την πρόσδεση της EPO στον EPOR προκαλείται διμερισμός των επιφανειακών τμημάτων του υποδοχέα πυροδοτώντας την αυτοφωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της κινάσης JAK-2, τη φωσφορυλίωση τυροσινικών υπολειμμάτων του EPOR, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων STAT, Ras, PI-3 κινάση και των τυροσινικών φωσφατασών SHP1 και SHP2<sup>11</sup>. Συγχρόνως εκφράζονται αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως BCL-2, BCL-XL, AKT και διεγείρεται ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των πρόδρομων κυττάρων της ερυθράς σειράς σε ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια<sup>12</sup>.

## Η ενδογενής EPO και η ερυθροκυτταρική μάζα

Η ενδογενής παραγόμενη EPO περιέχει 165 αμινοξέα και διαθέτει υψηλό βαθμό γλυκοζυλίωσης, αφού το 40% της μάζας του μορίου το συνιστούν οι υδατάνθρακες<sup>13</sup>. Συγκέντρωση EPO στον ορό 10-25mU/mL, αρκεί για να διατηρήσει τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης σε φυσιολογικά όρια (12-17g/dL)<sup>14</sup>. Ο  $t_{1/2}$  της

EPO είναι περίπου 5 ώρες, πράγμα που απαιτεί ένα μέσο ρυθμό παραγωγής της EPO περίπου 2 U/kg/d. Η παραγωγή EPO ανά κύτταρο παραμένει σταθερή, ενώ η αύξηση στη σύνθεση της EPO επιτυγχάνεται με μεταβολή στον αριθμό των κυττάρων που παράγουν το μόριο<sup>15</sup>. Στη σοβαρή αναιμία τα επίπεδα της EPO αυξάνουν κατά 1000 φορές, λόγω της λογαριθμικής αύξησης των παραγωγών κυττάρων<sup>15, 16</sup>. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα της EPO είναι η επάρκεια σε σίδηρο, χρόνια νοσήματα, περιβαλλοντικές καταστάσεις και γενετικοί παράγοντες<sup>1</sup>.

Υπάρχει άμεση σχέση ανάμεσα στην παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων και στη συγκέντρωση της EPO<sup>17</sup>. Μεταβολή στα επίπεδα της EPO κατά 1000 φορές οδηγεί σε μεταβολή της ερυθροποίησης κατά τέσσερις φορές. Το μέγεθος της αύξησης της ερυθροκυτταρικής μάζας πρωτίστως ελέγχεται από το χρονικό διάστημα διατήρησης της EPO στην κυκλοφορία. Η αύξηση στη σύνθεση της EPO έχει ένα παρατεινόμενο αποτέλεσμα, λόγω της δυσαναλογίας μεταξύ του χρόνου  $t_{1/2}$  της EPO και της διάρκειας ζωής των ερυθροκυττάρων. Δηλαδή, 30 min υποζίας διεγείρουν την παραγωγή EPO με  $t_{1/2}$  περίπου 5 ώρες. Η EPO με τη σειρά της διεγείρει την παραγωγή των ΔΕΚ ( $t_{1/2}$ =1-5 ημέρες), τα οποία ωριμάζουν σε ερυθροκύτταρα με διάρκεια ζωής 100-120 ημέρες<sup>20</sup>. Συνεπώς, μια βραχείας διάρκειας έκθεση στην EPO προκαλεί μία μακράς διάρκειας αύξηση στην ερυθροκυτταρική μάζα<sup>1</sup>.

Για την επίτευξη επαρκούς ερυθροποιητικής δραστηριότητας απαιτείται ένα ποσοστό δέσμευσης των EPOR με την EPO. Μεγαλύτερο ποσοστό δεσμευμένων υποδοχέων δεν αυξάνει το ρυθμό κυτταρικής διαίρεσης, αλλά αυξάνει τη “στρατολόγηση” και διαφοροποίηση προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς<sup>1</sup>. Ο ρυθμός ερυθροποίησης απόκτα μέγιστη τιμή, όταν όλα τα πρόδρομα κύτταρα διαιρούνται. Αυτό έγινε εμφανές από κλινική μελέτη φάσης I με την epoetin α, όπου ο ρυθμός αύξησης του αιματοκρίτη ήταν δόσοεξαρτώμενος, με επιπέδωση της καμπύλης (plateau) στη δόση των 200-500U/kg EPO. Δηλαδή, υψηλότερες δόσεις δεν προκάλεσαν περαιτέρω αύξηση του ρυθμού, αλλά αύξησαν τη συνολική ανταπόκριση, λόγω της παράτασης του χρόνου έκθεσης στην EPO<sup>18</sup>.

Αν η δέσμευση των EPOR είναι ανεπαρκής, τότε τα πρόδρομα κύτταρα αποπίπτουν σε 2-8 ώρες μετά την απομάκρυνση της EPO από την κυτταρική καλλιέργεια<sup>19</sup>. Ο σχηματισμός ερυθροβλαστών από τα CFU<sub>E</sub> απαιτεί περισσότερο από μία εβδομάδα. Συνεπώς, είναι απαραίτητο να υπάρχουν επαρκή επίπεδα EPO σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας για τη διασφάλιση της επιβίωσης, του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των ερυθροκυττάρων. Η EPO δεν είναι απαραίτητη για την επιβίωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων μόνο στα τελικά στάδια της ερυθροποίησης<sup>20</sup>. Τα παράγωγα ή ανάλογα της EPO με μειωμένη συγγένεια για τον EPOR πρέπει να βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις για να εξασφαλιστεί ένας αποτελεσματικός αριθμός δεσμευμένων υποδοχέων<sup>1</sup>.

## Οι rhEPO

Το γονίδιο της ανθρώπινης EPO κλωνοποιήθηκε το 1983, επιτρέποντας την κλινική ανάπτυξη των rhEPO, μία βιοτεχνολογική εξέλιξη που άλλαξε ριζικά τα δεδομένα στη θεραπεία της αναιμίας. Η κλωνοποίηση του γονιδίου ήταν δύσκολη, αφού τα χαμηλά επίπεδα EPO στην κυκλοφορία καθιστούσαν την απομόνωση του μορίου δυσχερή. Η πηγή παραγωγής EPO ήταν δύσκολο να εντοπιστεί και συνεπώς και η ανάλυση του αντίστοιχου mRNA. Όταν η EPO απομονώθηκε σε ούρα πασχόντων με απλαστική αναιμία (10mg από 1000L ούρα), σχεδιάστηκαν ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές του DNA του μορίου και το γονίδιο κλωνοποιήθηκε<sup>21</sup>.

Η epoetin α (Erogen, AMGEN) αποτέλεσε την πρώτη rhEPO στο εμπόριο στις ΗΠΑ και ακολούθησαν μία δεύτερη epoetin α (Eprex, Ortho Biotech Products) και η epoetin β (NeoRecormon, La Roche Ltd) στην Ευρώπη. Οι ερυθροποιητίνες α και β προήλθαν από κυτταρικές σειρές ωοθηκών κινέζικων κρικητών (Chinese hamster ovary cells, CHO), είχαν ελάχιστες δομικές διαφορές και τις ίδιες φυσιολογικές ιδιότητες<sup>22</sup>. Η epoetin ω διέφερε από τις προηγούμενες στο profile γλυκοζυλίωσης και παράγεται από κύτταρα νεφρού μικρών ποντικών (Baby Hamster Kidney Cells, BHK). Πιο πρόσφατες είναι η epoetin δ (Dynero), παραγόμενη από σειρές ανθρώπινου ινοσαρκώματος (σειρά HT-1080) και η epoetin z (Retacrit), η οποία παράγεται με τεχνική ανασυνδυασμένου DNA από κύτταρα CHO και είναι πανομοιότυπη στην αλληλουχία αμινοξέων και στη σύνθεση των υδατανθράκων με την ενδογενή EPO<sup>23</sup>.

## Φαρμακολογικές ιδιότητες των rhEPO

Οι rhEPO ασκούν τη δράση τους μέσω πρόσδεσης στον EPOR, επάγοντας τον καταρράκτη των αντιδράσεων φωσφορυλίωσης, που οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης JAK-2/STAT-5. Η μεταφορά του ενδοκυτταρίου σήματος στον πυρήνα του κυττάρου προκαλεί την έκφραση γονιδίων, απαραίτητων για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση της ερυθράς σειράς.

Σε υγιείς εθελοντές, ο  $t_{1/2}$  της rhEPO κατά την ενδοφλέβια (iv) χορήγηση ήταν 5-10 ώρες, παρόμοιος με αυτόν της ενδογενούς EPO (μέσος  $t_{1/2}$ =5.2 ώρες). Η κατανομή του όγκου ήταν ανάλογη του όγκου

πλάσματος (40-60mL/kg), υποδεικνύοντας την περιορισμένη εξωαγγειακή κατανομή. Η υποδόρια (sc) χορήγηση παρουσίαζε βραδύτερη απορρόφηση, με μικρότερη μέγιστη τιμή στο πλάσμα (5-10% αυτών της iv χορήγησης) και επιμήκυνση του  $t_{1/2}$  (περίπου 20-25 ώρες). Η μέγιστη τιμή στο πλάσμα μετρήθηκε μετά από 15-19 ώρες. Η βιοδιαθεσιμότητα της EPO κατά την sc χορήγηση ήταν 20-40%, δείχνοντας σημαντική απώλεια κατά τη μεταφορά από το διάμεσο χώρο στα λεμφαγγεία και στο αίμα. Τα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά των rhEPO σε υγιείς εθελοντές ήταν παρόμοια με αυτά σε άλλες ομάδες πληθυσμού, συμπεριλαμβανομένου ασθενών με χρόνια νεφρική νόσο, ηπατική κίρρωση και μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα<sup>24</sup>.

Ο μηχανισμός κάθαρσης και οι εστίες αποδόμησης των rhEPO δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Αρχικώς, είχε θεωρηθεί ότι το ήπαρ και ο νεφρός ήταν τα όργανα που εμπλέκονταν στην κάθαρση του φαρμάκου, πράγμα το οποίο δεν επιβεβαιώθηκε<sup>25</sup>. Η πρόσδεση της EPO στον υποδοχέα της οδηγεί σε μία διαδικασία κυτταρικής εσωτερικεύσης, κατά την οποία πιθανώς να αποδομείται ο συνδέτης<sup>1</sup>. Η χημειοθεραπεία που μειώνει τα κύτταρα που διαθέτουν EPOR, μειώνει και την κάθαρση της EPO<sup>26</sup>. Συνεπώς, ένας μηχανισμός κάθαρσης περιλαμβάνει την πρόσληψη και την αποδόμηση της EPO μέσω των κυττάρων που εκφράζουν τον EPOR, αλλά θεωρείται απίθανο αυτή να είναι η κύρια ή μοναδική οδός κάθαρσης. Τα κύτταρα του μυελού των οστών μπορούν να απομακρύνουν τους ερυθροποιητικούς παράγοντες μέσω μίας οδού που δεν εμπλέκει τους EPOR in vitro. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η απουσία ή η μείωση της ικανότητας πρόσδεσης ορισμένων ερυθροποιητικών αναλόγων στον υποδοχέα, δεν προκαλεί αξιόλογη μείωση στην κάθαρση<sup>27</sup>.

Σε υγιή άνδρα, μόνο ένα μικρό ποσό ακέραιης ραδιοσημασμένης epoetin β (λιγότερο από το 5% της δόσης) εκκρίνεται στα ούρα, δείχνοντας ότι η rhEPO αποδομείται σε άλλη θέση στον οργανισμό<sup>28</sup>. Πιθανώς, ένα σημαντικό μονοπάτι είναι η αποδόμηση στο διάμεσο χώρο, ενώ το σύστημα των λεμφαγγείων θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του φαρμάκου κατά την sc χορήγηση. Κάποια μικρά πεπτίδια ή ελεύθερο <sup>125</sup>I βρίσκονται σε ιστούς μετά iv χορήγηση <sup>125</sup>I-Darbepoetin α, υποδεικνύοντας ότι η αποδόμηση πιθανώς συμβαίνει στους ιστούς<sup>29</sup>.

#### **Πρωτεϊνικοί παράγοντες που διεγείρουν την ερυθροποίηση Υπεργλυκοζυλιωμένα παράγωγα: Η Darbepoetin α**

Οι rhEPO παρουσιάζουν ετερογένεια στη σύνθεση των υδατανθράκων με ποικιλία στην περιεκτικότητα σε σιαλικά οξέα. Η σημασία των σιαλικών οξέων στην κάθαρση των μορίων παρατηρήθηκε σε πειράματα με ισομορφές rhEPO, που αποκάλυψαν την άμεση σχέση της περιεκτικότητας σε σιαλικά οξέα και της ισχύος του προϊόντος in vivo<sup>30</sup>. Τα μόρια με αυξημένο αριθμό σιαλικών έχουν μειωμένη συγγένεια για τον υποδοχέα EPOR και αυξημένο  $t_{1/2}$ , υποδεικνύοντας ότι η παράταση του  $t_{1/2}$  είναι σημαντικότερος καθοριστής της ισχύος του μορίου σε σχέση με τη συγγένειά του για τον αντίστοιχο υποδοχέα<sup>31</sup>.

Η Darbepoetin α είναι ένα υπεργλυκοζυλιωμένο ανάλογο, το οποίο περιέχει δύο επιπλέον υδατανθρακικές αλυσίδες στις θέσεις 30 και 88, ως αποτέλεσμα αντικατάστασης πέντε αμινοξέων (Ala30Asn, His32Thr, Pro87Val, Trp87Val, Pro90Thr). Οι νέες υδατανθρακικές ομάδες δεν επηρέασαν την πρόσδεση στον υποδοχέα, τη δομή και τη σταθερότητα του μορίου. Η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες αυξήθηκε από 40% σε 51% και το M.B. αυξήθηκε από 30kDa σε 37kDa<sup>1</sup>. Σε σύγκριση με την epoetin α, το νέο παράγωγο είχε τρεις φορές μεγαλύτερο  $t_{1/2}$ , μικρότερη συγγένεια με τον υποδοχέα και αυξημένη βιοδραστικότητα in vivo σε διάφορα είδη. Ο μέσος  $t_{1/2}$  στη sc χορήγηση Darbepoetin α ήταν μεγαλύτερος σε σχέση με την iv έγχυση (περίπου 49 ώρες) και η μέση βιοδιαθεσιμότητα ήταν 37%<sup>31</sup>.

Μία δόση rhEPO έπρεπε να είναι 30-40 φορές υψηλότερη για να έχει συγκρίσιμο αποτέλεσμα με τη χαμηλότερη δόση της Darbepoetin α<sup>32</sup>. Η διαφορά στη δραστηριότητα πιθανώς ήταν αποτέλεσμα του - τρεις φορές- μεγαλύτερου  $t_{1/2}$  της Darbepoetin α, πράγμα που επέτρεπε την παρατεταμένη έκθεση των κυττάρων στο φάρμακο. Το παράδοξο φαινόμενο της μειωμένης συγγένειας για τον EPOR, αλλά της υψηλής in vivo δραστηριότητας της Darbepoetin α, εξηγήθηκε από την αρνητική επίδραση των υδατανθρακικών ομάδων στην κάθαρση του μορίου. Στα μεσοδιαστήματα χορήγησης η συγκέντρωση της Darbepoetin α αυξάνονταν σημαντικά σε σχέση με αυτή της rhEPO, γεγονός που αντιστάθμιζε την μειωμένη συγγένεια για τον EPOR<sup>33</sup>.

Σε αντίθεση με την rhEPO, η χορήγηση της Darbepoetin α είχε ισοδύναμα αποτελέσματα, ανεξαρτήτως της οδού χορήγησης (iv ή sc)<sup>34</sup>. Προφανώς, ο παρατεταμένος  $t_{1/2}$  μπορούσε να αντισταθμίσει τη μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου κατά την sc χορήγηση<sup>35</sup>.

#### **Πεγκυλιωμένα παράγωγα: Ο CERA**

Πεγκυλίωση είναι η προσθήκη PEG στις δραστικές πρωτεϊνικές ή υδατανθρακικές ομάδες της EPO. Οι πεγκυλιωμένες rhEPO περιέχουν μίγμα μορίων, με τις ομάδες PEG να προσδένονται σε διαφορετικές θέσεις, πράγμα που έχει διαφορετικές επιπτώσεις στη δραστηριότητα του μορίου. Με τον τρόπο αυτό έχει

επιτευχθεί η παράταση του  $t_{1/2}$  διαφόρων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Τα πεγκυλιωμένα μόρια παρουσιάζουν αύξηση του υδροδυναμικού μεγέθους, πράγμα που οδηγεί στη μειωμένη κάθαρση, λόγω της καθυστερημένης μεταφοράς από το αίμα στον εξωαγγειακό χώρο. Τα πεγκυλιωμένα παράγωγα έχουν περιορισμένη ανοσογονικότητα <sup>36</sup>.

Ο CERA, είναι ένας ερυθροποιητικός παράγοντας τρίτης γενιάς. Δημιουργήθηκε με την ενσωμάτωση της μεθόξυ-πολυαιθυλενο-γλυκόλης στο μόριο της epoetin β (PEG-epoetin β, Mircera, La Roche Ltd). Οι φαρμακοκινητικές παράμετροι αξιολογήθηκαν σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε περιτοναϊκή διάλυση. Ο μέσος  $t_{1/2}$  υπολογίστηκε σε 13 ώρες στην iv και σε 139 ώρες στη sc χορήγηση. Η κάθαρση ήταν 0.49 και 0.90ml/h/kg, στην iv και sc χορήγηση αντίστοιχα. Η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου ήταν 52% στη sc χορήγηση <sup>37</sup>.

Άλλα πεγκυλιωμένα παράγωγα είναι η PEG-Darberpoetin α και το Hematide. Στα ποντίκια ο μέσος χρόνος  $t_{1/2}$  της PEG-Darberpoetin α είναι 24.3 ώρες συγκρινόμενο με τις 17.5 ώρες για την Darberpoetin α <sup>26</sup>. Το Hematide είναι ένα συνθετικό πεγκυλιωμένο διμερές πεπτιδιο που προσδένεται και ενεργοποιεί τον EPOR, όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

### Άλλοι πρωτεϊνικοί παράγοντες

Διάφορα πρωτεϊνικά μόρια δοκιμάζονται σε προκλινικές και κλινικές μελέτες. Το παράγωγο AMG114 ήταν ένα περισσότερο γλυκοζυλιωμένο ανάλογο της Darberpoetin α με μεγαλύτερο  $t_{1/2}$ , αλλά με εξαιρετικά μειωμένη συγγένεια με τον EPOR, που δεν επέτρεψε τη θεραπευτική του χρήση <sup>4</sup>. Ένα άλλο παράγωγο είναι η συνθετική πρωτεΐνη της ερυθροποίησης (Synthetic Erythropoiesis Protein, SEP). Πρόκειται για συνθετικό πολυμερές (M.B.51KDa) αποτελούμενο από δύο υπομονάδες, συνδεδεμένες με ομοιοπολικό δεσμό <sup>38</sup>. Η πρωτεΐνη διεγείρει την ερυθροποίηση μέσω ενεργοποίησης του EPOR. Η δραστηριότητα της SEP ποικίλει στα διάφορα πειραματικά μοντέλα, αναλόγως του αριθμού και του τύπου των προσδεδεμένων πολυμερών <sup>39</sup>.

Η ερυθροποιητίνη από συγχώνευση πρωτεϊνών προέρχεται από δύο πλήρη τμήματα ανθρώπινων EPO που συνδέονται με ένα πεπτιδιο 17 αμινοξέων (M.B.76KDa). Σε sc χορήγηση σε πειραματόζωα αύξησε την παραγωγή των ερυθροκυττάρων σε επτά ημέρες, σε δόση που η rhEPO δεν ήταν αποτελεσματική <sup>40</sup>. Με δεδομένο ότι ο παράγοντας διέγερσης των αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor, GM-CSF) είναι απαραίτητος στα πρώιμα στάδια της ερυθροποίησης, χρησιμοποιήθηκαν υβριδικά μόρια EPO-GM-CSF <sup>41</sup>. Τα συμπλέγματα αυτά διεγείραν την ερυθροποίηση σε πειραματόζωα, αλλά διέθεταν υψηλή ανοσογονικότητα με αποτέλεσμα την παραγωγή αντισωμάτων έναντι της EPO και την επακόλουθη πρόκληση σοβαρής αναιμίας <sup>42</sup>.

Τα υβρίδια της EPO με το Fc τμήμα της ανθρώπινης IgG ανοσοσφαιρίνης ή με την αλβουμίνη περιορίζουν την ενδοκύττωση της EPO και την απομάκρυνσή της από την κυκλοφορία <sup>4</sup>. Η Fc-EPO έχει χορηγηθεί σε υγιείς εθελοντές (μελέτη φάσης I) με τη μορφή εισπνεόμενου αερολύματος, επιφέροντας αποδεδειγμένη αύξηση στον αριθμό των ΔΕΚ <sup>43</sup>. Ο παράγοντας CTNO528 είναι μία EPO-μμητική πρωτεΐνη με μεγαλύτερο  $t_{1/2}$ , χωρίς δομική ομοιολογία με την EPO <sup>44</sup>. Η ενδοφλέβια χορήγηση μίας δόσης του CTNO528 σε 25 υγιείς εθελοντές (μελέτη φάσης I), προκάλεσε παρατεταμένη δικτυοερυθροκυτταρική παραγωγή (μέγιστη τιμή ΔΕΚ στις 8 ημέρες) και αύξηση της αιμοσφαιρίνης (μέγιστη τιμή στις 22 ημέρες). Δεν παρατηρήθηκε παραγωγή αντισωμάτων έναντι του παράγοντα <sup>45</sup>.

### Μικρά πεπτιδια που διεγείρουν την ερυθροποίηση

Κυκλικά πεπτιδια αποτελούμενα από 20 αμινοξέα μπορεί να συνδέονται με τον EPOR, επάγοντας την ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης JAK-2 κίνηση/STAT-5 Πρόκειται για πεπτιδια με τις ίδιες λειτουργίες και βιολογικές ιδιότητες, αλλά διαφορετική αλληλουχία αμινοξέων σε σχέση με τη φυσική EPO <sup>46</sup>. Το EPO-μμητικό πεπτιδιο-1 ήταν το πρώτο της κατηγορίας, με ασθενή δραστηριότητα που δεν επέτρεψε την κλινική χρήση του <sup>47</sup>.

Το Hematide (Affymax, Palo Alto, CA) είναι ένα υψηλής δραστηριότητας συνθετικό πεπτιδιο γλυκοζυλιωμένης πολυαιθυλενογλυκόλης που προσδένεται και ενεργοποιεί τον EPOR <sup>48</sup>. Η δράση του Hematide έχει αποδειχθεί στις in vitro (σχηματισμός και έκρηξη αποικιών ερυθράς σειράς στο μινερό των οστών) και στις in vivo (αύξηση της ερυθροποίησης και διόρθωση της αναιμίας) μελέτες. Δεν παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση με την EPO ή με αντισώματα της EPO. Αυτό σημαίνει ότι τα αντισώματα έναντι του Hematide δεν επηρεάζουν την ενδογενή EPO, ενώ το προϊόν παραμένει αποτελεσματικό σε ασθενείς με αμιγή απλασία της ερυθράς (Pure Red Cell Aplasia, PRCA), λόγω αντισωμάτων έναντι της EPO. Ο  $t_{1/2}$  του Hematide υπολογίζεται σε 14-60 ώρες, αναλόγως της χορηγούμενης δόσης, σύμφωνα με μελέτες σε πθήκους. Η χορήγησή του σε υγιείς εθελοντές (μελέτη φάσης I) και σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο (μελέτη φάσης II) είχε καλώς ανεκτή ερυθροποιητική δραστηριότητα, διάρκειας πέραν του μηνός <sup>49, 50</sup>.

### Νεότερες θεραπευτικές προοπτικές Σταθεροποιητές του HIF

Όπως αναφέρθηκε σε νορμοξικές καταστάσεις, η γονιδιακή έκφραση της EPO είναι περιορισμένη, λόγω της αδρανοποίησης του παράγοντα HIF μέσω της υδροξυλίωσης της υπομονάδας HIF- $\alpha$ . Για την υδροξυλίωση, εκτός του  $O_2$ , απαιτείται σίδηρος και το 2-oxoglutarate<sup>51</sup>. Προσφάτως έχουν χρησιμοποιηθεί ανάλογα του 2-oxoglutarate, γνωστά ως σταθεροποιητές του HIF, τα οποία σε καλλιέργειας κυττάρων επάγουν την έκφραση της EPO σε ανθρώπους και πειραματόζωα. Μελέτη φάσης II με τον παράγοντα FG-2216 απέδειξε τη διόρθωση της αναιμίας σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο σε σχέση με την ομάδα placebo<sup>52</sup>. Οι παράγοντες αυτοί χορηγήθηκαν από το στόμα και οδήγησαν στην έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην ερυθροποιητική διαδικασία, όπως αυτά που αφορούν στη χρησιμοποίηση του σιδήρου. Τουλάχιστον 100  $O_2$ -ευαίσθητα γονίδια, όπως το γονίδιο του VEGF, αυξάνουν την έκφρασή τους κατά την αναστολή της πολυλ-υδροξυλάσης, χωρίς να σχετίζονται άμεσα με την ερυθροποίηση<sup>51</sup>. Στα μέσα του 2007, ο θάνατος γυναίκας από ηπατική νέκρωση, στην οποία είχε χορηγηθεί ο παράγοντας FG-2216, (κλινική μελέτη φάσης II), οδήγησε στη διακοπή των μελετών με σταθεροποιητές του HIF<sup>4</sup>.

### Αναστολείς του παράγοντα GATA

Η οικογένεια GATA αποτελείται από έξι μεταγραφικούς παράγοντες, GATA1-6. Ο GATA4 εμπλέκεται στην έκφραση του γονιδίου της EPO και πιθανώς είναι υπεύθυνος για την αλλαγή στη θέση παραγωγής της EPO από το εμβρυικό ήπαρ στο νεφρό των ενηλίκων<sup>53</sup>.

Αντιθέτως, ο GATA2 αναστέλλει την έκφραση της EPO, με την πρόσδεση της αλληλουχίας GATA στον εκκινητή του γονιδίου της EPO, λειτουργώντας έτσι ως αρνητικός ρυθμιστής της ερυθροποίησης. Η παρέμβαση στο μονοπάτι αρνητικής έκφρασης μπορεί να αποτελέσει μια μελλοντική θεραπευτική προοπτική. Διάφορα μόρια βρίσκονται υπό μελέτη, όπως το K-11706, το οποίο ενισχύει την ερυθροποίηση *in vitro* και *in vivo*. Η από του στόματος χορήγηση του K-11706 διατήρησε τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης, των ΔΕΚ, της EPO και του αριθμού των CFU<sub>E</sub> σε ποντίκια<sup>54</sup>.

### Αναστολείς της φωσφατάσης των αιμοποιητικών κυττάρων

Η πρωτεΐνη τυροσίνη φωσφατάση (Src-Homology 2-domain phosphatase-1, SHP1) βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των αιμοποιητικών κυττάρων<sup>55</sup>. Η SHP1 προσδένεται στην περιοχή αρνητικής ρύθμισης του EPOR και προκαλεί την αποφωσφορυλίωση της JAK-2, λειτουργώντας έτσι ως αρνητικός ρυθμιστής της οδού μεταβίβασης του ενδοκυττάρου σήματος από την EPO<sup>4</sup>.

Η μελέτη των CD34+ κυττάρων σε ασθενείς με μη ανταπόκριση στην EPO έδειξε αύξηση του mRNA της SHP1. Η επώαση των CD34+ κυττάρων ασθενών ανθεκτικών στην EPO με αντιρό SHP1 μείωσε την έκφραση της SHP1 πρωτεΐνης και αύξησε την έκφραση του STAT-5, προκαλώντας την αποκατάσταση των ερυθροειδών αποικιών. Το γονίδιο SHP1 έχει κλωνοποιηθεί και έχουν αναγνωριστεί αναστολείς αυτού. Η αναστολή της SHP1, οδηγεί σε δοσοεξαρτώμενο πολλαπλασιασμό των κυττάρων της ερυθράς σειράς *in vitro*. Οι αναστολείς αυτοί δεν έχουν δοκιμαστεί σε ανθρώπους και συνεπώς ο ρόλος τους είτε ως συμπληρωματική, είτε ως μεμονωμένη θεραπεία σε ασθενείς με αναιμία δεν είναι ακόμη σαφής<sup>56</sup>.

### Γονιδιακή θεραπεία

Η εξασφάλιση της συνεχούς παρουσίας χαμηλών και ασφαλών επιπέδων EPO με γονιδιακές μεθόδους αποτελεί μια ελκυστική θεραπευτική προσέγγιση των αναιμικών ασθενών. Οι προσπάθειες περιλαμβάνουν την έγχυση “γυμνού” (naked) DNA, τη χρήση τεχνητών ανθρώπινων χρωμοσωμάτων και τη μεταμόσχευση αυτόλογων ή αλλογενών κυττάρων κατόπιν *ex vivo* επεξεργασίας<sup>57,58</sup>.

Προβλήματα, όπως η καθαρότητα του γενετικού υλικού, η ελεγχόμενη γονιδιακή έκφραση και οι πιθανές ογκογενετικές επιπλοκές, πρέπει να ξεπεραστούν πριν την εφαρμογή γενετικών μεθόδων στον άνθρωπο<sup>59</sup>.

### Συμπέρασμα

Οι rhEPO χρησιμοποιούνται ευρέως για τη διόρθωση της αναιμίας της νεφρικής ανεπάρκειας, των νεοπλασματικών νοσημάτων και της χρόνιας νόσου, περιορίζοντας σημαντικά τις ανάγκες σε μετάγγιση ερυθρών αιμοσφαιρίων και τις επακόλουθες επιπλοκές. Η αύξηση της αιμοσφαιρίνης σε χρονίως πάσχοντες ασθενείς συνδυάζεται με βελτίωση της κατάστασης ικανότητας και της ποιότητας ζωής. Η συχνότητα των δόσεων σε συνδυασμό με κοινωνικούς και γεωγραφικούς παράγοντες, αποτελούσε ένα

σημαντικό περιορισμό στη χρήση των πρώτων rhEPO. Η εισαγωγή στην κλινική πράξη rhEPO με μεγαλύτερο  $t_{1/2}$ , όπως το υπεργλυκοζυλιωμένο παράγωγο Darbepoietin  $\alpha$ , αύξησε τα μεσοδιαστήματα χορήγησης, διευκολύνοντας τη λήψη των παραγόντων και την παρακολούθηση των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών και των πασχόντων από κακοήθειες υπό χημειοθεραπεία.

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των φαρμακευτικών εταιρειών εστιάζεται στην παραγωγή παραγόντων που διεγείρουν την παραγωγή EPO, με περιορισμένη ανοσογονικότητα και ευκολία στη συντήρηση και στη χορήγησή τους. Στην κατηγορία των νεότερων παραγόντων ανήκουν συνθετικά διμερή ή τριμερή πρωτεϊνικά μόρια, πεπτιδία που συνδέονται με τον EPOR χωρίς ομολογία με την ενδογενή EPO, οι αναστολείς της φωσφατάσης των αιμοποιητικών κυττάρων και οι σταθεροποιητές του HIF. Αναμφίβολα, η βέλτιστη χρήση των νεότερων παραγόντων προϋποθέτει την ισορροπία ανάμεσα στη συγγένεια με τον EPOR και στο χρόνο κυκλοφορίας στο πλάσμα. Στην προσπάθεια αυτή σημαντική είναι η κατανόηση της αλληλεπίδρασης της EPO με τον υποδοχέα της και του τρόπου με τον οποίο επηρεάζεται η δραστηριότητα των μορίων *in vitro* και *in vivo*.

### Βιβλιογραφία

1. Elliot S, Pham E, Macdugall IC. (2008). Erythropoietins: A common mechanism of action. *Exp Hematol*, 36 : 1573-1584
2. Sasu BJ, Hartley C, Schultz H, et al. (2005). Comparison of epoetin alfa and darbepoetin alfa biological activity under different administration schedules in normal mice. *Acta Haematol*, 113 : 163-174
3. Bunn HF. New agents that stimulate erythropoiesis. (2007). *Blood*, 109 : 868-873
4. Macdougall IC. (2008). Novel Erythropoiesis-Stimulating Agents: A New Era in Anemia Management. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3 : 200-207
5. Palis J, Robertson S. (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and proper of the muse. *Development*, 22 : 5073-5084
6. Ney PA. (2006). Gene expression during terminal erythroid differentiation. *Curr Opin Hematol*, 13 : 203-208
7. Broudy VC, Lin N, Brice M, Nakamoto B, Papayannopoulou T. (1991). Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood*, 77 : 2583-2590
8. Sawada K, Krantz SB, Kans JS, et al. (1987). Purification of human erythroid colony-forming units and demonstration of specific binding of erythropoietin. *J Clin Invest*, 80 : 357-366
9. Wang GL, Semenza GL. (1993). General involvement of hypoxia inducible factor in transcriptional response to hypoxia. *Proc Soc Natl Acad Sci USA*, 90 : 4304-4308
10. Peyssonnaud C, Zinkernage AS, Schuepbach RA, et al. (2007). Regulation of iron homeostasis by the hypoxia inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest*, 117 : 1926-1932
11. Constantinescu SN, Ghaffari S. (1999) The erythropoietin receptor: structure, activation and intracellular signal transduction. *Trends Endocrinol Metab*, 10 : 18-23
12. Silva M, Benito A. (1999). Erythropoietin can induce the expression of bcl-x (L0 through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines. *J Biol Chem*, 274 : 22165-22169
13. Browne JK, Cohen AM, Egrie JC, et al. (1986). Erythropoietin: gene cloning, protein structure, and biological properties. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51:693-702
14. Groopman JE, Itri LM. (1999). Chemotherapy-induced anemia in adults: incidence and treatment. *J Natl Cancer Inst*, 91 : 1616-163.
15. Koury ST, Koury MJ, Bondurant MC, Caro J, Graber SE. (1989). Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by *in situ* hybridization: correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. *Blood*, 74 : 645-651
16. Erslev AJ. (1991). Erythropoietin titers in health and disease. *Semin Hematol*, 28 : 2-7
17. Elliott S, Egrie J, Browne J, et al. (2004). Control of rHuEPO biological activity: the role of carbohydrate. *Exp Hematol*, 32 : 1146-1155
18. Smith JA. (1995). Exercise, training and red blood cell turnover. *Sports Med*, 19 : 9-31.
19. Koury MJ, Bondurant MC. (1988). Maintenance by erythropoietin of viability and maturation of murine erythroid precursor cells. *J Cell Physiol*, 137 : 65-74
20. Fraser JK, Lin FK, Berridge MV. (1988). Expression of high affinity receptors for erythropoietin on human bone marrow cells and on the human erythroleukemic cell line, HEL. *Exp Hematol*, 16: 836-842
21. Lin FK, Suggs S, Lin CH, et al. (1985). Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82 : 7580-7584
22. Lasne F, de Ceaurriz J. (2000). Recombinant erythropoietin in urine. *Nature*, 405 : 635-636
23. Martin KJ. (2007). The first human cell line-derived erythropoietin, epoetin delta (Dynepo), in the management of anemia in patients with chronic kidney disease. *Clin Nephrol*, 68 : 26-31.

24. Veng-Pedersen P, Chapel S, Al-Huniti NH, et al. (2004). Pharmacokinetic tracer kinetics analysis of changes in erythropoietin receptor population in phlebotomy-induced anemia and bone marrow ablation. *Biopharm Drug Dispos*, 25 :1 49–156.
25. Jensen JD, Jensen LW, Madsen JK, Poulsen L. (1995). The metabolism of erythropoietin in liver cirrhosis patients compared with healthy volunteers. *Eur J Haematol*, 54 : 111–116
26. Agoram B, Molineux G, Jang G, et al. (2006). Effects of altered receptor binding activity on the clearance of erythropoiesis-stimulating proteins: a minor role of erythropoietin receptor-mediated pathways [abstract]. *Nephrol Dial Transplant*, 21: 303–304, Abstract MP013
27. Yoon WH, Park SJ, Kim IC, Lee MG. (1997). Pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin in rabbits and 3/4 nephrectomized rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 96 : 227–240
28. Flaharty KK. (1990). Clinical pharmacology of recombinant human erythropoietin (r-HuEPO). *Pharmacotherapy*, 10 : 9–14
29. Agoram B, Sutjandra L, Molineux G, Jang G, Elliott S. (2006). Tissue distribution and excretion of 125I-darbepoetin alfa in Sprague Dawley rats following a single subcutaneous or intravenous administration [abstract]. *Nephrol Dial Transpl*, 21: 304, Abstract MP014.
30. Egrie J, Browne J. (2002). Darbepoetin alfa is more potent in vivo and can be administered less frequently than rHuEPO. *Br J Cancer*, 87 : 476–477
31. Elliott S, Lorenzini T, Asher S, et al. (2003). Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. *Nat Biotechnol*, 21 : 414–421
32. Tolman C, Richardson D, Bartlett C, Will E. (2005). Structured conversion from thrice weekly to weekly erythropoietic regimens using a computerized decision-support system: a randomized clinical study. *J Am Soc Nephrol*, 16 : 1463–1470
33. Elliott S, Egrie J, Browne J, et al. (2004). Control of rHuEPO biological activity: the role of carbohydrate. *Exp Hematol*, 32 : 1146–1155
34. Locatelli F, Canaud B, Giacardy F, Martin-Malo A, Baker N, Wilson J. (2003). Treatment of anaemia in dialysis patients with unit dosing of darbepoetin alfa at a reduced dose frequency relative to recombinant human erythropoietin (rHuEpo). *Nephrol Dial Transplant*, 18 : 362–369
35. Macdougall IC, Gray SJ, Elston O, et al. (1999). Pharmacokinetics of novel erythropoiesis stimulating protein compared with epoetin alfa in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol*, 10 : 2392–2395
36. Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. (1994). Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. *J Pharm Sci*, 83 : 601–606
37. Jolling K, Ruixo JJ, Hemeryck A, Piotrovskij V, Greway T. (2004). Population pharmacokinetic analysis of pegylated human erythropoietin in rats. *J Pharm Sci*, 93 : 3027–3038
38. Kochendoerfer GG, Chen SY, Mao F, et al. (2003). Design and chemical synthesis of a homogenous polymer-modified erythropoiesis protein. *Science*, 299 : 884–887
39. Chen SY, Cressman S, Mao F, et al. (2005). Synthetic erythropoietic proteins: Tuning biological performance by site specific polymer attachment. *Chem Biol*, 12 : 371–383
40. Sytkowski AJ, Lunn ED, Risinger MA, Davis KL. (1999). An erythropoietin fusion protein comprised of identical repeating domains exhibits enhanced biological properties. *J Biol Chem*, 274 : 24773–24778
41. Coscarella A , Liddi R, Bach S, Zappitelli S, Urso R, Mele A, De Santis R. (1998). Pharmacokinetic and immunogenic behavior of three recombinant Human GM-SCF-EPO hybrid proteins in cynomolgus monkeys. *Mol Biotechnol*, 10 : 115–122
42. Coscarella A , Liddi R, Di Loreto M, et al. (1998). The rhGM-CSF-EPO hybrid protein MEN 11300 induces anti-EPO antibodies and severe anaemia in rhesus monkeys. *Cytokine*, 10 : 964–969
43. Dumont JA, Bitinti AJ, Clark D, et al. (2005). Delivery of erythropoietin- Fc fusion protein by inhalation in humans through an immunoglobulin transport pathway. *J Aerosl Med*, 18 : 294–303
44. Bugelski P, Nessor BT, Spinka-Doms T, et al. (2005). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of CTNO528, a novel erythropoiesis receptor agonist in normal and anemic rats. *Blood*, 106 : 146b
45. Franson KL, Bouman-Trio EA, Cohen AF, et al. (2005). A phase I, single and fractionated, ascending dose study evaluating the safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics and immunogenicity of an erythropoietic mimetic antibody fusion protein, CTNO528 in healthy male subjects. *Blood*, 106 : 146b
46. Livnah O, Stura EA, Johnson DL, et al. (1996). Functional mimicry of a protein hormone by a peptide against: The EPO receptor complex at 2.8 Å. *Science*, 273 : 464–471
47. Wrighton NC, Farrell FX, Chang R, et al. (1996). Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science*, 273 : 458–464
48. Fan Q, Leuther KK, Holmes CP, et al. (2006). Preclinical evaluation of Hematide, a novel erythropoiesis stimulating agent, for the treatment of anemia. *Exp Hematol*, 34 : 1003–1311

49. Stead RB, Lambert J, Wessels D, et al. (2006). Evaluation of the safety and pharmacodynamics of Hematide, a novel erythropoietic agent, in a phase 1, double-blind placebo-controlled, dose escalation study in healthy volunteers. *Blood*, *108*: 1830-1834
50. Woodburn KW, Fan Q, Winslow S, et al. (2007). Hematide is immunologically distinct from erythropoietin and corrects anemia induced by antierythropoietin antibodies in a rat pure red cell aplasia model. *Exp Hematol*, *35* : 1201-1208
51. Bruegge K, Jelkmann W, Metzen E. (2007). Hydroxylation of hypoxia-inducible transcription factors and chemical compounds targeting the HIF-hydroxylases. *Curr Med Chem*, *14* : 103-112
52. Safran M, Kim WY, O'Connell F, et al. (2006). Mouse model for noninvasive imaging of HIF prolyl hydroxylase activity: Assessment of an oral agent that stimulates erythropoietin production. *Proc Natl Acad Sci USA*, *103* : 105-110
53. Dame C, Sola MC, Lim K, et al. (2004). Hepatic erythropoietin gene regulation by GATA-4. *J Biol Chem*, *279* : 2955-2961
54. Nakano Y, Imagawa S, Matsumoto K, et al. (2004). Oral administration of K-11706 inhibits GATA binding activity, enhances Hypoxia-inducible factor 1 binding activity, and restores indicators in an in vivo mouse model of anemia of chronic disease. *Blood*, *104* : 4300-4307
55. Barbone FP, Johnson DL, Farrell FX, et al. (1999). New epoetin molecules and novel therapeutic approaches. *Nephrol Dia Transplant*, *14* : 80-84
56. Fattori E, Cappelletti M., Zampaglione I, et al. (2005). Gene electro-transfer on an improved erythropoietin plasmid in mice and non-Human primates. *J Gene Med*, *7* : 228-236
57. Rivera VM, Gao GP, Grant RL, et al. (2005). Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood*, *105* : 1424-1430
58. Kakeda M, Hiratsuka M, Nagata K, et al. (2005). Human artificial Chromosome (HAC) vector provides long-term therapeutic transgene expression in normal human primary fibroblasts. *Gene Ther*, *12* : 852-856
59. Lippin Y, Dranitzki-Elhalel M, Brill-Almon E, et al. (2005). Human erythropoietin gene therapy for patients with chronic renal failure. *Blood*, *106* : 2280-2286