

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 457 398**

51 Int. Cl.:

C07K 14/505

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2006** **E 06753630 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013** **EP 1885747**

54 Título: **Variantes de eritropoyetina**

30 Prioridad:

13.05.2005 EP 05010473

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
25.04.2014

73 Titular/es:

**CHARITÉ - UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
(100.0%)
SCHUMANNSTRASSE 20/21
10117 BERLIN, DE**

72 Inventor/es:

**MEISEL, ANDREAS;
PRILLER, JOSEF, PROF. DR.;
BONNAS, CHRISTEL y
DIRNAGL, ULRICH**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 457 398 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Variantes de eritropoyetina

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevas variantes endógenas de eritropoyetina (EPO) y su uso para el tratamiento o la prevención de una afección asociada con daño tisular debido a muerte celular (apoptosis, necrosis) e inflamación, en particular, para neuroprotección, por ejemplo, tratamiento de enfermedades agudas (por ejemplo, ictus) o crónicas (por ejemplo, ELA) del sistema nervioso.

Antecedentes de la invención

El ictus es una enfermedad debilitante que afecta a más de 400.000 personas al año en los Estados Unidos y es la tercera causa más común de muerte en los Estados Unidos. Además la mitad de los pacientes hospitalizados de neurología tienen problemas relacionados con ictus. Con las tendencias actuales, se proyecta que este número salte a un millón al año en el año 2050. Cuando se consideran juntos los costes directos (cuidados y tratamiento) y los costes indirectos (productividad perdida) de los ictus, los ictus ponen una carga de 43,3 mil millones de dólares al año en la sociedad de los Estados Unidos solo. Aproximadamente 1/3 de los pacientes mueren en los primeros tres meses, 1/3 permanecen con discapacidades graves, y solo 1/3 se recuperan con desenlace aceptable. En 1990 las enfermedades cardiovasculares eran la segunda causa principal de muerte en el mundo, matando más de 4,3 millones de personas en el mundo. Por tanto, desde una perspectiva de salud pública, el ictus es una de las enfermedades más relevantes.

El ictus se caracteriza por la pérdida repentina de circulación a un área del cerebro, lo que produce una pérdida correspondiente de función neurológica. También llamado accidente cerebrovascular o síndrome de ictus, ictus es un término no específico que abarca un grupo heterogéneo de causas patofisiológicas, incluyendo trombosis, embolia y hemorragia. Los ictus actualmente se clasifican como hemorrágicos o isquémicos. Ictus isquémico agudo se refiere a ictus causados por trombosis o embolia y representan el 80% de los ictus.

Los ictus isquémicos resultan del bloqueo de las arterias que suministran al cerebro, más comúnmente en las ramas de las arterias carótidas internas. El bloqueo habitualmente se produce cuando una parte de un coágulo sanguíneo (trombo) o de un depósito de grasa (ateroma) debido a aterosclerosis se rompe (convirtiéndose en un émbolo), viaja a través del torrente sanguíneo, y se aloja en una arteria que suministra al cerebro. Los coágulos sanguíneos se pueden formar cuando un depósito de grasa en la pared de una arteria se rompe. La rotura de tal depósito de grasa también se puede formar cuando un gran depósito de grasa ralentiza el flujo sanguíneo, reduciéndolo a un hilo. La sangre que fluye lentamente es más probable que se coagule. Por tanto, el riesgo de que se forme un coágulo en y bloquee una arteria estrechada es alto. Los coágulos sanguíneos también se pueden formar en otras áreas, tal como en el corazón o en una válvula del corazón. Los ictus debidos a tales coágulos sanguíneos son los más comunes entre personas que han tenido recientemente cirugía cardíaca y personas que tienen un trastorno en una válvula del corazón o un ritmo cardíaco anormal (arritmia), especialmente fibrilación auricular. Además, en ciertos trastornos tal como un exceso de glóbulos rojos (policitemia), el riesgo de coágulos sanguíneos aumenta porque la sangre se espesa.

Un ictus isquémico también se puede producir, si el flujo sanguíneo al cerebro se reduce, como puede ocurrir cuando una persona pierde mucha sangre o tiene una presión sanguínea baja. Ocasionalmente, un ictus isquémico se produce cuando el flujo sanguíneo al cerebro es normal pero la sangre no contiene suficiente oxígeno. Los trastornos que reducen el contenido de oxígeno de la sangre incluyen anemia grave (una deficiencia en glóbulos rojos), asfixia e intoxicación por monóxido de carbono. Habitualmente, el daño cerebral en tales casos está extendido (difuso), y se produce coma. Un ictus isquémico se puede producir si la inflamación o infección estrecha los vasos sanguíneos que suministran al cerebro. De forma similar, fármacos tales como cocaína o anfetaminas pueden producir espasmo de las arterias, que puede producir un estrechamiento de las arterias que suministran al cerebro a tal grado que se produzca un ictus.

El cerebro requiere glucosa y oxígeno para mantener el metabolismo y la función neuronales. La administración inadecuada de oxígeno al cerebro produce una hipoxia y se produce isquemia del insuficiente flujo sanguíneo cerebral. Las consecuencias de la isquemia cerebral dependen del grado y la duración de flujo sanguíneo cerebral reducido. Las neuronas pueden tolerar la isquemia durante 30-60 minutos. Si el flujo no se restablece en el área isquémica, suceden una serie de procesos metabólicos. Las neuronas se vuelven deficientes en ATP y cambian a la glucólisis anaerobia, una ruta mucho menos eficaz. El lactato se acumula y el pH intracelular disminuye. Sin un suministro adecuado de ATP, las bombas iónicas en la membrana plasmática fallan. El flujo entrante resultante de sodio, agua, y calcio a la célula produce un rápido hinchamiento de las neuronas y células de glía. La despolarización de la membrana también estimula la liberación masiva de los aminoácidos glutamato y aspartato, que actúan ambos como neurotransmisores excitantes en el cerebro. El glutamato activa además los canales iónicos de sodio y calcio en la membrana de la célula neuronal, es decir el canal de calcio de N-metil-D-aspartato (NMDA) bien caracterizado. El excesivo flujo entrante de calcio produce la activación desordenada de una amplia gama de

sistemas enzimáticos (proteasas, lipasas y nucleasas). Estas enzimas y sus productos metabólicos, tal como radicales libres de oxígeno, dañan membranas celulares, material genético y proteínas estructurales en las neuronas, produciendo por último la muerte celular de neuronas (Dirnagl, U. et al. (1999) *Trends Neurosci.* **22**: 391-397).

Los ictus empiezan repentinamente, se desarrollan rápidamente, y producen la muerte de tejido cerebral en minutos a días. En el cerebro isquémico, comúnmente se distinguen dos volúmenes de tejido - el núcleo del infarto y la zona circundante, conocida como penumbra isquémica - el margen subperfundido y metabólicamente comprometido que rodea el núcleo irrevocablemente dañado. El núcleo y la penumbra se caracterizan por dos tipos diferentes de muerte celular: necrosis y apoptosis (que también se llama muerte celular programada o muerte celular neuronal retrasada). La grave deficiencia de perfusión en el núcleo causa una rotura de procesos metabólicos, suministro de energía celular y homeostasis iónica, que produce que las células pierdan su integridad en minutos. Por tanto, la necrosis aguda de células y tejido predomina en el núcleo. En la penumbra, se mantiene alguna perfusión residual por vasos colaterales, que pueden ser incapaces de mantener el metabolismo funcional completo, pero previene la desintegración estructural inmediata. Sin embargo, a lo largo del tiempo (de horas a varios días), la alteración de la homeostasis celular produce que mueran más y más células, y el volumen del infarto aumenta. Por tanto, la penumbra se tiene que considerar como tejido en riesgo durante la maduración del infarto. En esta región, las cascadas de señalización de apoptosis e inflamatoria desempeñan un papel importante. Puede constituir inicialmente el 50% del volumen que terminará como infarto. Los mecanismos que llevan a la muerte celular retrasada proporcionan dianas para una terapia neuroprotectora específica en regiones cerebrales expuestas a isquemia, pero que aún son viables.

Las opciones terapéuticas hasta ahora son muy decepcionantes: la trombólisis con rtPA, la única terapia con eficacia probada en un ensayo clínico principal (NINDS), solo es eficaz en un intervalo de tiempo de tres horas, lo que limita su aplicación a solo un pequeño porcentaje de pacientes con ictus isquémico. En otras palabras, además de la terapia compasiva básica, actualmente más del 95% de los ictus no se pueden tratar específicamente. Esto está en fuerte contraste con nuestro conocimiento respecto a la patofisiología básica de la enfermedad, que ha surgido a lo largo de la última década. En particular, se ha acumulado conocimiento extenso sobre mecanismos de daño cerebral parenquimatoso y neuroprotección endógena, así como reorganización funcional y estructural.

Recientemente, la atención se ha enfocado sobre los potenciales papeles terapéuticos para proteínas cerebrales endógenas que poseen propiedades neuroprotectoras. EPO, una hormona glicoproteína producida principalmente por células del endotelio capilar peritubular del riñón, que es un miembro de la familia de citoquinas de la hormona del crecimiento/prolactina (Zhu Y. y D'Andrea A.D. (1994) *Curr. Opin. Hematol.* **1**: 113-118) es un candidato prometedor. Aunque EPO se caracterizó primero y ahora se conoce ampliamente por su papel como hormona hematopoyética la detección de EPO y su receptor (EPOR) en tejido cerebral de roedor y humano así como en neuronas y astrocitos cultivados expandió la búsqueda para otros papeles biológicos de EPO.

En el cerebro, existe un sistema paracrino EPO/(Epo-R)₂ independiente del sistema endocrino de eritropoyesis adulta; las neuronas expresan (Epo-R)₂ y los astrocitos producen EPO (Ruscher et al. (2002) *J. Neurosci.* **22**, 10291-301; Prass et al. (2003) *Stroke* **34**, 1981-1986). Se demostró *in vitro* e *in vivo* que EPO es un potente inhibidor de apoptosis neuronal inducida por isquemia e hipoxia (Ruscher et al. (2002) *J. Neurosci.* **22**, 10291-301; Bernaudin, M., et al. (1999) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **19**: 643-51; Morishita, E., et al. (1997) *Neuroscience* **76**: 105-16). Varios grupos describieron que la adición de EPO a cultivos neuronales los protege contra toxicidad hipóxica y de ácido glutámico (Henn F.A. y Braus D.F. (1999) *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **249**: 48-56; Vogeley K. et al. (2000) *Am. J. Psychiatry* **157**: 34-39) y reduce la disfunción neurológica en modelos en roedores de ictus (Brines M.L. et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 10526-10531 y Bernaudin et al. (1999) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **19**: 643-651). Los resultados prometedores de estos experimentos se han corroborado en estudios en seres humanos en donde se mostró que la terapia de EPO para ictus agudo es segura y podría ser beneficiosa (Ehrenreich H. et al. (2002) *Mol. Medicine* **8**: 495-505) y documento WO 00/35475 A2. Estas propiedades celulares y más particular neuroprotectoras de EPO han llevado a investigación adicional en este área para sustanciar estos descubrimientos en ensayos mayores y ahora se propone el uso de EPO también en otra indicación que incluye, por ejemplo, esquizofrenia (Ehrenreich H et al. (2004) *Molecular Psychiatry* **9**: 42-54 y documento WO 02/20031 A2).

Para la aplicación de EPO para prevenir daño tisular la actividad hematopoyética con frecuencia no se requiere y podría ser perjudicial si se administran grandes cantidades de EPO para tratar o aliviar los efectos de, daño tisular inducido por hipoxia o isquemia. Por tanto, se han hecho intentos para crear variantes de EPO, que solo muestren la propiedad protectora celular pero no las propiedades hematopoyéticas. El documento US 2003/0130197 describe péptido miméticos de EPO para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, que no tienen homología de secuencia con la EPO natural o fragmentos de la misma. El documento US 6.531.121 divulga una asialoeritropoyetina que se genera por desialilación completa de EPO recombinante mostró una capacidad aumentada para cruzar la barrera celular endotelial y tenía una actividad hematopoyética disminuida. También se mostró que la eritropoyetina carbamylada (CEPO) mostraba un efecto protector de tejido pero no efecto eritropoyético (Leist et al. (2004) *Science* **305**: 239-242 y documento WO 2005/025606 A1).

El documento WO 2004/043382 divulga variantes polipeptídicas de eritropoyetina humana que tienen actividad eritropoyética alterada. Las variantes de EPO divulgadas contienen diferencias de aminoácidos en dos o más regiones de modificación de EPO diferentes comparadas con las secuencias de EPO humana de tipo salvaje. Tales regiones incluyen la región de contenido glucídico (A30, H32, P87, W88, P90), la región de agregación (N24, N38, N83) y la región de unión a EPOR (T44, T48, N147 y L155). En algunas de las variantes divulgadas, se mostró que la actividad eritropoyética estaba disminuida, o que el tiempo requerido para alcanzar el máximo nivel de tal actividad estaba extendido. Sin embargo, no hay enseñanza o sugerencia de ninguna variante de EPO cuya actividad hematopoyética esté esencialmente eliminada mientras que la actividad protectora de células o neuronas se mantiene.

Por último, se mostró que un péptido 17-mero de EPO inhibía la muerte celular de dos líneas celulares neuronales, SK-N-MC y NS20Y (Campana W.M. et al. (1998) Int. J. Mol. Medicine 1: 235-241), mientras que al mismo tiempo no tenía actividad hematopoyética. Sin embargo, se necesitó 1 ng/ml del péptido de EPO para producir el mismo efecto antiapoptótico que 100 pg/ml de EPO recombinante (rhEPO) en células NS20Y y que 400 pg/ml de rhEPO en células SK-N-MC. Dado el peso molecular aparente de rhEPO de aproximadamente 66.000 g/mol (el peso molecular calculado es aproximadamente 33.000 g/mol pero no incluye el peso de los residuos de oligosacáridos comprendidos en rhEPO) y de aproximadamente 1.900 g/mol del péptido de EPO, una concentración de 1,52 pmol/l y 6,06 pmol/l, respectivamente de rhEPO y de 1 nmol/l del péptido de EPO produjeron el mismo nivel de un efecto protector de células. Consecuentemente, el péptido de EPO es entre 650 veces a 165 veces menos activo que rhEPO en la prevención de la muerte celular. Es evidente a partir de estas cifras que la región de EPO comprendida en el 17-mero no desempeña un papel principal en la función protectora de células de EPO. Por tanto, todas las variantes de EPO, que tienen una actividad hematopoyética disminuida conocidas en el estado de la técnica padecen la desventaja de que no son naturales puesto que bien han perdido su glicosilación natural o son truncamientos artificiales y/o tienen actividad protectora de células enormemente disminuida, si se comparan con rhEPO. Por tanto, hay una necesidad en el estado de la técnica para proporcionar un derivado de EPO, que esté próximo a la EPO natural y que tenga la misma o mejor actividad protectora de tejido que rhEPO pero menos o ninguna actividad hematopoyética, en particular, eritropoyética.

Este problema se resuelve mediante la provisión de nuevas variantes de EPO, que se encontró que se producían de forma natural en tejido humano y de ratón (cerebro, riñón) y que muestran una actividad protectora de células similar o mejor que rhEPO pero que no muestran ninguna actividad hematopoyética significativa.

Compendio de la invención

En un aspecto la presente invención se refiere a un polinucleótido que codifica una variante de EPO seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) polinucleótidos que codifican la forma madura de los polipéptidos denominados hs3, h1-4, h1-5, hs4, h1-1, h2-1, mS, mG3, mG5, m301, mK3, ha, hAma, hAmE y hA-10 que tienen la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 50, 51, 52, y 53, respectivamente;
- (b) un polinucleótido que codifica la forma madura del polipéptido denominado secuencia ha sin líder que consiste en la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en SEQ ID NO: 61;
- (c) polinucleótidos que tienen la secuencia codificante, como se muestra en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 55, 56, 57 y 58 que codifican al menos la forma madura del polipéptido;
- (d) un polinucleótido que consiste en la secuencia codificante, como se muestra en SEQ ID NO: 60 que codifica la forma madura del polinucleótido denominado secuencia ha sin líder;
- (e) polinucleótido que codifica una versión humanizada de los polipéptidos mS, mG3, mG5, m301 y mK3 que consiste en la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, y 22;
- (f) polinucleótidos que codifican un polipéptido que comprende una fusión de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 24, 26, 28 y 30, en el extremo N de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 32, 34, 36 y 38, en donde dicha fusión tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora, pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;
- (g) polinucleótidos que comprenden una fusión de secuencias polinucleotídicas seleccionadas del grupo de secuencias polinucleotídicas mostradas en SEQ ID NO: 23, 25, 27 y 29, en 5' de una secuencia polinucleotídica seleccionada del grupo de secuencias polinucleotídicas mostradas en SEQ ID: 31, 33, 35 y 37, en donde dicha fusión tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;
- (h) polinucleótidos que codifican un derivado de un polipéptido codificado por un polinucleótido de cualquiera de (a) a (g), en donde en dicho derivado entre 1 y 10 residuos de aminoácidos están conservadoramente sustituidos comparado con dicho polipéptido, y dicho derivado tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;
- (i) polinucleótidos que codifican un fragmento de un polipéptido n codificado por un polinucleótido de cualquiera de (a) a (h), en donde en dicho fragmento entre 1 y 10 aminoácidos se delecionan N- y/o C-terminalmente y/o entre 1 y 10 aminoácidos se delecionan N- y/o C-terminalmente de la unión comparado con dicho polipéptido, y

dicho fragmento tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;

(j) polinucleótidos que son al menos el 95% idénticos a un polinucleótido como se ha definido en cualquiera de (a) a (d) y que al mismo tiempo tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;

(k) polinucleótidos cuya hebra complementaria hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido como se ha definido en cualquiera de (a) a (j) y que codifica un polipéptido que tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;

(l) polinucleótidos que codifican un polipéptido variante de EPO, que comprende una parte N-terminal de EPO de longitud completa que incluye la hélice A y que carece al menos de uno de los siguientes:

(i) un fragmento de al menos 10 aminoácidos entre la hélice A y la hélice B;

(ii) un fragmento de al menos 10 aminoácidos de la hélice B;

(iii) un fragmento de al menos 6 aminoácidos entre la hélice B y la hélice C;

(iv) un fragmento de al menos 10 aminoácidos de la hélice C;

(v) un fragmento de al menos 20 aminoácidos entre la hélice C y la hélice D; y/o

(vi) un fragmento de al menos 10 aminoácidos de la hélice D;

en donde dicha variante tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;

(m) polinucleótidos que codifican un derivado de un polipéptido codificado por un polinucleótido de cualquiera de (l), en donde en dicho derivado entre 1 y 10 residuos de aminoácidos están conservadoramente sustituidos comparados con dicho polipéptido, y dicho derivado tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;

(n) polinucleótidos cuya hebra complementaria hibrida en condiciones rigurosas con polinucleótidos como se han definido en cualquiera de (l) a (m) y que codifican un polipéptido que tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;

o la hebra complementaria de tal polinucleótido.

Un aspecto adicional de la presente invención es un homólogo de polinucleótidos que codifican una variante de eritropoyetina (EPO) de otra especie eucariota superior.

En un aspecto preferido el polinucleótido de la presente invención que es ADN, ADN genómico o ARN.

En otro aspecto la presente invención se refiere a un vector que contiene el polinucleótido de la presente invención. Se prefiere que el polinucleótido contenido en el vector esté operativamente unido a secuencias de control de la expresión que permitan la expresión en células huéspedes procariotas y/o eucariotas.

Otro aspecto de la invención es una célula huésped genéticamente manipulada con el polinucleótido de la presente invención o el vector de la presente invención.

Otro aspecto de la invención es un mamífero transgénico no humano seleccionado del grupo de primate no humano, caballo, bovino, oveja, cabra, cerdo, perro, gato, conejo, ratón, rata, cobaya, hámster y gerbillo que contiene un polinucleótido de la presente invención, un vector de la presente invención y/o una célula huésped de la presente invención.

Otro aspecto de la invención es un proceso para producir un polipéptido variante de EPO codificado por el polinucleótido de la presente invención que comprende: cultivar la célula huésped de la presente invención y recuperar el polipéptido codificado por dicho polinucleótido.

En una forma de realización preferida el proceso de la presente invención, comprende además el paso de modificar dicha variante de EPO, en donde la modificación se selecciona del grupo que consiste en oxidación, sulfatación, fosforilación, adición de oligosacáridos o combinaciones de las mismas.

Otro aspecto de la invención es un proceso para producir células capaces de expresar al menos una de las variantes de EPO que comprende células genéticamente manipuladas in vitro con el vector de la invención, en donde dicho(s) polipéptido(s) variante(s) de EPO está(n) codificado(s) por un polinucleótido de la invención.

Otro aspecto de la invención es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido de la presente invención u obtenible por el proceso de la presente invención.

En el contexto de la invención se divulga un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de la presente invención.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido de la presente invención, un vector de la presente invención, una célula huésped de la presente invención, un polipéptido de la presente invención y/o un anticuerpo de la presente invención y uno o más soportes farmacéuticamente aceptables.

Otro aspecto de la invención es el uso de un polinucleótido de la presente invención, un vector de la presente invención, una célula huésped de la presente invención, un polipéptido de la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una afección asociada con daño tisular debido a muerte celular, por ejemplo, apoptosis y necrosis así como por inflamación.

En un uso preferido de la presente invención la muerte celular se induce por isquemia, hipoxia, infección bacteriana, infección vírica, inducida de forma autoinmunitaria, traumática, química (por ejemplo, metabólica, tóxica), o inducida por radiación.

En un uso preferido de la presente invención la afección es un trastorno neurodegenerativo/neuroinflamatorio agudo o un trastorno neurodegenerativo/neuroinflamatorio crónico, es un trastorno agudo o crónico del corazón (por ejemplo, infarto de miocardio), pulmón (por ejemplo, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica), riñón (por ejemplo, glomerulonefritis), hígado (por ejemplo, insuficiencia hepática crónica) o páncreas (por ejemplo, pancreatitis) o dicha afección se asocia con un trasplante de órgano (por ejemplo, riñón o hígado) o de células (por ejemplo, células madre).

Preferiblemente el trastorno neurodegenerativo y/o neuroinflamatorio agudo se selecciona del grupo que consiste en isquemia o infarto cerebral incluyendo oclusión embólica y oclusión trombótica, reperusión después de isquemia aguda, lesión hipóxica-isquémica perinatal, paro cardíaco, hemorragia intracraneal, hemorragia subaracnoidea y lesiones intracraneales (por ejemplo, traumatismo del SNC), lesiones de la médula espinal, lesiones intravertebrales, síndrome del niño zarandeado, encefalitis infecciosa (por ejemplo, encefalitis por herpes), meningitis (por ejemplo, bacteriana), dolor de cabeza (por ejemplo, migrañas).

Preferiblemente el trastorno neurodegenerativo/neuroinflamatorio crónico se selecciona del grupo que consiste en demencias (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, demencias vasculares), enfermedad de Pick, enfermedad con cuerpos de Lewy difusos, parálisis supranuclear progresiva (síndrome de Steel-Richardson), esclerosis múltiple, atrofia de sistemas múltiples (incluyendo el síndrome de Shy-Drager), afecciones epilépticas crónicas asociadas con neurodegeneración, enfermedades de neuronas motoras, ataxias degenerativas, degeneración basal cortical, complejo de demencia de ELA-Parkinson de Guam, panencefalitis esclerosante subaguda, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, sinucleinopatías, afasia progresiva primaria, degeneración nigroestriatal, enfermedad de Machado-Joseph/ataxia espinocerebelar de tipo 3 y degeneraciones olivopontocerebrales, enfermedad de Gilles de La Tourette, parálisis bulbar y pseudobulbar, atrofia muscular raquídea y bulborraquídea (enfermedad de Kennedy), esclerosis lateral primaria, paraplejía espástica familiar, enfermedad de Werdnig-Hoffman, enfermedad de Kugelberg-Welander, enfermedad de Tay-Sach, enfermedad de Sandhoff, enfermedad espástica familiar, paraparesia espástica, leucoencefalopatía multifocal progresiva, disautonomía familiar (síndrome de Riley-Day), polineuropatías (por ejemplo, diabética, alcohólica-tóxica, síndrome de Guillain-Barre, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica), enfermedades por priones, adicción, trastornos afectivos (por ejemplo, depresión), trastornos esquizofrénicos, síndrome de fatiga crónica, dolor crónico (por ejemplo, lumbalgia).

En un uso preferido de la presente invención la afección es envejecimiento.

En un uso preferido de la presente invención el medicamento se administra antes de o después del inicio de dicha afección.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende el experto en la materia a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, el presente documento, incluyendo las definiciones, controlará. Los métodos y materiales preferidos se describen posteriormente, aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan mediante referencia en su totalidad. Los materiales, métodos y ejemplos divulgados en el presente documento son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

La presente invención se basa en la sorprendente observación de que variantes de EPO se expresan en tejido neuronal y la determinación que las variantes protegían las neuronas de daño inducido por privación de oxígeno y glucosa pero no mostraban actividad hematopoyética. Este comportamiento las hace adecuadas para su uso como tratamiento en situaciones donde la función hematopoyética de EPO no se requiere o es dañina. Según esto, un primer aspecto de la presente invención es un polinucleótido que codifica una variante de EPO seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) polinucleótidos que codifican la forma madura de los polipéptidos denominados hs3, h1-4, h1-5, hs4, h1-1, h2-1, mS, mG3, mG5, m301 y mK3, que tienen la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, y 22, respectivamente;

- (b) polinucleótidos que tienen la secuencia codificante, como se muestra en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, y 21, que codifican al menos la forma madura del polipéptido;
- (c) polinucleótidos que codifican una versión humanizada de los polipéptidos mS, mG3, mG5, m301 y mK3 que consisten en la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, y 22;
- 5 (d) polinucleótidos que codifican un polipéptido que comprende una fusión de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 24, 26, 28 y 30, en el extremo N, preferiblemente directamente, es decir, sin ningún aminoácido intermedio, de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 32, 34, 36 y 38, en donde dicha fusión tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora, pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;
- 10 (e) polinucleótidos que comprenden una fusión de secuencias polinucleotídicas seleccionadas del grupo de secuencias polinucleotídicas mostradas en SEQ ID NO: 23, 25, 27 y 29, en 5', preferiblemente directamente, es decir sin polinucleótidos intermedios, de una secuencia polinucleotídica seleccionada del grupo de secuencias polinucleotídicas mostradas en SEQ ID: 31, 33, 35 y 37;
- 15 (f) polinucleótidos que codifican un derivado de un polipéptido codificado por un polinucleótido de cualquiera de (a) a (e), en donde en dicho derivado entre 1 y 10 residuos de aminoácidos están conservadoramente sustituidos comparado con dicho polipéptido, y dicho derivado tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;
- 20 (g) polinucleótidos que codifican un fragmento de un polipéptido codificado por un polinucleótido de cualquiera de (a) a (f), en donde en dicho fragmento entre 1 y 10 aminoácidos se delecionan N- y/o C-terminalmente y/o entre 1 y 10 aminoácidos se delecionan N- y/o C-terminalmente de la unión comparado con dicho polipéptido, y dicho fragmento tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;
- 25 (h) polinucleótidos que son al menos el 95% idénticos a un polinucleótido como se ha definido en cualquiera de (a) a (b) y que al mismo tiempo tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética; y
- (i) polinucleótidos cuya hebra complementaria hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido como se ha definido en cualquiera de (a) a (h) y que codifica un polipéptido que tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;
- 30 o la hebra complementaria de tal polinucleótido.

La invención se refiere además a un polinucleótido que codifica una variante de EPO seleccionado del grupo que consiste en:

- 35 (a) polinucleótidos que codifican la forma madura de los polipéptidos denominados ha, hAma, hAmE, hA-10 y la secuencia ha sin líder, que tienen las secuencias de aminoácidos deducidas mostradas en SEQ ID NO: 50, 51, 52, 53 y 61, respectivamente;
- (b) polinucleótidos que tienen la secuencia codificante, como se muestra en SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58 y 61 que codifican al menos la forma madura del polipéptido;
- 40 (c) polinucleótidos que codifican un derivado de un polipéptido codificado por un polinucleótido de cualquiera de (a) a (b), en donde en dicho derivado entre 1 y 10 residuos de aminoácidos están conservadoramente sustituidos comparado con dicho polipéptido, y dicho derivado tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;
- 45 (d) polinucleótidos que codifican un fragmento de un polipéptido codificado por un polinucleótido de cualquiera de (a) a (b), en donde en dicho fragmento entre 1 y 10 aminoácidos se delecionan N- y/o C-terminalmente y/o entre 1 y 10 aminoácidos se delecionan N- y/o C-terminalmente de la unión comparado con dicho polipéptido, y dicho fragmento tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;
- 50 (e) polinucleótidos que son al menos el 95% idénticos a un polinucleótido como se ha definido en cualquiera de (a) a (b) y que al mismo tiempo tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética; y
- (f) polinucleótidos cuya hebra complementaria hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido como se ha definido en cualquiera de (a) a (e) y que codifica un polipéptido que tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;
- 55 o la hebra complementaria de tal polinucleótido.

En un aspecto adicional los polinucleótidos de la presente invención comprenden homólogos de las variantes de EPO de la presente invención derivados de otra especie eucariota superior, en particular de mamíferos, más preferiblemente de primates no humanos; de roedores, por ejemplo, rata o cobaya; rumiante, por ejemplo, vaca; u

60 oveja; caballo; cerdo; conejo; perro; o gato, que tienen actividad protectora de células y en particular neuroprotectora, pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética. En este contexto el término homólogo se refiere a un polinucleótido que codifica una variante de EPO derivado de otra especie, que comprende esencialmente la misma delección que los polinucleótidos según SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 55, 56, 57, 58 o 60. Una delección de un polinucleótido se considera que es esencialmente la misma, si implica la

65 delección de polinucleótidos que codifican un polipéptido, que es homólogo a los polipéptidos respectivamente delecionados en los polipéptidos variantes de EPO según SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 50, 51,

52, 53 o 61. Los criterios para determinar la homología entre dos secuencias peptídicas están bien establecidos. Para este fin se pueden usar programas como BLASTP. Una delección aún se considera que es esencialmente la misma si implica 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 55, 56, 57, 58 o 61 más o menos nucleótidos que la delección respectiva en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, o 21, que también se representan en las figuras 2 y 3.

Un aspecto adicional de la presente invención es un polinucleótido que codifica una variante de EPO seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) polinucleótidos que codifican un polipéptido variante de EPO, que comprende la parte N-terminal de EPO de longitud completa incluyendo la hélice A y que carece de al menos uno de los siguientes:
 - (i) un fragmento de al menos 10 aminoácidos, preferiblemente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos entre la hélice A y la hélice B;
 - (ii) un fragmento de al menos 10 aminoácidos, preferiblemente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 aminoácidos de la hélice B;
 - (iii) un fragmento de al menos 6 aminoácidos entre la hélice B y la hélice C;
 - (iv) un fragmento de al menos 10 aminoácidos, preferiblemente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, o 23, aminoácidos de la hélice C;
 - (v) un fragmento de al menos 20 aminoácidos, preferiblemente 21, 22, 23, 24, 25, 26, o 27 aminoácidos entre la hélice C y la hélice D; y/o
 - (vi) un fragmento de al menos 10 aminoácidos, preferiblemente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22 aminoácidos de la hélice D;en donde dicha variante tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética.
 - (b) polinucleótidos que codifican un derivado de un polipéptido codificado por un polinucleótido de cualquiera de (a), en donde en dicho derivado entre 1 y 10 residuos de aminoácidos están conservadoramente sustituidos comparados con dicho polipéptido, y dicho derivado tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;
 - (c) polinucleótidos cuya hebra complementaria hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido como se ha definido en cualquiera de (a) a (b) y que codifica un polipéptido que tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;
- o la hebra complementaria de tal polinucleótido.

En este contexto hélice A, B, C y D del polipéptido EPO son regiones homólogas a las respectivas regiones de hélice A, B, C y D de EPO de longitud completa de ratón y ser humano como se esboza en la figura 4. Se sabe bien en la técnica cómo determinar homologías entre dos secuencias polipeptídicas y el experto en la materia podrá alinear una secuencia polipeptídica de EPO determinada derivada, por ejemplo, de otra especie, y determinar la posición respectiva de la hélice A, B, C y D en este polipéptido EPO. Se prefiere que el polinucleótido variante de EPO derive de un eucariota superior, en particular un mamífero o un ave. Los mamíferos preferidos son seres humanos, primates no humanos; roedores, por ejemplo, rata o cobaya; rumiantes, por ejemplo, vaca; u oveja; caballo; cerdo; conejo; perro; o gato. Se conocen un gran número de tales polinucleótidos que codifican EPO de longitud completa de varias especies, incluyendo sin limitación, gato (acceso de Gene Bank L10606), cerdo (acceso de Gene Bank 10607), oveja (acceso de Gene Bank 10610), perro (acceso de Gene Bank L13027), macaco (acceso de Gene Bank M18189), mono rhesus (acceso de Gene Bank L10609), ratón (acceso de Gene Bank 12930), rata (acceso de Gene Bank L10608), ser humano (acceso de Gene Bank M11319) Bos taurus (acceso de Gene Bank U44762) y Bos indicus (acceso de Gene Bank L41354).

Preferiblemente los polinucleótidos que codifican un polipéptido variante de EPO carecen de lo siguiente: (i); (ii); (iii); (iv); (v); (vi); (i) y (ii); (i) y (iii); (i) y (iv); (i) y (v); (i) y (vi); (ii) y (iii); (ii) y (iv); (ii) y (v); (ii) y (vi); (iii) y (iv); (iii) y (v); (iii) y (vi); (iv) y (v); (iv) y (vi); (v) y (vi); (i), (ii) y (iii); (i), (ii) y (iv); (i), (ii) y (v); (i), (ii), (vi), (i), (iii) y (iv); (i), (iii) y (v); (i), (iii) y (vi); (i), (iv) y (v); (i), (iv) y (vi); (i), (v) y (vi); (ii), (iii) y (iv); (ii), (iii) y (v); (ii), (iii) y (vi); (ii), (iv) y (v); (ii), (iv) y (vi); (ii), (v) y (vi); (iii), (iv) y (v); (iii), (iv) y (vi); (iii), (v) y (vi); o (iv), (v) y (vi).

Un polipéptido que muestra actividad protectora de células es un polipéptido que tiene al menos el 50% (por ejemplo, al menos: el 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5% o 100% o incluso más) de la capacidad de la respectiva variante de EPO para proteger neuronas de daño por apoptosis, en donde la apoptosis se induce por privación de oxígeno o glucosa, por exposición química o a radiación o por infección vírica o bacteriana. En la técnica se conocen ensayos para determinar el daño a las células, en particular a las células neuronales. Un ensayo adecuado es el ensayo de privación de oxígeno y glucosa descrito en el presente documento posteriormente. En el ensayo descrito la lectura es la cantidad de actividad lactato deshidrogenasa (LDH). Sin embargo, existen una variedad de otros métodos, que permiten evaluar el daño inducido en una célula y en particular la cantidad de muerte celular (por ejemplo, apoptosis, necrosis). Estos ensayos incluyen sin limitación ensayos Tunnel, ensayo MTT, ensayo vida/muerte por tinción (por ejemplo, tinción con bromuro de etidio y naranja de acridina), ensayo de caspasa, microscopía electrónica, escalera de ADN, los cuales se conocen todos en la técnica.

Un polipéptido variante de EPO que esencialmente no muestra actividad hematopoyética es un polipéptido que produce en ensayos de formación de colonias conocidos en la técnica, un ejemplo del cual se describe posteriormente, a la misma concentración molar que rhEPO y mEPO salvaje, respectivamente, menos del 10% de la UFC-E (unidad formadora de colonias-eritoblasto), preferiblemente menos del 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1%. Los números de UFC-E respectivos se calculan para una determinada rhEPO, mEPO salvaje o variante de EPO restando de cada valor el número de UFC-E observada en una reacción control (sin salvaje o variante de EPO).

En el contexto de los polipéptidos de la presente invención el término "unión" se refiere al sitio en donde dos aminoácidos siguen uno a otro que no son consecutivos en rhEPO o EPO salvaje de ratón y que son potencialmente el resultado de sucesos de ajuste u otras reorganizaciones en el ARNm de EPO. La unión respectiva en las variantes de EPO de la presente invención se pueden derivar de la figura 4, por ejemplo es ENIT|VGQQ para hS3, VGQQ|ALLV para h1-4, VNFY|ALLV para h1-5, KRME|PWEF para hS4, ITVP|GPVG para h1-1, LNEN|NHC para h2-1, KRME|KELM para mS, LLAN|FLRG para mG3, DTFC|RRGD para mG5, KVNF|LRGK para m301 o LSEA|VHGR para mK3.

Las moléculas de polinucleótidos de la invención se pueden sintetizar *in vitro* (por ejemplo, mediante síntesis basada en fosforamidita) o se pueden obtener de una célula, tal como la célula de un mamífero.

Las variantes de EPO denominadas mS, mG3, mG5, m301 y mK3 que tienen la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en SEQ ID NO 14, 16, 18, 20 y 22, respectivamente se aislaron de ratón. La secuencia de ratón es altamente homóloga a la secuencia humana. Se proporciona un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de EPO derivada de seres humanos y ratón en la figura 4. Como es aparente la secuencia de ratón se distingue de la secuencia humana por la falta de un residuo de alanina en la posición 8 y por las siguientes 39 sustituciones (la numeración es según la respectiva posición de aminoácido en la EPO humana, el primer aminoácido indicado es el aminoácido humano en esa posición y el segundo es el correspondiente aminoácido de ratón): ⁴H → ⁴P, ⁶C → ⁶R, ⁹W → ⁹T, ¹¹W → ¹¹L, ¹⁸S → ¹⁸L, ¹⁹L → ¹⁹I, ²⁷G → ²⁷C, ⁴³L → ⁴³I, ⁵²I → ⁵²V, ⁵⁴T → ⁵⁴M, ⁶⁰H → ⁶⁰G, ⁶¹C → ⁶¹P, ⁶²S → ⁶²R, ⁶⁴N → ⁶⁴S, ⁸⁴G → ⁸⁴E, ⁸⁵Q → ⁸⁵E, ⁹⁵A → ⁹⁵S, ¹⁰¹V → ¹⁰¹I, ¹⁰³R → ¹⁰³Q, ¹⁰⁴G → ¹⁰⁴A, ¹⁰⁹V → ¹⁰⁹A, ¹¹⁵W → ¹¹⁵P, ¹¹⁷P → ¹¹⁷T, ¹²²V → ¹²²I, ¹²⁶V → ¹²⁶L, ¹³⁴T → ¹³⁴S, ¹³⁸A → ¹³⁸V, ¹⁴⁵A → ¹⁴⁵L, ¹⁴⁶I → ¹⁴⁶M, ¹⁵¹A → ¹⁵¹T, ¹⁵²A → ¹⁵²T, ¹⁵³S → ¹⁵³P, ¹⁵⁴A → ¹⁵⁴P, ¹⁶⁰I → ¹⁶⁰L, ¹⁶²A → ¹⁶²V, ¹⁶⁶R → ¹⁶⁶C, ¹⁷³S → ¹⁷³A, ¹⁸⁷A → ¹⁸⁷V y ¹⁹⁰T → ¹⁹⁰R. Una mS, mG3, mG5, m301 o mK3 humanizada tiene el residuo de alanina adicional en la posición 8 y/o en una o más preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 o 37 posiciones la secuencia de aminoácidos humana mejor que la de ratón. Es particularmente preferido que mS, mG3, mG5, m301 y mK3 estén completamente humanizadas, es decir, que cada aminoácido en las posiciones mostradas anteriormente, en tanto que estén presentes en la respectiva variante, sea de la secuencia humana más que de la secuencia de ratón. Se espera que la humanización de las variantes de ratón disminuya cualquier problema inmunológico, que se pudiera encontrar cuando se usa en el tratamiento de seres humanos.

Las moléculas de ácido nucleico variantes de EPO de la invención pueden ser ADN, ADNc, ADN genómico, ADN sintético, o ARN, y pueden ser bicatenarias o monocatenarias y/o una hebra antisentido. Estas moléculas se pueden producir mediante, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o generar por tratamiento con una o más endonucleasas de restricción. Se puede producir una molécula de ácido ribonucleico (ARN) mediante transcripción *in vitro*.

Las moléculas de polinucleótidos de la invención pueden contener secuencias naturales o secuencias que se diferencian de las naturales pero, debido a la degeneración del código genético, codifican el mismo polipéptido, es decir, los polipéptidos con SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22. Además, estas moléculas de ácido nucleico no están limitadas a secuencias codificantes, por ejemplo, pueden incluir algo o todo de las secuencias no codificantes que están antes o después de la secuencia codificante.

Además, las moléculas de ácido nucleico aisladas de la invención pueden abarcar segmentos que no se encuentran como tales en el estado natural. Por tanto, la invención abarca moléculas de ácido nucleico recombinantes incorporadas en un vector (por ejemplo, un vector plasmídico o vírico) o en el genoma de una célula heteróloga (o el genoma de una célula homóloga, en una posición diferente de la localización cromosómica natural). Las moléculas de ácido nucleico recombinantes y los usos de las mismas se discuten posteriormente.

En formas de realización preferidas los polinucleótidos de la presente invención también comprenden moléculas de ácido nucleico que son al menos el 95%, preferiblemente el 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a: (a) una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 50, 51, 52, 53 o 61 y (b) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 55, 56, 57, 58 o 60 respectivamente y que al mismo tiempo tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se logra usando el algoritmo matemático de Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877. Tal algoritmo se incorpora en los programas BLASTN y BLASTP de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410. Las búsquedas de nucleótidos con BLAST se

realizan con el programa BLASTN, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a los ácidos nucleicos que codifican el polipéptido variante de EPO. Las búsquedas de proteínas con BLAST se realizan con el programa BLASTP, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas al polipéptido variante de EPO, respectivamente. Para obtener alineamientos con huecos para fines comparativos, se utiliza Gapped BLAST como se describe en Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se usan los parámetros por defecto de los respectivos programas.

También se puede usar la hibridación como una medida de la homología entre dos secuencias de ácidos nucleicos.

Una secuencia de ácido nucleico que codifica cualquiera de las variantes de EPO divulgadas en el presente documento, o un derivado o fragmento de las mismas, se puede usar como una sonda de hibridación según técnicas de hibridación estándar. La hibridación de una sonda de variante de EPO con ADN o ARN de una fuente de prueba (por ejemplo, una célula de mamífero) es una indicación de la presencia del ADN o ARN de EPO relevante en la fuente de prueba. Las condiciones de hibridación las conocen los expertos en la materia y se pueden encontrar en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y., 6.3.1-6.3.6, 1991. Las condiciones rigurosas se definen como equivalentes a hibridación en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6X a 45°C, seguido por un lavado en SSC 0,2X, SDS al 0,1% a 65°C. Cuando se selecciona una sonda específica para una variante que tiene una delección interna se prefiere que la sonda usada para detectar ácidos nucleicos homólogos se superponga a los límites de la delección, por ejemplo, hs3, hi -4, hi -5, hs4, mS, mG3, mG5 o m301. En casos donde el ajuste produce un extremo C alternativo de la proteína, por ejemplo, hi -1, h2-I o mK3 se prefiere que la sonda usada para detectar secuencias de ADN homólogas se superponga a los límites entre la secuencia de EPO conocida y el extremo C alternativo. Por ejemplo, se podría diseñar una sonda que comprenda 10 bases complementarias 5' de sitio de ajuste y 10 bases complementarias 3' del sitio de ajuste.

Un "ADN aislado" es bien (1) un ADN que contiene una secuencia no idéntica a la de cualquier secuencia natural, o (2) en el contexto de un ADN con una secuencia natural (por ejemplo, un ADNc o ADN genómico), un ADN libre de al menos uno de los genes que flanquean el gen que contiene el ADN de interés en el genoma del organismo en el que el gen que contiene el ADN de interés se produce de forma natural. Por tanto, el término incluye un ADN recombinante incorporado a un vector, en un plásmido o virus de replicación autónoma, o en el ADN genómico de un procariota o eucariota. El término también incluye una molécula separada tal como un ADNc donde el ADN genómico correspondiente tiene intrones y por tanto una secuencia diferente; un fragmento genómico que carece al menos de uno de los genes flanqueantes; un fragmento de ADNc o ADN genómico producido por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y que carece de al menos uno de los genes flanqueantes; un ADN que codifica una proteína no natural tal como una proteína de fusión, muteína, o fragmento de una proteína determinada; y un ácido nucleico que es una variante degenerada de un ADNc o un ácido nucleico natural. Además, incluye una secuencia de nucleótidos recombinante que es parte de un gen híbrido, es decir, un gen que codifica una proteína de fusión no natural. A partir de lo anterior será aparente que el ADN aislado no significa un ADN presente entre de cientos a millones de otras moléculas de ADN en, por ejemplo, genotecas de ADNc o ADN genómico o digeridos de restricción de ADN genómico en, por ejemplo, una mezcla de reacción de digerido de restricción o un trozo de gel electroforético.

Un aspecto adicional de la presente invención es un vector que contiene el/los polinucleótido(s) de la presente invención o una proteína codificada por un polinucleótido de la presente invención. El término "vector" se refiere a una proteína o un polinucleótido o una mezcla de los mismos que es capaz de ser introducida o de introducir las proteínas y/o ácidos nucleicos comprendidos en una célula. Se prefiere que las proteínas codificadas por el polinucleótido introducido se expresen en la célula tras la introducción del vector.

En una forma de realización preferida el vector de la presente invención comprende plásmidos, fagémidos, fagos, cósmidos, cromosomas artificiales de mamíferos, construcciones de knock-out o knock-in, virus, en particular adenovirus, virus vaccinia, virus vaccinia atenuados, virus de la viruela del canario, lentivirus (Chang, L.J. y Gay, E.E. (20001) *Curr. Gene Therap.* 1:237-251), virus del herpes, en particular virus del Herpes simple (HSV-1, Carlezon, W.A. et al. (2000) *Crit. Rev. Neurobiol.*), baculovirus, retrovirus, virus adenoasociados (AVV, Carter, P.J. y Samulski, R.J. (2000) *J. Mol. Med.* 6:17-27), rinovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), filovirus y versiones manipuladas de los mismos (véase, por ejemplo, Cobinger G. P. et al (2001) *Nat. Biotechnol.* 19:225-30), virosomas, liposomas de ADN "desnudo", y partículas de ácido nucleico recubiertas, en particular esferas de oro. Particularmente preferidos son los vectores víricos como vectores adenovíricos o vectores retrovíricos (Lindemann et al. (1997) *Mol. Med.* 3:466-76 y Springer et al. (1998) *Mol. Cell.* 2:549-58). Los liposomas habitualmente son vesículas pequeñas unilamelares o multilamelares hechas de lípidos catiónicos, neutros y/o aniónicos, por ejemplo, por tratamiento de ultrasonido de suspensiones de liposomas. El ADN puede, por ejemplo, estar unido iónicamente a la superficie de los liposomas o internamente encerrado en el liposoma. Las mezclas de lípidos adecuadas se conocen en la técnica y comprenden, por ejemplo, DOTMA (bromuro de 1,2-dioleiloxpropil-3-trimetilamonio) y DPOE (dioleilfosfatidil-etanolamina) que ambos se han usado en una variedad de líneas celulares.

Las partículas de ácidos nucleicos recubiertas son otro medio para la introducción de ácidos nucleicos en células usando los llamados "cañones génicos", que permiten la introducción mecánica de partículas en las células.

Preferiblemente las partículas mismas son inertes, y por tanto, están en una forma de realización preferida hechas de esferas de oro.

En un aspecto adicional el polinucleótido de la presente invención está operativamente unido a secuencias de control de la expresión que permiten la expresión en células huésped procariotas y/o eucariotas. Los elementos reguladores transcripcionales/traduccionales referidos anteriormente incluyen, pero no están limitados a, promotores inducibles y no inducibles, constitutivos, regulados por el ciclo celular, metabólicamente regulados, potenciadores, silenciadores, represores y otros elementos que conocen los expertos en la materia y que dirigen o regulan de otra manera la expresión génica. Tales elementos reguladores incluyen, pero no están limitados a, elementos reguladores que dirigen la expresión constitutiva como, por ejemplo, promotores transcritos por la ARN polimerasa III como, por ejemplo, promotores para el gen del ARNnp U6 o del ARNcp 7SK, el gen inmediato temprano del citomegalovirus hCMV, los promotores tempranos o tardíos del adenovirus SV40, el promotor vírico y secuencias activadoras derivadas de, por ejemplo, NBV, HCV, HSV, HPV, EBV, HTLV, MMTV o VIH; que permiten expresión inducible como, por ejemplo, el promotor CUP-1, el represor tet como se emplea, por ejemplo, en los sistemas tet-on o tet-off, el sistema lac, el sistema trp; elementos reguladores que dirigen expresión específica de tejido, preferiblemente expresión específica de células nerviosas, por ejemplo, promotor (por ejemplo, Thy-1.2, NSE, cadena ligera de la miosina II, tirosina hidroxilasa, promotor de CaMKIIalfa, factor de crecimiento derivado de plaquetas cadena beta (PDGF), dopamina beta-hidroxilasa, Tau, elementos reguladores (por ejemplo, NRSE/RE-1; elemento silenciador restrictivo de neuronas/elemento represor 1) que dirigen expresión específica del ciclo celular como, por ejemplo, cdc2, cdc25C o ciclina A; o el sistema TAC, el sistema TRC, las regiones operador y promotor principales del fago A, las regiones de control de la proteína de cubierta fd, el promotor para la 3-fosfoglicerato quinasa, los promotores de fosfatasa ácida, y los promotores de los factores de apareamiento α o β de levaduras.

Como se usa en el presente documento, "operativamente unido" significa incorporado en una construcción genética de modo que las secuencias de control de la expresión controlen eficazmente la expresión de una secuencia codificante de interés.

Similarmente, los polinucleótidos de la presente invención pueden formar parte de un híbrido que codifica secuencias polipeptídicas adicionales, por ejemplo, una secuencia que codifica una proteína que funciona como un marcador o indicador. El gen híbrido puede producir una proteína de fusión o las dos o más partes pueden estar separadas por una secuencia de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), lo que produce la expresión de dos o más proteínas separadas. Los ejemplos de genes marcadores e indicadores incluyen β -lactamasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), adenosina desaminasa (ADA), aminoglicósico fosfotransferasa (neo^r, G418^r), dihidrofolato reductasa (DHFR), higromicina-B-fosfotransferasa (HPH), timidina quinasa (TK), LacZ (que codifica β -galactosidasa), proteína fluorescente verde (GFP) y variantes de la misma y xantina guanina fosforribosiltransferasa (XGPR). Como con muchos de los procedimientos estándar asociados con la práctica de la invención, los expertos en la materia conocen reactivos útiles adicionales, por ejemplo, secuencias adicionales que pueden servir la función de un marcador o indicador. Si la expresión del gen híbrido produce un polipéptido, el polipéptido híbrido habitualmente incluirá una primera parte y una segunda parte; la primera parte es un polipéptido variante de EPO y la segunda parte es, por ejemplo, el indicador descrito anteriormente o una región constante de Ig o parte de una región constante de Ig, por ejemplo, los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG2a. Otros híbridos podrían incluir una secuencia peptídica heteróloga para facilitar la purificación y/o la detección, por ejemplo, una etiqueta antigénica como, por ejemplo, una etiqueta myc, o una etiqueta con unión preferencial a una región, por ejemplo, etiqueta de quitina o etiqueta de His. Las moléculas de ácido nucleico recombinantes también pueden contener una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido variante de EPO operativamente unido a una secuencia señal heteróloga. Tales secuencias señal pueden dirigir la proteína a diferentes compartimentos en la célula y los conocen bien los expertos en la materia. Una secuencia señal preferida es una secuencia que facilita la secreción de la proteína resultante. Preferiblemente estas secuencias señal y/o etiqueta se diseñan de modo que se puedan cortar de la variante de EPO después de la purificación para proporcionar una proteína esencialmente pura sin demasiados aminoácidos, preferiblemente no más de 10 aminoácidos adicionales a la EPO final. Tales sitios de corte se conocen bien en la técnica y comprenden, por ejemplo, sitios de corte de endopeptidasas y sitios de corte de inteínas.

Otro aspecto de la presente invención es una célula huésped genéticamente manipulada con el polinucleótido o el vector como se ha explicado anteriormente. Las células huéspedes que se pueden usar para los fines de la invención incluyen, pero no están limitadas a células procariotas tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*), que se pueden transformar con, por ejemplo, vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinantes, ADN de plásmido, o ADN de cósmido que contienen las moléculas de polinucleótidos de la invención; células eucariotas simples como levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces* y *Pichia*), que se pueden transformar con, por ejemplo, vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen la molécula de polinucleótido de la invención; sistemas de células de insecto, por ejemplo, células Sf9 o Hi5, que se pueden infectar con, por ejemplo, vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las moléculas de polinucleótido de la invención; ovocitos de *Xenopus*, que se pueden inyectar con, por ejemplo, plásmidos; sistemas de células vegetales, que se pueden infectar con, por ejemplo, vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, el virus del mosaico de la coliflor (CaMV) o el virus del mosaico del tabaco (TMV)) o transformar con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, el plásmido Ti) que contiene una secuencia de nucleótidos de variante de EPO; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO,

BHK, HEK293, VERO, HeLa, MDCK, Wi38, Swiss 3T3 y NIH 3T3), que se pueden transformar con construcciones de expresión recombinantes que contienen, por ejemplo, promotores derivados, por ejemplo, del genoma de células de mamífero (por ejemplo, el promotor de metalotioneína) de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus, CMV IE y el promotor 7.5K del virus vaccinia) o de células bacterias (por ejemplo, se emplea la unión del represor a tet en los sistemas tet-on y tet-off). También son útiles como células huésped células primarias o secundarias obtenidas directamente de un mamífero y transfectadas con un vector plasmídico o infectadas con un vector vírico. Dependiendo de la célula huésped y del vector respectivo usado para introducir el polinucleótido de la invención, el polinucleótido se puede integrar, por ejemplo, en el cromosoma o el ADN mitocondrial o se puede mantener extracromosómico como, por ejemplo, episomal o puede estar solo transitoriamente comprendido en las células.

Puesto que la EPO está fuertemente glicosilada in vivo es deseable elegir un sistema de expresión que proporcione glicosilación fiel de la proteína. Consecuentemente, se prefiere introducir los polinucleótidos que codifican las variantes de trozos de EPO de la presente invención en células eucariotas superiores, en particular en células de mamífero, por ejemplo, células COS, CHO, BHK, HEK293, VERO, HeLa, MDCK, Wi38, Swiss 3T3 o NIH 3T3.

Un aspecto más de la presente invención es un mamífero transgénico no humano que contiene un polinucleótido, un vector y/o una célula huésped como se ha descrito anteriormente. El animal puede ser un animal mosaico, que significa que solo parte de las células que hacen el cuerpo comprenden los polinucleótidos, vectores y/o células de la presente invención o el mamífero puede ser un animal transgénico que significa que todas las células del animal comprenden los polinucleótidos y/o vectores de la presente invención o derivan de una célula de la presente invención. Los animales mosaico o transgénicos pueden ser homo o heterocigotos con respecto a los polinucleótidos de la presente invención contenidos en la célula. En una forma de realización preferida los animales transgénicos con animales homo o heterocigotos knock-out o knock-in con respecto a los genes que codifican las proteínas de la presente invención. El mamífero se selecciona del grupo de primate no humano, caballo, bovino, oveja, cabra, cerdo, perro, gato, cabra, conejo, ratón, rata, cobaya, hámster y gerbillo.

Otro aspecto de la presente invención es un proceso para producir un polipéptido variante de EPO codificado por un polinucleótido de la presente invención que comprende: cultivar la célula huésped descrita anteriormente y recuperar el polipéptido codificado por dicho polinucleótido. Las combinaciones preferidas de células huésped y vectores se exponen anteriormente y combinaciones adicionales serán aparentes sin problemas para el experto en la materia. Dependiendo del uso posterior pretendido del péptido deseado, se puede elegir un tipo de célula adecuado. Como se ha expuesto anteriormente se eligen preferiblemente células eucariotas, si se desea que las proteínas producidas por las células muestren un patrón esencialmente natural de glicosilación y se eligen células procariotas si, por ejemplo, la glicosilación u otras modificaciones, que normalmente se introducen en proteínas solo en células eucariotas, no se desean o no se necesitan.

Se sabe en el estado de la técnica que la farmacocinética de los fármacos proteicos se puede alterar significativamente por modificación de la proteína. Para la EPO de longitud completa se ha descrito que la glicosilación, en particular la presencia de residuos de ácido siálico en el extremo de las cadenas laterales de oligosacáridos se aplica al tiempo de circulación (documento WO 95/05465) y que la eliminación de los grupos de ácido siálico expone los residuos de galactosa, que aumenta la depuración por el hígado. Por tanto, un planteamiento tomado para aumentar el tiempo de circulación de EPO fue el aumento en los residuos de ácido siálico. Por tanto, varios planteamientos implican el suministro de sitios de glicosilación adicionales (véase, por ejemplo, los documentos WO 91/05867, WO 94/09257 y WO 01/81405. Tales análogos de EPO modificados pueden tener al menos una cadena glucídica N-unida y/o O-unida adicional. Otros intentos para mejorar la semivida de EPO implicaban la adición de residuos de polietilenglicol (PEG) de longitud variable al esqueleto de aminoácidos (véase, por ejemplo, los documentos WO 00/32772, WO 01/02017 y WO 03/02921. Otro intento usó la modificación de moléculas de EPO con al menos un oligosacárido N-unido y/o O-unido que se modificaron adicionalmente con oxidación, sulfatación, fosforilación, PEGilación o una combinación de las mismas (véase el documento WO 2005/025606). Todos estos planteamientos se pueden usar igualmente para extender la semivida de las variantes de EPO de la presente invención y según esto en una forma de realización preferida el proceso anterior comprende además el paso de modificar la variante de EPO, en donde la modificación se selecciona del grupo que consiste en oxidación, sulfatación, fosforilación, adición de oligosacáridos o combinaciones de las mismas. Si se desea la adición de oligonucleótidos N-unidos u O-unidos adicionales es posible introducirlos introduciendo sitios de glicosilación adicionales como se ha descrito en el estado de la técnica, por ejemplo, en las posiciones 30, 51, 57, 69, 88, 89, 136 y/o 138, si la posición respectiva está presente en la variante de la presente invención (véase el documento WO 01/81405).

Un aspecto adicional de la invención es un proceso para producir células capaces de expresar al menos una de las variantes de EPO que comprende manipular células genéticamente *in vitro* con el vector de la reivindicación 3 o 4, en donde dicho(s) polipéptido(s) variante(s) de EPO está(n) codificado(s) por un polinucleótido de la presente invención.

Otro aspecto de la invención es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido de la invención u obtenible por el proceso mencionado anteriormente. Los polipéptidos de la invención

incluyen todos esos divulgados en el presente documento y fragmentos de estos polipéptidos, que tienen entre 1 y 10 delecciones N- y/o C-terminales. Preferiblemente, las delecciones son menos de 10, menos de 9, menos de 8, menos de 7, menos de 6, menos de 5, menos de 4, menos de 3, menos de 2, menos de 1 aminoácidos. Los polipéptidos abarcados por la invención también incluyen proteínas de fusión que contienen o bien las variantes de partes de EPO como se indica en SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22 o versiones humanizadas de 14, 16, 18, 20 y 22 o un fragmento de las mismas como se ha definido anteriormente fusionado a una secuencia de aminoácidos no relacionada. Las secuencias no relacionadas pueden comprender dominios funcionales o péptidos señal adicionales. Los péptidos señal se describen en mayor detalle y se ejemplifican posteriormente.

Los polipéptidos pueden ser cualquiera de los descritos anteriormente pero con no más de 10 (por ejemplo, no más de: 10, nueve, ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos o uno) sustituciones conservadoras. Las sustituciones conservadoras se conocen en la técnica y típicamente incluyen la sustitución de, por ejemplo, un aminoácido polar con otro aminoácido polar y un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido. Según esto, las sustituciones conservadoras preferiblemente incluyen sustituciones en los siguientes grupos de aminoácidos: glicina, alanina, valina, prolina, isoleucina y leucina (cadena lateral no polar alifática); ácido aspártico y ácido glutámico (cadena lateral negativamente cargada); asparraguina, glutamina, metionina, cisteína, serina y treonina (cadena lateral no cargada polar); lisina, histidina y arginina; y fenilalanina, triptófano y tirosina (cadena lateral aromática); y lisina, arginina e histidina (cadena lateral cargada positivamente). Se sabe bien en la técnica cómo determinar el efecto de una sustitución determinada, por ejemplo, sobre el pK_i etc. Todo lo que se requiere de un polipéptido que tiene una o más sustituciones conservadoras es que tenga al menos el 50% (por ejemplo, al menos: el 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5% o el 100% o más) de la capacidad de la variante de EPO inalterada para proteger neuronas de daño/muerte celular (por ejemplo, por apoptosis o necrosis), en donde la muerte celular se induce por privación de oxígeno y/o glucosa, por exposición tóxica, química, física, mecánica, inflamatoria o radiación o por infección bacteriana o vírica.

Tanto polipéptidos como péptidos se pueden producir por técnicas de ADN recombinante *in vitro* estándar y transgénesis *in vivo*, usando secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos o péptidos apropiados. Se pueden usar métodos que conocen bien los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes relevantes y señales de control transcripcional/traduccionales apropiadas. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Ed.) [Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989], y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* [Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989].

Los polipéptidos y fragmentos de la invención también incluyen los descritos anteriormente, pero modificados para su uso *in vivo* mediante la adición, en los extremos amino y/o carboxilo terminales, de agentes bloqueantes para facilitar la supervivencia del polipéptido relevante *in vivo*. Esto puede ser útil en esas situaciones en las que los extremos del péptido tienden a ser degradados por proteasas antes de la captación celular. Tales agentes bloqueantes pueden incluir, sin limitación, secuencias peptídicas adicionales relacionadas o sin relacionar que se pueden unir a los residuos amino y/o carboxilo terminales del péptido que se va a administrar. Esto se puede hacer bien químicamente durante la síntesis del péptido o por tecnología de ADN recombinante por métodos familiares a los expertos en la materia.

Alternativamente, los agentes bloqueantes tales como ácido piroglutámico u otras moléculas conocidas en la técnica se pueden unir a los residuos amino y/o carboxilo terminales, o el grupo amino en el extremo amino o el grupo carboxilo en el extremo carboxilo se pueden sustituir con una fracción diferente. Asimismo, los péptidos se pueden acoplar de forma covalente o no covalente a proteínas "soporte" farmacéuticamente aceptables antes de la administración.

El término polipéptido o fragmento peptídico "aislado" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido o fragmento peptídico que no tiene equivalente natural o se ha separado o purificado de componentes que lo acompañan de forma natural, por ejemplo, en tejidos tales como lengua, páncreas, hígado, bazo, ovario, testículo, músculo, tejido conjuntivo, tejido neural, tejido gastrointestinal o tejido tumoral, o líquidos corporales, tales como sangre, suero u orina. Típicamente, el polipéptido o fragmento peptídico se considera "aislado" cuando está al menos el 70%, en peso seco, libre de las proteínas y otras moléculas orgánicas naturales con las que se asocia de forma natural. Preferiblemente, una preparación de un polipéptido (o fragmento peptídico del mismo) de la invención es al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 90%, y lo más preferiblemente al menos el 99%, en peso seco, el polipéptido (o el fragmento peptídico del mismo), respectivamente, de la invención. Por tanto, por ejemplo, una preparación del polipéptido x es al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 90%, y lo más preferiblemente al menos el 99%, en peso seco, el polipéptido x. Puesto que un polipéptido que se sintetiza químicamente está, por su naturaleza, separado de los componentes que los acompañan de forma natural, el polipéptido sintético está "aislado".

Un polipéptido (o fragmento peptídico) aislado de la invención se puede obtener, por ejemplo, por extracción de una fuente natural (por ejemplo, de tejidos o líquidos corporales); por expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica el polipéptido; o por síntesis química. Un polipéptido que se produce en un sistema celular diferente de la

fuelle de la que se origina naturalmente está “aislado”, porque necesariamente estará libre de los componentes que lo acompañan naturalmente. El grado de aislamiento o pureza se puede medir por cualquier método apropiado, por ejemplo, cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida, o análisis de HPLC.

En el contexto de la invención se divulga un anticuerpo, que específicamente se une al polipéptido variante de EPO codificado por los polinucleótidos de la invención u obtenible por el proceso mencionado anteriormente. El término “anticuerpo” comprende anticuerpos monoclonales y policlonales y fragmentos de unión de los mismos, en particular, fragmentos Fc así como los denominados “anticuerpos de cadena única” (Bird R. E. et al (1988) Science 242:423-6), anticuerpo quiméricos, humanizados, en particular con CDR injertadas, y dímeros o tetrámeros (Holliger P. et al (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-8). También están comprendidas proteínas similares a inmunoglobulinas que se seleccionan mediante técnicas que incluyen, por ejemplo, presentación en fagos para unirse específicamente a los polipéptidos de la presente invención. En este contexto, el término “unión específica” se refiere a anticuerpos producidos contra péptidos derivados de uniones de ajuste o uniones creadas por otros procesos, por ejemplo, ENIT|VGQQ de hS3, VGQQ|ALLV de h1-4, VNFY|ALLV de h1-5, KRME|PWEF de hS4, ITVP|GPVG de h1-1, LLEN|NHC de h2-1, KRME|KELM de mS, LLAN|FLRG de mG3, DTFC|RRGD de mG5, KVNF|LRGK de m301 o LSEA|VHGR de mK3. Tales péptidos pueden comprender aminoácidos N- o C-terminales adicionales o menos. Se considera que un anticuerpo es específico para una variante de EPO, si su afinidad hacia la variante es al menos 50 veces mayor, preferiblemente 100 veces mayor, más preferiblemente al menos 1000 veces mayor que hacia la EPO humana o murina de longitud completa. Preferiblemente, los anticuerpos específicos de la presente invención no o esencialmente no se unen a EPO humana o murina de longitud completa. Se sabe bien en la técnica cómo hacer anticuerpos y seleccionar anticuerpos con una especificidad determinada.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de un polinucleótido, un vector, una célula huésped o un polipéptido de la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una afección asociada con daño tisular debido a muerte celular (por ejemplo, apoptosis y necrosis). La apoptosis o necrosis produce la destrucción celular, que se puede prevenir o mejorar cuando se usa el polinucleótido, vector, célula huésped o polipéptido de la presente invención. La muerte celular puede estar inducida por muchos estímulos internos o externos diferentes e incluye preferiblemente isquemia, hipoxia, infección bacteriana o vírica, radiación o inducida por estímulos metabólicos, tóxicos, químicos, autoinmunológicos o traumáticos. En la técnica se sabe bien como detectar la muerte celular como, por ejemplo, usando criterios morfológicos, un ensayo TUNNEL, ensayo MTT, ensayo de vida/muerte por tinción (por ejemplo, tinción con bromuro de etidio y naranja de acridina), ensayo de caspasa, microscopía electrónica, escalera de ADN o el ensayo de liberación de LDH descrito posteriormente. Por ejemplo, la apoptosis se caracteriza por fragmentación de la cromatina, extravasación de contenidos celulares y por último la muerte de la célula. Se ha reconocido que desempeña un papel en muchos procesos patológicos agudos o crónicos. Según esto, un uso preferido de la presente invención comprende la administración de polinucleótidos, vectores, células huésped o polipéptidos de la presente invención, para prevenir, tratar o mejorar trastornos neurodegenerativos o neuroinflamatorios agudos y crónicos, un trastorno agudo o crónico del corazón (por ejemplo, infarto de miocardio), pulmón (por ejemplo, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica), riñón (por ejemplo, glomerulonefritis), hígado (por ejemplo, insuficiencia hepática crónica) o páncreas (por ejemplo, pancreatitis) así como afecciones asociadas con un trasplante de células (por ejemplo, células madre) o de órgano (por ejemplo, riñón o hígado). En este respecto también se prevé que las variantes de EPO de la presente invención puedan estar incluidas en soluciones de almacenamiento usadas para almacenar órganos o miembros para el transporte y/o después de una lesión traumática.

Los trastornos neurodegenerativos agudos incluyen, pero no están limitados a, varios tipos de trastornos neurodegenerativos agudos asociados con muerte celular neuronal incluyendo insuficiencia cerebrovascular, traumatismo cerebral focal o difuso, daño cerebral difuso y lesión de la médula espinal. Los ejemplos de trastornos neurodegenerativos agudos son: isquemia o infarto cerebral incluyendo oclusión embólica y oclusión trombótica, reperfusión después de isquemia aguda, lesión hipóxica-isquémica perinatal, paro cardíaco, así como hemorragia intracraneal de cualquier tipo (tales como epidural, subdural, subaracnoidea e intracerebral), lesiones intracraneales e intravertebrales (tal como contusión, penetración, cizalla, compresión y laceración), síndrome del niño zarandeado, encefalitis infecciosa (por ejemplo, encefalitis por herpes), meningitis (por ejemplo, bacteriana), dolor de cabeza (por ejemplo, migrañas).

Los trastornos neurodegenerativos crónicos que se pueden tratar con las variantes de EPO de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, demencias (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, demencias vasculares), enfermedad de Pick, enfermedad de cuerpos de Lewy difusos, parálisis supranuclear progresiva (síndrome de Steel-Richardson), esclerosis múltiple, atrofia de sistemas múltiples (incluyendo el síndrome de Shy-Drager), afecciones epilépticas crónicas asociadas con neurodegeneración, enfermedades de neuronas motoras incluyendo esclerosis lateral amiotrófica, ataxias degenerativas, degeneración basal cortical, complejo de demencia de ELA-Parkinson de Guam, panencefalitis esclerosante subaguda, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, sinucleinopatías (incluyendo atrofia de sistemas múltiples), afasia progresiva primaria, degeneración nigroestriatal, enfermedad de Machado-Joseph/ataxia espinocerebelar de tipo 3 y degeneraciones olivopontocerebrales, enfermedad de Gilles de La Tourette, parálisis bulbar y pseudobulbar, atrofia muscular raquídea y bulborraquídea (enfermedad de Kennedy), esclerosis lateral primaria, paraplejía espástica familiar, enfermedad de Werdnig-Hoffman, enfermedad de Kugelberg-Welander, enfermedad de Tay-Sach, enfermedad de Sandhoff, enfermedad

espástica familiar, paraparesia espástica, leucoencefalopatía multifocal progresiva, disautonomía familiar (síndrome de Riley-Day), enfermedades por priones (incluyendo, pero no limitadas a enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Gertsmann-Strussler-Scheinker, Kuru e insomnio familiar letal), polineuropatías (por ejemplo, diabética, alcohólica-tóxica, síndrome de Guillain-Barre, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica), enfermedades por priones, adicción, trastornos afectivos (por ejemplo, depresión), trastornos esquizofrénicos, síndrome de fatiga crónica, dolor crónico (por ejemplo, lumbalgia).

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de un polinucleótido, un vector, una célula huésped o un polipéptido de la presente invención para la fabricación de un medicamento antienviejecimiento. La base para esta aplicación de la variantes de EPO de la presente invención es el hecho de que el deterioro progresivo de la mayoría de la funciones corporales, que acompaña al envejecimiento, se ha asociado con la muerte celular y, por tanto, se prevé que las variantes de EPO de la presente invención, que solo proporcionan el efecto beneficioso protector de células se pueden tomar continuamente sin padecer los efectos secundarios habitualmente asociados con la administración continua de EPO que, sin embargo, se pueden atribuir al efecto eritropoyético de EPO.

Los inventores han encontrado increíblemente que los ácidos nucleicos y proteínas según la invención poseen propiedades antiinflamatorias asombrosas (véanse las figuras y los experimentos). Por tanto, estas variantes de EPO son útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y degenerativas. Las enfermedades inflamatorias son enfermedades tales como, pero no limitadas a esclerosis múltiple, infecciones bacterianas y víricas o septicemia. Las enfermedades degenerativas son enfermedades tales como, pero no limitadas a, ictus, infartos de miocardio.

La invención también se refiere a todo tipo de formas de expresión in vivo de los ácidos nucleicos según la invención. Se refiere además a células transformadas, en particular células madre que se usan como agentes terapéuticos. Tales células se pueden transformar de forma estable con un ácido nucleico según la invención. El ácido nucleico puede estar en un casete donde está operativamente unido a un promotor. El promotor puede ser capaz de dirigir la expresión solo en tejidos particulares, tales como, pero no limitados a, tejido neuronal o el cerebro o tejido que muestra inflamación o degeneración. Se puede tomar la enseñanza respectiva del documento WO 97/14307.

La actividad (en unidades) del polipéptido de EPO tradicionalmente se define basado en su eficacia en estimular la producción de glóbulos rojos en modelos de roedores (y derivada por estándares internacionales de EPO). Una unidad (U) de EPO regular (MW de aproximadamente 34.000) es aproximadamente 10 ng de proteína (1 mg de proteína es aproximadamente 100.000 U). Sin embargo, como se ha mencionado la invención implica el uso de formas no hematopoyéticas de eritropoyetina, y como tal, esta definición basada en la actividad hematopoyética es inapropiada. Por tanto, como se usa en el presente documento, la unidad de actividad de la variante de EPO se define como la cantidad de proteína requerida para producir la misma actividad en sistemas neurales u otros celulares que responden a eritropoyetina como la producida por EPO nativa en el mismo sistema. El experto en la materia determinará fácilmente las unidades de una EPO no hematopoyética según los consejos en el presente documento.

En un aspecto adicional la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido, un vector, una célula huésped, un polipéptido de la presente invención y uno o más soportes farmacéuticamente aceptables.

En la práctica de un aspecto de la presente invención, una composición farmacéutica como se describe anteriormente se puede administrar a un mamífero por cualquier vía que proporcione un nivel suficiente de una variante de eritropoyetina. Se puede administrar sistémica o localmente. Tal administración puede ser por vía parenteral, transmucosa, por ejemplo, oral, nasal, rectal, intravaginal, sublingual, submucosa o transdérmica. Preferiblemente, la administración es parenteral, por ejemplo, inyección por vía intravenosa o intraperitoneal, y además incluye, pero no está limitada a, administración intrarterial, intramuscular, intradérmica y subcutánea. Si la composición farmacéutica de la presente invención se administra localmente se puede inyectar directamente en el órgano o tejido que se va a tratar. En casos de tratamiento del sistema nervioso esta vía de administración incluye, pero no está limitada a, las vías intracerebral, intraventricular, intracerebroventricular, intratecal, intracisternal, intrarraquídea y/o perirraquídea, que pueden emplear agujas intracraneales e intravertebrales, y catéteres con o sin dispositivos bomba.

En una forma de realización preferida la composición farmacéutica comprende un polipéptido variante de EPO en una forma farmacéutica adaptada para la protección o aumento de células, tejidos u órganos que responden a EPO que comprende, por forma farmacéutica, una cantidad eficaz no tóxica en el intervalo desde aproximadamente 0,5 mg hasta 5 mg de variantes de EPO; de 0,6 mg a 5 mg de variantes de EPO; de 0,7 mg a 5 mg de variantes de EPO; de 0,8 mg a 5 mg de variantes de EPO; de 0,9 mg a 5 mg de variantes de EPO; de 1 mg a 5 mg de variantes de EPO; de 1,5 mg a 5 mg de variantes de EPO; de 2 mg a 5 mg de variantes de EPO; de 2,5 mg a 5 mg de variantes de EPO; de 3,5 mg a 5 mg de variantes de EPO; de 4 mg a 5 mg de variantes de EPO; o de 4,5 mg a 5 mg de variantes de EPO y un soporte farmacéuticamente aceptable.

En una forma de realización preferida, se puede administrar un polipéptido variante de EPO sistémicamente a una dosis de entre 100 nanogramos hasta aproximadamente 50 microgramos por kg de peso corporal, preferiblemente desde aproximadamente 20 microgramos hasta aproximadamente 50 microgramos por kg de peso corporal. Tales niveles en suero se pueden alcanzar a aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 horas tras la administración.

5 Tales dosis se pueden repetir según sea necesario. Por ejemplo, la administración se puede repetir a diario, o cada dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete días, siempre que sea clínicamente necesario, o después de un intervalo apropiado, por ejemplo, cada 1 a 12 semanas, preferiblemente, cada 3 a 8 semanas. En una forma de realización, la cantidad eficaz de la variante de EPO y un soporte farmacéuticamente aceptable pueden estar envasados en un vial u otro envase de dosis única. Dependiendo de la enfermedad o afección respectivamente tratada la variante de EPO
10 se puede administrar en una dosis única, durante un periodo de tiempo predeterminado o continuamente. Cuando se trata una enfermedad o afección aguda podría ser suficiente proporcionar al paciente una dosis única de la variante de EPO o durante un periodo de, por ejemplo, durante 2 días a 12 meses, preferiblemente de 1 semana a 6 meses, más preferiblemente de 2 semanas a 3 meses. Si se trata una enfermedad o afección crónica o si la variante de EPO se usa para prevenir o reducir el deterioro asociado con el envejecimiento la variante de EPO se puede
15 administrar continuamente. Si la variante de EPO de la presente invención se administra durante un periodo de tiempo determinado o continuamente, preferiblemente se administra en los intervalos e intervalos preferidos indicados anteriormente. Los intervalos dependerán necesariamente en parte del nivel en suero de la variante de EPO necesaria para tratar o mejorar la respectiva enfermedad y de la farmacocinética de la respectiva variante de EPO, que en parte dependerá de las modificaciones de EPO mediante, por ejemplo, PEG. Está en la discreción del
20 médico de cabecera determinar la duración, dosis y tipo de EPO exactas considerando, por ejemplo, la afección del paciente que se va a tratar, la gravedad de la afección, etc.

Para otras vías de administración, tal como mediante el uso de un perfundido, inyección en un órgano, u otra administración local, se proporcionará una composición farmacéutica que produzca niveles similares de una variante
25 de EPO como se han descrito anteriormente. Se desea un nivel de de aproximadamente 10 pg/ml hasta aproximadamente 1000 ng/ml.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, por ejemplo, polinucleótido, polipéptido, célula o vector, y un soporte farmacéuticamente aceptable. En
30 una forma de realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o de un estado o enumerada en la Farmacopea de los EE UU u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "soporte" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el producto terapéutico. Tales soportes farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como soluciones salinas en agua y aceites, incluyendo
35 los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de vaselina, aceite de sésamo y similares. Una solución salina es un soporte preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden emplear como soportes líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes reguladores de pH. Estas composiciones pueden
40 tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y soportes tradicionales tal como triglicéridos. Los compuestos de la invención se pueden formular como formas neutras o sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con grupos amino libres tales como las derivadas de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con grupos carboxilo libres tales como las derivadas de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc. Se describen ejemplos de soportes farmacéuticos adecuados en "Remington's
45 Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de soporte de modo que proporcionen la forma para la administración adecuada al paciente. La formulación se debe ajustar al modo de administración.

55 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración oral se pueden proporcionar como cápsulas o comprimidos; como polvos o gránulos; como soluciones, jarabes o suspensiones (en líquidos acuosos o no acuosos); como espumas o batidos comestibles; o como emulsiones. Los comprimidos o cápsulas de gelatina dura pueden comprender lactosa, almidón o derivados del mismo, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, ácido esteárico o sales del mismo. Las cápsulas de gelatina blanda pueden comprender
60 aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos o líquidos, etc. Las soluciones y jarabes pueden comprender agua, polioles y azúcares.

Un agente activo pretendido para la administración oral puede estar recubierto con o mezclado con un material que retrase la disgregación y/o absorción del agente activo en el aparato digestivo (por ejemplo, se puede usar
65 monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo). Por tanto, la liberación sostenida de un agente activo se puede alcanzar durante muchas horas y, si es necesario, el agente activo se puede proteger de ser degradado en el

estómago. Las composiciones farmacéuticas para la administración oral se pueden formular para facilitar la liberación de un agente activo en una localización gastrointestinal particular debido al pH específico o condiciones enzimáticas.

5 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración transdérmica se pueden proporcionar como parches aislados que se pretende permanezcan en contacto estrecho con la epidermis del receptor durante un periodo de tiempo prolongado. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica se pueden proporcionar como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, nebulizadores, aerosoles o aceites. Para la administración tópica a la piel, boca, ojo u otros tejidos externos, se usa preferiblemente una pomada o crema tópica. Cuando se formula como una pomada, el principio activo se puede emplear con una base de pomada parafínica o miscible con agua. Alternativamente, el principio activo se puede formular en una crema con una base de aceite en agua o una base de agua en aceite. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica al ojo incluyen gotas oculares. En estas composiciones, el principio activo se puede disolver o resuspender en un soporte adecuado, por ejemplo, en un solvente acuoso. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en la boca incluyen grajeas, pastillas y colutorios.

20 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración nasal pueden comprender soportes sólidos tales como polvos (preferiblemente con un tamaño de partícula en el intervalo de 20 a 500 micrómetros). Los polvos se pueden administrar de la manera en que se toma el rapé, es decir, por inhalación rápida a través de la nariz de un envase de polvo mantenido cerca de la nariz. De forma alternativa, las composiciones adoptadas para la administración nasal pueden comprender soportes líquidos, por ejemplos nebulizadores nasales o gotas nasales. Estas composiciones pueden comprender soluciones acuosas u oleaginosas del principio activo. Las composiciones para administración por inhalación se pueden suministrar en dispositivos especialmente adaptados incluyendo, pero no limitados a, aerosoles presurizados, nebulizadores o insufladores, que se pueden construir de modo que proporcionen dosis predeterminadas del principio activo. En una forma de realización preferida, las composiciones farmacéuticas de la invención se administran a través de la cavidad nasal a los pulmones.

30 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración rectal se pueden proporcionar como supositorios o enemas. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración vaginal se pueden proporcionar como óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en aerosol.

35 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración parenteral incluyen soluciones o suspensiones inyectables estériles acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que hacen las composiciones sustancialmente isotónicas con la sangre del receptor pretendido. Otros componentes que pueden estar presentes en tales composiciones incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, por ejemplo. Las composiciones adaptadas para la administración parenteral se pueden presentar en envases de dosis unitarias o multidosis, por ejemplo, ampollas selladas y viales, y se pueden almacenar en una condición liofilizada que requiere solo la adición de un soporte líquido estéril, por ejemplo, solución salina estéril para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas se pueden preparar de polvos, gránulos y comprimidos estériles. En una forma de realización, se puede proporcionar un autoinyector que comprende una solución inyectable de una variante de EPO para el uso de emergencia por ambulancias, servicios de urgencias, y situaciones en campos de batalla, e incluso para la autoadministración en un marco doméstico, particularmente donde se puede producir la posibilidad de amputación traumática, tal como por el uso imprudente de un cortacésped. La posibilidad de que células y tejidos en un pie o dedo del pie amputado sobrevivan después de la reimplantación puede aumentar administrando una variante de EPO a múltiples sitios en la parte amputada tan pronto como sea factible, incluso antes de la llegada del personal médico al lugar, o la llegada del individuo afectado con el dedo amputado a remolque al servicio de urgencias.

50 En una forma de realización preferida, la composición se formula según procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para la administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Donde sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o mezclados en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un envase herméticamente sellado tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de agente activo. Donde la composición se va a administrar por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. Donde la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de solución salina estéril de modo que los ingredientes se mezclen antes de la administración.

60 Los supositorios generalmente contienen el principio activo en el intervalo del 0,5% al 10% en peso; las formulaciones orales preferiblemente contienen del 10% al 95% del principio activo.

65 Se puede proporcionar una composición de perfundido para su uso en baños de órganos trasplantados, para la perfusión in situ, o para la administración a la vasculatura de un donante de órganos antes de la recogida del órgano.

Tales composiciones farmacéuticas pueden comprender niveles de una variante de EPO o una forma de una variante de EPO no adecuada para la administración aguda o crónica, local o sistémica a un individuo, pero servirá las funciones pretendidas en el presente documento en un cadáver, baño de órgano, perfundido de órganos, o perfundido in situ antes de retirar o reducir los niveles de la variante de EPO contenida en el mismo antes de la exposición o devolución del órgano o tejido tratado a la circulación regular.

La invención también proporciona un envase farmacéutico o kit que comprende uno o más envases llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente asociado con tal(es) envase(s) puede estar un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de fármacos o productos biológicos, aviso que refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para la administración humana.

En otra forma de realización, por ejemplo, la variante de EPO se puede administrar en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, el polipéptido se puede administrar usando infusión intravenosa, un bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. En una forma de realización, se puede usar una bomba (véase, Sefton (1987) *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* **14**: 201; Buchwald et al. (1980) *Surgery* **88**:507; Saudek et al. (1989) *N. Eng. J. Med.* **321**: 574). En otra forma de realización, el compuesto se puede administrar en una vesícula, en particular un liposoma (véase, Langer (1990) *Science* **249**:1527-1533; Treat et al. (1989) en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, N.Y., 353-365; documento WO 91/04014; documento U.S. 4.704.355). En otra forma de realización, se pueden usar materiales poliméricos (véase, *Medical Applications of Controlled Release* (1974) Langer y Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, Fla.; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, (1984) Smolen y Ball (eds.), Wiley: N.Y.; Ranger y Peppas (1953) *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* **23**: 61; véase también, Levy et al. (1985) *Science* **228**:190; During et al. (1989) *Ann. Neurol.* **25**: 351; Howard et al. (1989) *J. Neurosurg.* **71**: 105).

En aún otra forma de realización, se puede colocar un sistema de liberación controlada en la proximidad de la diana terapéutica, es decir, las células, tejido u órgano diana, lo que requiere así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson (1984) 115-138 en *Medical Applications of Controlled Release*, vol. 2). Se discuten otros sistemas de liberación controlada en la revisión por Langer (1990, *Science* **249**: 1527-1533).

En otra forma de realización, la variante de EPO, formulada adecuadamente, se puede administrar mediante administración nasal, oral, rectal, vaginal, o sublingual.

En una forma de realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente al área en necesidad de tratamiento; esto se puede alcanzar mediante, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un vendaje después de la cirugía, por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, dicho implante es un material, poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tal como membranas silásticas, o fibras.

La selección de la dosis eficaz preferida la determinará el experto en la materia basado en la consideración de varios factores que conocerá el experto en la materia. Tales factores incluyen la forma particular de la composición farmacéutica, por ejemplo, polipéptido o vector, y sus parámetros farmacocinéticos tales como biodisponibilidad, metabolismo, semivida, etc., que se habrán establecido durante los procedimientos de desarrollo habituales típicamente empleados en obtener la aprobación reguladora para un compuesto farmacéutico. Factores adicionales en considerar la dosis incluyen la afección o enfermedad que se va a tratar o el beneficio que se va a alcanzar en un individuo normal, la masa corporal del paciente, la vía de administración, si la administración es aguda o crónica, medicaciones concomitantes, y otros factores que se sabe bien que afectan a la eficacia de los agentes farmacéuticos administrados. Por tanto, la dosis precisa se debe decidir según el juicio del médico general y las circunstancias de cada paciente, por ejemplo, dependiendo de la afección del estado inmunitario del paciente individual, según técnicas clínicas estándar.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un perfundido o solución de perfusión para la perfusión y almacenamiento de órganos para trasplante, la solución de perfusión incluye una cantidad de una composición farmacéutica eficaz para proteger células que responden a la variante de EPO y células, tejidos u órganos asociados.

El trasplante incluye, pero no está limitado a, xenotrasplante, donde un órgano (incluyendo células, tejido u otra parte corporal) se recoge de un donante y se trasplanta a un receptor diferente; y autotrasplante, donde el órgano se toma de una parte de un cuerpo y sustituye a otra, incluyendo procedimientos quirúrgicos extracorpóreos, en los que un órgano se puede retirar, y mientras ex vivo, escindir, reparar, o manipular de otra manera, tal como la eliminación de un tumor, y después devolver a la localización original. En una forma de realización, la solución de perfusión es la solución de la Universidad de Wisconsin (UW) (documento U.S. 4.798.824) que contiene desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 25 U/ml de eritropoyetina, hidroxietilalmidón al 5% (que tiene un peso molecular desde aproximadamente 200.000 hasta aproximadamente 300.000 y está sustancialmente libre de etilenglicol,

etilenclorhidrina, cloruro de sodio y acetona), KH_2PO_4 25 mM; glutatión 3 mM; adenosina 5 mM; glucosa 10 mM; tampón HEPES 10 mM; gluconato de magnesio 5 mM; CaCl_2 1,5 mM; gluconato de sodio 105 mM: 200.000 unidades de penicilina; 40 unidades de insulina; dexametasona 16 mg; rojo fenol 12 mg; y tiene un pH de 7,4-7,5 y una osmolalidad de aproximadamente 320 mOsm/l. La solución se usa para mantener riñones y páncreas cadavéricos antes del trasplante. Usando la solución, la conservación se puede extender más allá del límite de 30 horas recomendado para la conservación de riñones cadavéricos. Este perfundido particular es meramente ilustrativo de un número de tales soluciones que se pueden adaptar para el uso presente mediante la inclusión de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica. En una forma de realización adicional, la solución de perfundido contiene el equivalente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 35 U/ml de eritropoyetina, o desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 30 U/ml de eritropoyetina.

Mientras que el receptor preferido de una variante de EPO para los fines a lo largo de todo el presente documento es un ser humano, los métodos en el presente documento aplican igualmente a otros mamíferos, particularmente animales domesticados, ganado, animales de compañía y de zoo. Sin embargo, la invención no es así limitante y los beneficios se pueden aplicar a cualquier mamífero.

Si se sabe que una persona está en riesgo de desarrollar un ictus, es posible una administración profiláctica de la composición farmacéutica de la presente invención. En estos casos, las composiciones farmacéuticas, en particular el polipéptido variante de EPO preferiblemente se administra en las dosis preferidas y particularmente preferidas explicadas anteriormente en base diaria. Preferiblemente, entre 100 nanogramos hasta aproximadamente 50 microgramos por kg de peso corporal, preferiblemente de aproximadamente 20 microgramos hasta aproximadamente 50 microgramos por kg de peso corporal. Esta administración puede seguir hasta que el riesgo de desarrollar un ictus se haya reducido. En la mayoría de los casos, sin embargo, la composición farmacéutica se administrará una vez que se ha diagnosticado el ictus. En estos casos se prefiere que se administre una primera dosis de la composición farmacéutica por primera vez a las 24 horas después de que los primeros síntomas de un ictus son evidentes, preferiblemente a las 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 hora o menos. Preferiblemente la administración se sigue después durante preferiblemente al menos 7, más preferiblemente al menos 14 y más preferiblemente al menos 21 días. Las dosis se administran preferiblemente una vez al día y preferiblemente en las dosis indicadas anteriormente.

Breve descripción de las figuras y dibujos

Figura 1: Comparación de los productos de PCR de EPO: el panel A representa los productos de ADN de varias reacciones de PCR realizadas con plásmido puro que comprende las diferentes variantes de EPO murina o con ADNc de cerebro o riñón de ratón, que se separan en un gel de agarosa al 1,2%. De la izquierda a la derecha los carriles comprenden: marcador de peso molecular de 1 kb, el producto de mK3 puro, mG5 puro, m301 puro, mS puro, mWT puro, ADNc de cerebro, ADNc de riñón. El panel B representa el producto de ADN de una PCR realizada con ADNc de cerebro humano. De izquierda a la derecha los carriles comprenden el marcador de peso molecular de 1 kb y el producto de PCR de ADNc de cerebro humano.

Figura 2: Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de las variantes de EPO identificadas en ADNc de cerebro murino y EPO murina "salvaje", es decir, la secuencia de la EPO previamente descrita.

Figura 3: Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de las variantes de EPO identificadas en ADNc de cerebro humano y EPO humana "salvaje".

Figura 4: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las variantes de EPO identificadas en ratón y ser humano con la respectiva EPO "salvaje".

Figura 5: Actividad hematopoyética de EPO murina y humana y las variantes de EPO de la presente invención. El panel A representa los resultados de un ensayo de formación de colonias para EPO y variantes de EPO murinas y el panel B representa un ensayo de formación de colonias para EPO y variantes de EPO humanas.

Figura 6: Organización experimental para los ensayos de neuroprotección con rhEPO e isómeros de EPO.

Figura 7: El panel A muestra un experimento con 1 h 40 min y 1 h 50 min de duración de privación de oxígeno y glucosa (POG). En ambos tiempos se observó una tasa de protección del 40-50% para neuroprotectores, pero no protección con mEPO y rhEPO. El panel B muestra un experimento con dos tiempos diferentes (la duración de POG entre los dos experimentos varía según la densidad de neuronas). A 2 h 45 min solo se alcanza una protección débil con wtEPO (20-30%) comparado con neuroprotectores (60-70%). La capacidad de protección total de rhEPO solo se observa a mayores niveles de daño (3 h 15 min).

Figura 8: El panel A muestra un experimento con 2 h 00 min, 2 h 15 min y 2 h 20 min de duración de POG con una concentración de proteína que equivale a 100 U/l de hEPO. En los tres tiempos, una tasa de protección del 40-50% para EPO humana, pero no protección con mEPO y rhEPO. El panel B muestra un experimento con dos puntos diferentes (la duración de POG entre los dos experimentos varía según la densidad de neuronas). A 2 h 45 min solo

se alcanza una protección débil con wtEPO (20-30%) comparado con neuroprotectores (60-70%). La capacidad de protección total de EPO solo se observa a mayores niveles de daño (3 h 15 min).

Figura 9: El panel A muestra una inmunotransferencia de medio de células HEK293 transfectadas con pcDNA3.1-V5/His-hEPO, pcDNA3.1-V5/His-hS3 o pcDNA3.1-V5/His-hS4, respectivamente. Estos medios se usaron para experimentos mostrados en la figura 8. La concentración de hEPO, cuantificada por ELISA de EPO de ratón (R&D) fue 2 U/ml. rhEPO (= 2,5 ng se cargaron en el gel), hEPO (= 0,4 ng se cargaron en el gel), hS3 y hS4: cada una 20 µl de medio (recogido 2 días después de la transfección). Marcador = 5 µl Patrón de proteína con etiqueta His BenchMark™ (Invitrogen). El panel B muestra una inmunotransferencia de EPO salvaje de ratón (mEPO) purificada con etiqueta His, variantes de EPO humana hS3 y hS4. Se cuantificó mEPO con el ELISA de EPO de ratón. Se cargaron 130 pg en el gel (anticuerpo primario: anticuerpo anti-rhEPO de conejo; Santa Cruz).

Figura 10: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las variantes de EPO creadas de forma recombinante (mutantes de alfa hélice) e identificadas in vivo. En el presente documento SEQ ID NO 50 es la secuencia salvaje de la alfa hélice humana; SEQ ID NO 51 es hAmA (mutación puntual a alanina); SEQ ID NO 52 es hAmE (mutación puntual a ácido glutámico); SEQ ID NO 53 es hA-10 (mutante de delección) y SEQ ID NO es hA-20 (mutante de delección).

Figura 11: Citoprotección mediada por hEPO y hS3 en un modelo de isquemia que consiste en privación de suero e hipoxia en mioblastos cardíacos H9c2. Las células H9c2 se incubaron en medio DMEM sin suero bien en condiciones normóxicas o hipóxicas durante 24 h. La apoptosis se evaluó 24 h después mediante el ensayo de LDH. Los datos se normalizaron ajustando la liberación de LDH delta de células sin tratar en condiciones normóxicas e hipóxicas al 100%. **A:** diagrama en columna que representa los valores medios de la liberación de LDH normalizada. **B:** Los datos se presentaron como un diagrama de cajas que muestra la mediana (línea a lo largo de la caja), el 25º percentil (parte inferior), 75º percentil (parte superior), el valor máximo y el mínimo. Número de experimentos n=7. $P^* < 0,001$ (ANOVA).

Figura 12: Inmunoprecipitación de variantes de EPO usando un anticuerpo anti-mEPO de R&D (cabra, marcado con biotina); **A:** detección de una segunda isoforma de EPO (30 kDa) en un extracto de proteínas de riñón de ratones tratados con CoCl₂ (129S6). **B:** bloqueo de la interacción anticuerpo-antígeno por Darbepoyetina A.

Figura 13: Neuroprotección mediada por alfa hélice de eritropoyetina (hA; n=4). hA 100 U/l: 30 pM; hA 50 U/l: 15 pM; hEPO: 30 pM = 100 U/l; $P^* < 0,05$ (ANOVA1 frente a control).

Figura 14: Neuroprotección mediada por varias isoformas de EPO humana (n=6) $P^* < 0,05$; ANOVA1 frente a control.

Figura 15: Neuroprotección mediada por variantes de delección de alfa hélice de eritropoyetina (n=6) $P^* < 0,05$; ANOVA1 frente a control **A:** diagrama en columna que muestra los valores medios de la liberación de LDH normalizada. **B:** diagrama de cajas que muestra los valores de medianas y percentiles (25%, 75%) de la liberación de LDH normalizada.

Figura 16: Efectos de las variantes de EPO humana y EPO humana de longitud completa sobre la producción de citoquinas inducida por LPS. Se diferenciaron monocitos humanos purificados a macrófagos en presencia de rhu M-CSF (50 ng/ml) durante 6 días. Los macrófagos (1x10⁶/ml) se preincubaron con hS4, hS3 o hEPO (300 mU/ml cada una) durante 3 horas y después se estimularon con 10 ng/ml de endotoxina (LPS de E. coli 0127:B8) durante 4 horas. La concentración de citoquinas en los sobrenadantes se determinó por ELISA (Cytometric Beads Array, Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania). Los datos se muestran como media±DE. ** Resultados que se diferenciaban del grupo control (PBS) ($p < 0,01$; prueba de la U de Mann-Whitney; n=3-9 por grupo).

Figura 17: Alineamiento de secuencias de ácido nucleico de variantes de delección de EPO.

Figura 18: Secuencias de ADN de mutantes y variantes de delección creados de forma recombinante así como la hélice A salvaje (hélice A de hWT-EPO). En el presente documento SEQ ID NO 55 es hA (hélice A salvaje), SEQ ID NO 56 es hAmA (mutante de delección con alanina), SEQ ID NO 57 es hAmE (mutante de delección con ácido glutámico), SEQ ID NO 58 es hA-10 (mutante de delección de hélice A menos 10 aa) y SEQ ID NO 59 es hA-20 (mutante de delección de hélice A menos 20 aa).

Figura 19: Se representa una forma de realización preferida en donde las secuencias de transporte líder se delecionan. A muestra la secuencia de ADN de hA sin líder como SEQ ID NO 60. Esta es la proteína madura exportada. También muestra la secuencia líder (SEQ ID NO 63). B muestra los aminoácidos de hA sin líder como SEQ ID NO 61 y la secuencia de aminoácidos de la secuencia líder como SEQ ID NO 62.

Ejemplos

Síntesis del ADNc de EPO murina

Se aisló ARN de riñones de ratones de tipo salvaje C57BL/6 o SV129S6 o de dos cerebros diferentes de ratón (1 hora después del ictus) mediante extracción con trizol. El ARN se precipitó con cloroformo e isopropanol y por último se disolvió en DEPC-H₂O. El ADN se digirió según el protocolo de DNasa sin RNasa RQ1 de Promega. La reacción se paró mediante la adición de 200 µl fenol/cloroformo/alcohol isopropílico (25/24/1) a la mezcla de reacción y centrifugación durante 10 minutos a 1000 rpm y 10°C. El sobrenadante se mezcló con 200 µl de cloroformo/alcohol isopropílico (24/1) y se centrifugó durante 10 minutos a 10000 rpm y 10°C. Se añadieron 20 µl de cloruro de litio 8 M y 550 µl de etanol absoluto al sobrenadante. Esta mezcla se incubó después durante 1 hora a -70°C y posteriormente se precipitó durante 30 minutos por centrifugación a 11000 rpm y 0°C. El precipitado resultante se lavó con 600 µl de etanol al 75%, se centrifugó a 8000 rpm (4°C, 10 min) y se secó a temperatura ambiente. El ARN se disolvió en 20 µl de DEPC-H₂O.

Se empleó transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MuLV, RNasa H menos, comprada de Promega) en la síntesis de la primera hebra de ADNc en un volumen de reacción de 15 µl con DEPC-H₂O que comprendía 3 µg de ARN y 3 µl de cebador hexamérico aleatorio (10 µM). La transcripción inversa se llevó a cabo con 6 µl de tampón de reacción de M-MuLV (5x), 2 µl de dNTP (2,5 mM de cada uno), 1 µl de inhibidor de RNasa (1U/µl), 1 µl de transcriptasa inversa de M-MuLV y 5 µl de DEPC-H₂O en una máquina de PCR que corría el siguiente programa: 5 min a 21°C; 1 h a 37°C; 5 min a 95°C.

El conjunto resultante de ADNc se usó para amplificar el ADNc de EPO completo mediante un planteamiento de PCR anidada. El primer paso empleó cebadores que están fuera de la región codificante del gen de EPO (genepo_sentido (SEQ ID NO 39) gaa ctt cca agg atg aag act tgc agc y genepo_antisentido; (SEQ ID NO 40): gtg gca gca tgc cac ctg tc). El segundo paso usó cebadores diseñados para amplificar el gen desde el inicio al codón de terminación, con sitios de corte *Bam*HI unidos para la posterior clonación (epo_sentido (SEQ ID NO 41) tat gga tcc atg ggg gtg ccc gaa cgt ccc ac y epo_antisentido (SEQ ID NO 42) tat gga tcc tca cct gtc ccc tct cct gca gac). Todos los cebadores eran de MWG-Biotech AG. Se realizó una PCR anidada en una máquina de PCR Hybaid en dos pasos, primera PCR (3 min a 95°C; 35 ciclos: 30 segundos a 65°C, 1 min a 72°C, 30 segundos a 95°C; 10 min a 72°C; 4°C mantenimiento) y segunda PCR (3 min a 95°C; 5 ciclos: 30 segundos a 67°C, 1 min a 72°C, 30 segundos a 95°C; 15 ciclos: 30 segundos a 70°C, 1 min a 72°C, 30 segundos a 95°C; 10 min a 72°C; 4°C).

En ambas PCR, se usó la ADN polimerasa de inicio en caliente *Pfu* Turbo (Stratagene) según el protocolo del fabricante. El producto de PCR del primer paso se diluyó 1:50 para la segunda PCR. Se realizó un segundo protocolo de síntesis de ADNc usando el sistema Access RT-PCR (Invitrogen) con los siguientes parámetros: 48°C 5 min; 94°C 2 min; 40 ciclos: 94°C 30 segundos, 65°C 1 min, 70°C 2 min; 70°C 7 min; 4°C. La segunda PCR se realizó como se ha descrito anteriormente.

El ADNc de EPO de longitud completa y los isómeros de EPO amplificados se separaron en un gel de TAE-agarosa al 1,2%. En la figura 1a se muestra una foto de los varios productos de PCR. Los fragmentos se purificaron después usando el sistema Wizard SV-Gel Cleanup (Promega) o el kit de extracción de gel (Qiagen, Hilden, Alemania). Como la polimerasa *Pfu* genera productos de extremos romos, el ADNc se subclonó en el vector pCR-Blunt II-TOPO usando células químicamente competentes Top 10 One Shot de (ambos Invitrogen).

Se aisló ADN de plásmido de colonias individuales mediante el uso del kit QIA prep de Qiagen. Los insertos se secuenciaron en un secuenciador de ADN ALFexpress™ (Pharmacia Biotech) usando el kit de secuenciación Thermo Sequenase™ Primer Cycle (Amersham Biosciences). Los cebadores M13FWDY (SEQ ID NO 43: gtc gtg act ggg aaa acc ctg gcg) y M13REVCY (SEQ ID NO 44 agc gga taa caa ttt cac aca gga) se marcaron con Cy5. Los parámetros para la secuenciación fueron: t=900 min; T=55°C; 800V; 55 mA y 30 W. El análisis de secuencias reveló la existencia de una variante nueva de EPO que carece del exón 4 y tres variantes internamente delecionadas. Las secuencias de nucleótidos se representan en la figura 2a y la figura 2 b y las secuencias de los péptidos codificados se representan en la figura 4. La secuencia de nucleótidos y peptídica de la variante de EPO mS corresponde a SEQ ID NO 13 y SEQ ID NO 14, respectivamente. La secuencia de nucleótidos y peptídica de la variante de EPO mG3 corresponde a SEQ ID NO 15 y SEQ ID NO 16, respectivamente. La secuencia de nucleótidos y peptídica de la variante de EPO mG5 corresponde a SEQ ID NO 17 y SEQ ID NO 18, respectivamente. La secuencia de nucleótidos y peptídica de la variante de EPO m301 corresponde a SEQ ID NO 19 y SEQ ID NO 20, respectivamente. La secuencia de nucleótidos y peptídica de la variante de EPO mK3 corresponde a SEQ ID NO 21 y SEQ ID NO 22, respectivamente.

Síntesis de ADNc de EPO humana

Se compró el ARN poli A+ de riñón adulto (macho) y cerebro fetal (macho) humanos de Stratagene. Se generó el ADNc a partir de 250 ng de ARN de riñón o 200 ng de ARN de cerebro según la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MuLV, RNasa H menos) como se ha descrito anteriormente. El conjunto resultante de ADNc se usó para amplificar el ADNc de EPO completo usando polimerasa *Pfu* (Stratagene) con los siguientes cebadores: Hepo_sentido (SEQ ID NO 45): gat ggg ggt gca cga atg tcc tgc y Hepo_antisentido (SEQ ID NO 46): cac acc tgg tca tct gtc ccc tgt c.

La PCR se realizó en una máquina de PCR de Invitrogen (3 min a 95°C; 35 ciclos: 30 segundos a 67°C, 1 min a 72°C, 30 segundos a 95°C; 10 min a 72°C). En el caso del ADNc de cerebro fetal se usó un planteamiento de PCR anidada, realizándose el segundo paso de amplificación sobre el producto de PCR de 20 ciclos. Los productos de PCR amplificados se separaron en un gel de TAE-agarosa al 1,2% (figura 1b) y se purificaron usando el kit de extracción de gel (Qiagen, Hilden, Alemania). El ADNc purificado se subclonó en el vector pCR-Blunt II-TOPO usando células químicamente competentes Top 10 One Shot de (ambos Invitrogen). Se aisló ADN de plásmido de colonias individuales mediante el uso del kit QIA prep de Qiagen (Qiagen, Hilden, Alemania). Los insertos se secuenciaron en un secuenciador de ADN ALFexpress™ (Pharmacia Biotech) usando el kit de secuenciación Thermo Sequenase™ Primer Cycle (Amersham Biosciences). Los cebadores M13FWDY (SEQ ID NO 43) y M13REVCY (SEQ ID NO 44) se marcaron con Cy5. Los parámetros para la secuenciación fueron: t=900 min; T=55°C; 800V; 55 mA y 30 W. El análisis de secuencias reveló la existencia de dos nuevas variantes de EPO humana que carecen del exón 3 y la primera mitad del exón 4, respectivamente, y un número de variantes que sigue la regla de trimeros o hexámeros repetidos como se detectó en ratón. Las secuencias de nucleótidos se representan en la figura 3a y la figura 3b y las secuencias de los péptidos codificados se representan en la figura 4. La secuencia de nucleótidos y peptídica de la variante de EPO hS3 corresponde a SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2, respectivamente. La secuencia de nucleótidos y peptídica de la variante de EPO h1-4 corresponde a SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4, respectivamente. La secuencia de nucleótidos y peptídica de la variante de EPO h1-5 corresponde a SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6, respectivamente. La secuencia de nucleótidos y peptídica de la variante de EPO hS4 corresponde a SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8, respectivamente. La secuencia de nucleótidos y peptídica de la variante de EPO h1-1 corresponde a SEQ ID NO 9 y SEQ ID NO 10, respectivamente. La secuencia de nucleótidos y peptídica de la variante de EPO h2-1 corresponde a SEQ ID NO 11 y SEQ ID NO 12, respectivamente.

Expresión de proteínas con etiqueta de His en células HEK

Se añadieron sitios de restricción BamHI y EcoRI para la clonación a las variantes de EPO tanto de ratón como humanas usando cebadores sentido con salientes y cebadores antisentido con salientes sin codón de terminación (para las variantes de ratón: epo_sentido (SEQ ID NO 41) y epoeco_antisentido (SEQ ID NO 47): aaa gaa ttc cct gtc ccc tct cct gca gac ctc; para las variantes humanas: hepobam_se (SEQ ID NO 48): tat gga tcc atg ggg gtg cac gaa tgt cc, hepoeeco_as [SEQ ID NO 49]: aga gaa ttc tct gtc ccc tgt cct gca g). Los productos de PCR se clonaron en pcDNA-3.1-HIS/V5 A (Invitrogen) usando sitios de restricción BamHI y EcoRI. Los plásmidos se amplificaron en células competentes XL-1 Blue (recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^R)] (Stratagene). El protocolo de transformación de las células competentes XL-1 Blue se realizó sin β-mercaptoetanol y con un pulso de calor prolongado de 60 segundos. El ADN de plásmido se extrajo usando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Alemania). Para la transfección en células de mamífero el ADN se extrajo usando el kit EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). Se cultivaron células HEK 293 (BD Biosciences) durante 18 días en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Biochrom, Berlín, glucosa 1 g/l; NaHCO₃ 3,7 g/l, suplementado con suero de ternera fetal GOLD al 10%, penicilina/estreptavidina al 1% y L-glutamina al 1%) en botellas de cultivo (25 cm²) a 37°C y CO₂ al 5%. Las células se pasaron cada 2-3 días después de alcanzar el 80-90% de confluencia. En la DIV18 se plaquearon 120.000 células por pocillo en una placa de 12 pocillos que contenía medio de Eagle modificado por Dulbecco sin antibióticos. Las células se cultivaron durante aproximadamente 48 horas hasta el 50% de confluencia. La transfección se realizó con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) adaptando el protocolo suministrado para células HEK.

El medio de plaqueo de las células HEK se sustituyó 10 minutos antes de la transfección por DMEM sin suero sin antibióticos. Las células se incubaron 5 horas a 37°C con los complejos ADN-Lipofectamina. El medio se cambió después a DMEM con suero fresco sin antibióticos. En la DIV12 las células se pasaron y plaquearon en medio de Eagle modificado por Dulbecco con antibióticos.

Expresión y purificación de variantes de EPO con etiqueta de His

Las proteínas con etiqueta de His se expresaron de forma transitoria en células HEK. El medio de las células HEK293 se recogió 2-6 días después de la transfección con las construcciones de pcDNA-3.1-HIS/V5 A. Los restos celulares se precipitaron a 3500 rpm, 4°C durante 15 minutos. Se usó la resina de afinidad de metal BD TALON™ (BD Biosciences) para la purificación de las proteínas con etiqueta de His. Todos los pasos (equilibrio, lavado y elución) se realizaron a pH 7,1. El protocolo proporcionado se modificó a un paso de unión prolongado durante la noche a 4°C. El eluato se recogió en fracciones de 500 µl. Las fracciones se analizaron por inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-rhEPO de Santa Cruz o un kit ELISA de EPO murina (R&D). Se eliminó el imidazol de las fracciones que contenían proteína usando las columnas de desalado HiTrap™ (5 ml) de Amersham Biosciences según el protocolo del fabricante. Esto incluyó un cambio de tampón a PBS.

Inmunotransferencia

Se preparó un gel al 16% con SDS usando protocolos estándar y se corrió a 110 V. La transferencia se hizo en membranas de nitrocelulosa durante 45 minutos a 200 mA. La membrana se bloqueó durante al menos una hora en tampón de bloqueo que contenía leche en polvo desnatada al 5% en Tween-20 al 0,1%. La incubación con el primer anticuerpo (IgG policlonal de conejo contra EPO (H-162) sc-7956, Santa Cruz, 1:500) se realizó durante la noche a

4°C. El anticuerpo secundario (anti-ratón de cabra HRP, 1:1000) se añadió durante 2 horas a temperatura ambiente. La membrana se reveló mediante el uso de Luminol; las fotos se expusieron durante 2 minutos. Las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau. El anticuerpo específico de EPO pudo detectar todas las variantes de EPO.

5 Ensayo de formación de colonias eritroideas

Se recogieron células de médula ósea de tibia y fémur de ratones C57BL/6 macho (8-11 semanas) y se resuspendieron en medio α (suplementado con suero de ternera fetal GOLD al 10%, penicilina/estreptavidina al 1% y L-glutamina al 1%). Las células se sembraron en placas petri de 35 mm² (225.000 células/placa) que contenía 8 partes de Metho Cult SF 3236 metilcelulosa (StemCell Technologie Inc.), 1 parte de células y 2 partes de medio α mezclado con medio preacondicionado de células HEK que contenía los derivados de EPO (150 U/l en el caso de EPO murina). Se usaron 150 U/l de rhEPO (Roche) como control positivo. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5% durante 48 horas. Para la evaluación solo se consideraron colonias rojizas que contenían al menos 6 células hemoglobinizadas.

Potencial hematopoyético de las variantes de EPO

Metho Cult SF 3236 desencadena la formación de colonias (UFC-M, UFC-G o UFC-E) solo después de la adición de las citoquinas apropiadas. La formación de UFC-E (unidad formadora de colonias-eritroblasto) se puede observar, después de la adición de eritropoyetina, después de 2 días. Las pequeñas colonias rojizas irregulares desaparecen hacia el día 3.

En este ensayo, el potencial hematopoyético de las variantes se probó y comparó a la forma salvaje de EPO así como a rhEPO. Se prepararon las siguientes condiciones para la comparación: medio de células HEK transfectadas con pZ/EG como control negativo, medio de células HEK transfectadas con células pZ/EG más 150 U/l de rhEPO (Roche) como control positivo, y medio de células HEK transfectadas con pZ/EG-EPO-IRES (150 U/l de EPO murina), pZ/EG-Splice-IRES (variante S; mS) o pZ/EG-G3-IRES (variante G3; mG3). En la DIV2 solo se contaron colonias rojizas que contenían al menos 6 células hemoglobinizadas. Los resultados de tres experimentos independientes se representan en la figura 5.

En comparación con EPO murina y rhEPO las variantes de EPO murinas (variantes mS y mG3) carecían de potencial hematopoyético.

Cultivos neuronales primarios

Se obtuvieron cultivos neuronales primarios de rata de embriones E16 a E19 temprano de ratas Wistar (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlín, Alemania). Se obtuvieron neuronas de ratón que expresan Cre de embriones E16 de ratones transgénicos heterocigotos que expresan la recombinasa Cre bajo el control del promotor de la tubulina α -1 (proporcionados por Dr. U. Schweizer; Experimental Endocrinology, Charité). Los cultivos de rata y murinos se prepararon según un protocolo modificado de Brewer (1995) *J Neurosci Res.* **42**: 674-83. Se aisló la corteza cerebral después de la eliminación de las meninges y se lavó dos veces en PBS (Biochrom, Berlín, Alemania). Después de 15 minutos de incubación en tripsina/EDTA (0,05/0,2% p/v en PBS) a 37°C, los tejidos se lavaron dos veces en N-Med (medio de Eagle modificado de Gibco con suero de ternera fetal al 10%, 100 U de penicilina más estreptomycin de Biochrom, L-glutamina 2 mM, 100 IE de insulina/l, HEPES 10 mM y glucosa 44 mM) y se disociaron cuidadosamente en un pequeño volumen de N-Med usando una pipeta Pasteur. Las células se precipitaron a temperatura ambiente por 2 minutos de centrifugación a 210 g y se resuspendieron en medio de inicio NBM (medio neurobasal de Gibco con suplemento B27 al 2% de Gibco, pen/estrep al 1%, L-glutamina 0,5 mM y glutamato 25 mM).

Preparación de placas de cultivo

Se pretrataron placas de 24 pocillos y placas de 6 pocillos mediante incubación durante la noche a 4°C con poli-L-lisina de Biochrom (2,5 µg/ml en PBS). El lavado de los pocillos con PBS fue seguido por 1 hora de incubación a 37°C con medio de recubrimiento (medio de Eagle modificado con STF Gold al 5% de PAA, Pen/Estrep al 1%, HEPES 10 mM y colágeno G 0,03 p/v de Biochrom), después los pocillos se lavaron cuidadosamente dos veces con PBS. El volumen y el tipo de medio de plaqueo se eligieron dependiendo del procedimiento experimental.

Privación de oxígeno y glucosa en neuronas corticales primarias de rata - un modelo de cultivo celular de isquemia cerebral

Para la POG el medio de cultivo se eliminó lavando una vez con PBS. Se indujo la POG con 500 µl de una solución aglucémica desoxigenada (BSS₀-O₂; Na⁺ 143,8 mM, K⁺ 5,5 mM, Ca²⁺ 1,8 mM, Mg⁺ 0,8 mM, Cl⁻ 125,3 mM, HCO₃⁻ 26,2 mM y SO₄²⁻ 0,8 mM, pH 7,4) en una atmósfera hipóxica generada por un incubador hermético al gas humidificado, dedicado (Concept 400, Ruskin Technologies, Bridgend, RU), limpiado con una mezcla de gas que contenía CO₂ al 5%, N₂ al 85% y H₂ al 10%. El tiempo de POG dependía de la densidad y la edad del cultivo y variaba entre 2 h 30 min y 2 h 40 min. En experimentos control las células se trataron con 500 µl de la solución BSS₀.

glucémica oxigenada (BSS₀+O₂; Na⁺ 143,8 mM, K⁺ 5,5 mM, Ca²⁺, 1,8 mM, Mg⁺ 0,8 mM, Cl⁻ 125,3 mM, HCO₃⁻ 26,2 mM y SO₄²⁻ 0,8 mM, y glucosa 20 mM, pH 7,4) e incubadas a 37°C en atmósfera normóxica que contenía CO₂ al 5%. Inmediatamente después de la POG, las células tratadas y controles se cambiaron de solución de PBS a 500 µl de medio que contenía NBM acondicionada al 40% más NBM fresca al 60%. Después de 24 horas, se midió la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes como un indicador de muerte celular.

Para la medida de LDH se mezclaron 25 µl de medio con 100 µl de solución de β-NADH reciente (0,15 mg/ml en tampón de LDH 1x; Sigma, forma reducida) en una palca de 96 pocillos (Greiner). Se añadieron 25 µl de piruvato 22,7 mM (Sigma) inmediatamente antes de colocar la placa en el lector (Thermo Labsystems; MRX^{TC} Revelation). Los parámetros se eligieron como sigue: filtro: 340 nm, tiempo de agitación; 5 segundos, intervalo: 30 segundos, cuentas: 10. La concentración de LDH se calculó proporcionalmente al patrón de LDH (Greiner, sistema calibrador).

Inducción de neuroprotección por medio acondicionado de células HEK293 transfectadas que expresan variantes de EPO

En los siguientes experimentos se usó rhEPO (EPO humana recombinante de Sigma Aldrich, Deisenhofen, Alemania) como control positivo. Los ensayos de neuroprotección se representan esquemáticamente en la figura 6. Las neuronas se plaquearon en placas de 24 pocillos a una densidad de 300.000 células en un volumen final de 600 µl de medio inicial NBM. Después de 4 días, 200 µl del medio se sustituyeron por NBM fresco (igual que NBM inicial sin glutamato).

Para el pretratamiento con rhEPO, mEPO salvaje, hEPO salvaje o variantes de EPO el medio se eliminó hasta un volumen final de 200 µl y se rellenó con 200 µl de NBM+B27 reciente que contenía cantidades equimolares (correspondientes a 200 U/l de rhEPO) de EPO o variantes de EPO, respectivamente. Las concentraciones equivalentes de las diferentes variantes de EPO (así como mEPO y hEPO) en el medio acondicionado de células HEK293 se estimaron por inmunotransferencia y ELISA de EPO. Después de ello las neuronas se cultivaron durante 48 horas en condiciones normóxicas humidificadas a 37°C antes de realizar la privación de oxígeno y glucosa (POG) (intervalo de POG según se indica). La muerte celular se evaluó 24 horas después de la POG por la medida de la liberación de LDH. La reducción en la liberación de LDH, comparada con las neuronas tratadas control (medio de células HEK293 transfectadas con el plásmido esqueleto; = ko; 100%), es una medida cuantitativa de la neuroprotección. En todos los experimentos observamos un efecto neuroprotector más robusto proporcionado por las variantes de EPO, si se compara con EPO salvaje (véanse la figura 7 panel A y B para EPO murina y variantes de la misma y la figura 8, panel A y B para EPO humana y variantes de la misma).

La neuroprotección inducida por las variantes de EPO murina es más robusta que la inducida por EPO (rhEPO así como EPO de ratón salvaje). Por ejemplo, la neuroprotección mediada por EPO solo se puede observar en una ventana claramente definida de duración de POG (correspondiente a un nivel de daño claramente definido). A baja concentración la neuroprotección por hS3 y hS4 era igual o mejor que la neuroprotección de hEPO salvaje. En conjunto, la neuroprotección inducida por las variantes es más fuerte que la inducida por rhEPO. Además, las variantes tienen un potencial neuroprotector mayor que ambas formas salvajes mEPO y hEPO, que se produjeron mediante el mismo procedimiento que las variantes de EPO.

H9c2 - modelo de isquemia

La línea celular de mioblastos de corazón de rata BDIX (obtenida de la Colección Europea de Cultivos Celulares) se cultivó en DMEM (Biochrom) que contenía glucosa 4,5 g/l suplementado con L-glutamina 2 mM, suero de ternera fetal inactivado al 10% y penicilina-estreptavidina al 1%. Los cultivos subconfluentes (70%) se subcultivaron 1:4. Las células se plaquearon en 400 µl de medio que contenía hEPO o hS3 120 pM respectivamente en una densidad de 15.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos y se cultivaron durante 48 horas. La hipoxia se logró cultivando las células en 400 µl de DMEM sin suero que contenía glucosa 4,5 g/l suplementado con L-glutamina 2 mM y penicilina-estreptavidina al 1% y dejándolas durante 24 horas en una estación de trabajo anaerobia (Concept 400, Ruskinn Technologies, Bridgend, RU) saturada con una mezcla de gas que contiene CO₂ al 5%, N₂ al 85% y H₂ al 10% a 37°C. Las células control se dejaron en DMEM sin suero en un incubador normóxico. Al final del experimento el medio se sustituyó con 400 µl de DMEM sin suero fresco y se midió la LDH según protocolos estándar 24 horas después.

Inmunoprecipitación

Se usaron ratones macho 129S6 o ratones macho B57Bl6 (8-10 semanas, Bundesinstituts für Risikibewertung, Berlín) que tenían acceso libre a comida y agua para los experimentos. Se inyectó CoCl₂ por vía subcutánea en una dosis de 60 mg/kg y los animales se sacrificaron 18 horas después. La expresión de proteínas se midió en extractos de proteína de suero, riñón y cerebro mediante un ELISA comercialmente disponible (R&D, mEPO).

Los anticuerpos para la inmunoprecipitación se compraron de R&D (anticuerpo anti-mEPO, cabra, marcado con biotina) y Santa Cruz (anti-rhEPO, conejo). La inmunoprecipitación se realizó según protocolos estándar y se evaluó por inmunotransferencia.

El bloqueo del anticuerpo de detección de la inmunotransferencia se logró mediante incubación de dos horas con 10 µg de Darbepoyetina A a temperatura ambiente antes de la incubación de la membrana.

5 Generación de mutantes de alfa hélice (figura 10)

Los mutantes de alfa hélice humanos se generaron todos por planteamientos basados en PCR usando protocolos estándar.

- 10 El mutante A (hAmA) y el mutante E (hAmE) son variantes de la alfa hélice con intercambio de aminoácidos en la posición 41 (arginina). La secuencia de ADNc se cambió de AGG a GCG para el mutante A (Alanina) o a GAG para el mutante E (glutamato). -20 aa y -10 aa son variantes de delección de la alfa hélice que carecen de 20 aminoácidos o 10 aminoácidos respectivamente en el extremo C. Todos los mutantes se generaron sin V5 y etiqueta de His y se expresaron en células HEK 293. Se realizaron experimentos de neuroprotección como se ha descrito previamente usando medio de células HEK transfectadas que expresan las diferentes variantes.

25 Citoprotección mediada por hEPO y hS3 en un modelo de isquemia en células H9c2 (figura 11)

- 20 El potencial citoprotector de las variantes de EPO se mostró ejemplarmente para hEPO y hS3 purificadas en un modelo de isquemia que consiste en la privación de suero e hipoxia en mioblastos cardíacos H9c2 (figura 1). La liberación de LDH se evaluó como un marcador de muerte celular apoptótica. Se encontraron capacidades citoprotectoras significativas para ambas variantes (aproximadamente el 20% y el 25% para hEPO y hS3).

25 La inmunoprecipitación revela una isoforma de ajuste de EPO en extractos proteicos de riñón de ratones tratados con CoCl2 (figura 12)

- 30 Para reforzar nuestro descubrimiento de isoformas de ajuste de EPO en tejidos humanos y murinos mediante un planteamiento basado en PCR realizamos inmunoprecipitaciones de extractos proteicos de suero, cerebro y riñón murinos de ratones tratados con CoCl2 usando anticuerpos probados para reconocer ambas isoformas. Se sabe que la inyección subcutánea de CoCl2 aumenta los niveles de eritropoyetina en varios tejidos de ratón, es decir, sangre, cerebro, hígado y riñón.

- 35 Se pudo precipitar eritropoyetina (aproximadamente 40 kDa) de extractos proteicos de suero, cerebro y riñón de ratones tratados con CoCl2 (figura 2); la precipitación de eritropoyetina de un extracto proteico de riñón de un ratón sin tratar fracasó debido al bajo nivel de expresión. Además se pudo demostrar la existencia de una segunda proteína más pequeña (aproximadamente 30 kDa) en el extracto proteico de riñón de ratones tratados con CoCl2. Esta proteína es específicamente reconocida por el anticuerpo anti-rhEPO como se muestra por el bloqueo completo de la interacción anticuerpo-antígeno con darbepoyetina A. Estos descubrimientos apoyan fuertemente la existencia de una isoforma de ajuste de eritropoyetina murina. Estos resultados se reprodujeron en una segunda cepa de ratón, es decir, C57Bl6.

Neuroprotección mediada por diferentes isoformas de la alfa hélice de eritropoyetina (figura 13)

- 45 Al analizar los potenciales neuroprotectores de las variantes de eritropoyetina identificadas hasta ahora sugerimos que la alfa hélice era el dominio funcionalmente importante para el carácter neuroprotector de la eritropoyetina. Para probar esta hipótesis expresamos una forma acortada de eritropoyetina humana, es decir el dominio alfa hélice, en células HEK 293 y probamos este péptido en nuestro modelo de POG. Encontramos un potencial protector equivalente con 30 pM y 15 pM de este péptido a 30 pM de hEPO como se muestra en la figura 13.

- 50 Para identificar los residuos funcionales importantes en los dominios de alfa hélice de eritropoyetina humana generamos diferentes mutantes de eritropoyetina que contenían bien intercambios de aminoácidos (hAmA y hAmE) o delecciones completas de dominio (hA-10 y hA-20).

- 55 Ni el intercambio de aminoácido neutro ni el ácido en la posición 41 era capaz de destruir el potencial neuroprotector de la alfa hélice en nuestro modelo de POG (figura 14).

Neuroprotección mediada por varias isoformas de EPO humana (n=6) $P^* < 0,05$; ANOVA1 frente al control (figura 14).

- 60 Las variantes de delección que carecen 10 o 20 aminoácidos en el extremo C de la alfa hélice se expresaron en células HEK293 y también se probaron en el modelo de POG. La variante de delección hA-10 tenía aún propiedades neuroprotectoras comparables con la isoforma de ajuste hS3. La delección de 20 aminoácidos (hA-20) produjo un péptido que ya no era neuroprotector (figura 15).

Inmunomodulación por variantes de eritropoyetina humana (figura 16)

65

Las variantes de EPO humana hS3 y hS4 muestran fuertes efectos inmunomoduladores. En macrófagos humanos estimulados con el lipopolisacárido (LPS) de endotoxina hS3 y hS4 inducen la citoquina antiinflamatoria IL-10 y reducen la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-8. Comparados con EPO (hWT) los efectos antiinflamatorios de hS3 y hS4 son mucho más pronunciados. Estas propiedades antiinflamatorias de las variantes de EPO son útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias (por ejemplo, esclerosis múltiple, infecciones víricas y bacterianas, septicemia) y degenerativas (por ejemplo, ictus, infartos de miocardio).

Lista de secuencias

<110> Charité - Universidad de Medicina de Berlín

<120> Variantes de ajuste de eritropoyetina

<130> U60011PCT

<160> 63

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 495

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
atgggggtgc acgaatgtcc tgccctggtg tggcttctcc tgcctctgct gtcgtccct 60
ctgggcctcc cagtcctggg cgcctcacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120
aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacgg tcgggcagca ggccgtagaa 180
gtctggcagg gcctggccct gctgtcgaa gctgtcctgc ggggccaggc cctgttggtc 240
aactcttccc agcctgaggga gcccctgcag ctgcctgtgg ataaagccgt cagtggcctt 300
cgcagcctca ccaactctgct tcgggctctg cgagccaga aggaagccat ctcccctcca 360
gatgcggcct cagctgtctc actccgaaca atcactgctg acactttccg caaactcttc 420
cgagtctact ccaatttcct ccggggaaaag ctgaagctgt acacagggga ggccctgcagg 480
acaggggaca gatga 495
```

<210> 2

<211> 164

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1          5          10          15
```

```
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20          25          30
```

```
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35          40          45
```

```
Ala Glu Asn Ile Thr Arg Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln
50          55          60
```

Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu
65 70 75 80

Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys
85 90 95

Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly
100 105 110

Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro
115 120 125

Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr
130 135 140

Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys
145 150 155

Arg Thr Gly Asp Arg
160 164

<210> 3
<211> 525
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 3
atgggggtgc acgaatgtcc tgccctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60
ctgggcctcc cagtcctggg cgcgccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120
agggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cgggctgtgc tgaacactgc 180
agcttgaatg agaatatcac tgtccagac accaaagtta atttctatgc ctggaagagg 240
atggagggtcg ggcagcaggc cctgttggtc aactcttccc agccgtggga gccctgcag 300
ctgcatgttg ataaagccgt cagtggcctt cgcagcctca ccactctgct tcgggctctg 360
ggagcccaga aggaagccat ctcccctcca gatgcggcct cagctgctcc actccgaaca 420
atcactgctg acactttccg caaactcttc cgagtctact ccaatttctt ccggggaaag 480
ctgaagctgt acacagggga ggccctgcagg acaggggaca gatga 525

<210> 4
<211> 174
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

ES 2 457 398 T3

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp
85 90 95

Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser
100 105 110

Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser
115 120 125

Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp
130 135 140

Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys
145 150 155 160

Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg
165 170

<210> 5
<211> 495
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 5
atgggggtgc acgaatgtcc tgccctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60
ctgggcctcc cagtctctggg cgcgccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120
aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cgggctgtgc tgaacactgc 180
agcttgaatg agaatatcac tgtcccagac accaaagtta atttctatgc cctgttggtc 240
aactcttccc agccgtggga gccctgcag ctgcatgtgg ataaagccgt cagtggcctt 300
cgcagcctca cactctgct tcgggctctg ggagcccaga aggaagccat ctcccctcca 360
gatgcggcct cagctgctcc actccgaaca atcactgctg acactttccg caaactcttc 420
cgagtctact ccaatttcct ccggggaaag ctgaagctgt acacagggga ggccctgcagg 480
acaggggaca gatga 495

10 <210> 6
<211> 164
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens

ES 2 457 398 T3

<400> 6

```

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1           5           10           15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20           25           30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35           40           45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50           55           60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Leu Leu Val
65           70           75           80

Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala
85           90           95

Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala
100          105          110

Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu
115          120          125

Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser
130          135          140

Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg
145          150          155          160

Thr Gly Asp Arg

```

<210> 7

5

<211> 489

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

10

```

atgggggtgc acgaatgtcc tgcttggtg tggtctctcc tgtccctgct gtcgctccct    60
ctgggcctcc cagtcctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagcgg agtcctggag    120
aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cgggctgtgc tgaacactgc    180

```

ES 2 457 398 T3

```

agcttgaatg agaatatcac tgtcccagac accaaagtta atttctatgc ctggaagagg      240
atggagccgt gggagcccct gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg ctttcgcagc      300
ctcaccactc tgcttcgggc tctgggagcc cagaaggaag ccattctccc tccagatgcg      360
gcctcagctg ctccactccg aacaatcact gctgacactt tccgcaaact cttccgagtc      420
tactccaatt tcctccgggg aaagctgaag ctgtacacag gggaggcctg caggacaggg      480
gacagatga                                                                    489

```

<210> 8
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 8
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1          5          10          15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20          25          30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35          40          45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50          55          60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65          70          75          80

Met Glu Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser
85          90          95

Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys
100         105         110

Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr
115         120         125

Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe
130         135         140

Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly
145         150         155         160

Asp Arg

```

<210> 9
 <211> 475
 <212> ADN

ES 2 457 398 T3

<213> Homo sapiens

<400> 9

```

atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct    60
ctgggcctcc cagtctctggg cgcctcacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag    120
aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cgggctgtgc tgaacactgc    180
agcttgaatg agaatatcac tgtcccaggc cctgttggtc aactcttccc agccgtggga    240
gcccctgcag ctgcatgtgg ataaagccgt cagtggcctt cgcagcctca ccactctgct    300
tcgggctctg ggagcccaga aggaagccat ctcctctcca gatgcggcct cagctgctcc    360
actccgaaca atcactgctg acactttccg caaactcttc cgagtctact ccaatttctt    420
ccgggggaaag ctgaagctgt acacagggga ggctgcagg acaggggaca gatga        475

```

5

<210> 10

<211> 87

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 10

```

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1              5              10              15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
      20              25              30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35              40              45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50              55              60

Asn Ile Thr Val Pro Gly Pro Val Gly Gln Leu Phe Pro Ala Val Gly
 65              70              75              80

Ala Pro Ala Ala Ala Cys Gly
      85

```

15

<210> 11

<211> 301

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 11

```

atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct    60

```

20

ctgggctcc cagtcctggg cgccccacca cgctcatct gtgacagccg agtcctggag 120
 aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cgggctgtgc tgaacactgc 180
 agcttgaatg agaacaatca ctgctgacac tttccgcaaa ctcttccgag tctactccaa 240
 tttcctccgg ggaaagctga agctgtacac aggggaggcc tgcaggacag gggacagatg 300
 a 301

<210> 12
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30
 Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45
 Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60
 Asn Asn His Cys
 65

<210> 13
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 13
 atgggggtgc ccgaacgtcc caccctgctg cttttactct ccttgctact gattcctctg 60
 ggctccccag tctctgtgctg tccccacgc ctcatctgcg acagtcgagt tctggagagg 120
 tacatcttag aggccaagga ggcagaaaat gtcacgatgg gttgtgcaga aggtcccaga 180
 ctgagtgaat atattacagt cccagatacc aaagtcaact tctatgcttg gaaaagaatg 240
 gagaaggaat tgatgtcgcc tccagatacc accccacctg ctccactccg aacactcaca 300
 gtggatactt tctgcaagct cttccgggtc tacgccaaact tctccggggg gaaactgaag 360
 ctgtacacgg gagaggtctg caggagaggg gacaggtga 399

<210> 14
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 14

ES 2 457 398 T3

Met Gly Val Pro Glu Arg Pro Thr Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ile Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Cys Ala Pro Pro Arg Leu Ile
20 25 30

Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Ile Leu Glu Ala Lys Glu Ala
35 40 45

Glu Asn Val Thr Met Gly Cys Ala Glu Gly Pro Arg Leu Ser Glu Asn
50 55 60

Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met
65 70 75 80

Glu Lys Glu Leu Met Ser Pro Pro Asp Thr Thr Pro Pro Ala Pro Leu
85 90 95

Arg Thr Leu Thr Val Asp Thr Phe Cys Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ala
100 105 110

Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Val Cys Arg
115 120 125

Arg Gly Asp Arg
130

<210> 15
<211> 387
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 15
atgggggtgc ccgaacgtcc caccctgctg cttttactct ccttgctact gattcctctg 60
ggcctcccag tcctctgtgc tccccacgc ctcatctgcg acagtcgagt tctggagagg 120
tacatcttag aggccaagga ggcagaaaat gtcacgatgg gttgtgcaga aggtcccaga 180
ctgagtgaat atattacagt cccagatacc aaagtcaact tctatgcttg gaaaagaatg 240
gaggtggaag aacaggccat agaagtttgg caaggcctgt cctgctctc agaagccatc 300
ctgcaggccc aggcctgct agccaacttc ctccggggga aactgaagct gtacacggga 360
gaggtctgca ggagagggga caggtga 387

<210> 16
<211> 128
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 16

ES 2 457 398 T3

Met Gly Val Pro Glu Arg Pro Thr Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ile Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Cys Ala Pro Pro Arg Leu Ile
20 25 30

Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Ile Leu Glu Ala Lys Glu Ala
35 40 45

Glu Asn Val Thr Met Gly Cys Ala Glu Gly Pro Arg Leu Ser Glu Asn
50 55 60

Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met
65 70 75 80

Glu Val Glu Glu Gln Ala Ile Glu Val Trp Gln Gly Leu Ser Leu Leu
85 90 95

Ser Glu Ala Ile Leu Gln Ala Gln Ala Leu Leu Ala Asn Phe Leu Arg
100 105 110

Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Val Cys Arg Arg Gly Asp Arg
115 120 125

<210> 17
<211> 513
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 17
atgggggtgc ccgaacgtcc caccctgctg cttttactct ccttgctact gattcctctg 60
ggcctcccag tcctctgtgc tccccacgc ctcactctgcg acagtcgagt tctggagagg 120
tacatcttag aggccaagga ggcagaaaat gtcacgatgg gttgtgcaga aggtcccaga 180
ctgagtgaaa atattacagt cccagatacc aaagtcaact tctatgcttg gaaaagaatg 240
gaggtggaag aacaggccat agaagtttgg caaggcctgt ccctgctctc agaagccatc 300
ctgcaggccc aggccctgct agccaattcc tcccagccac cagagaccct tcagcttcat 360
atagacaaag ccatcagtgg tctacgtagc ctcacttcac tgcttcgggt actgggagct 420
cagaaggaat tgatgtcgcc tccagatacc accccacctg ctccactccg aacactcaca 480
gtggatactt tctgcaggag aggggacagg tga 513

<210> 18
<211> 170
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 18

ES 2 457 398 T3

Met Gly Val Pro Glu Arg Pro Thr Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ile Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Cys Ala Pro Pro Arg Leu Ile
20 25 30

Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Ile Leu Glu Ala Lys Glu Ala
35 40 45

Glu Asn Val Thr Met Gly Cys Ala Glu Gly Pro Arg Leu Ser Glu Asn
50 55 60

Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met
65 70 75 80

Glu Val Glu Glu Gln Ala Ile Glu Val Trp Gln Gly Leu Ser Leu Leu
85 90 95

Ser Glu Ala Ile Leu Gln Ala Gln Ala Leu Leu Ala Asn Ser Ser Gln
100 105 110

Pro Pro Glu Thr Leu Gln Leu His Ile Asp Lys Ala Ile Ser Gly Leu
115 120 125

Arg Ser Leu Thr Ser Leu Leu Arg Val Leu Gly Ala Gln Lys Glu Leu
130 135 140

Met Ser Pro Pro Asp Thr Thr Pro Pro Ala Pro Leu Arg Thr Leu Thr
145 150 155 160

Val Asp Thr Phe Cys Arg Arg Gly Asp Arg
165 170

<210> 19

<211> 279

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 19

atgggggtgc ccgaacgtcc caccctgctg cttttactct ccttgctact gattcctctg 60

ggcctcccag tcctctgtgc tccccacgc ctcactctgcg acagtcgagt tctggagagg 120

tacatcttag aggccaagga ggcagaaaat gtcacgatgg gttgtgcaga aggtcccaga 180

ctgagtgaaa atattacagt ccagataacc aaagtcaact tcctccgggg gaaactgaag 240

ctgtacacgg gagaggctctg caggagaggg gacaggtga 279

<210> 20

<211> 92

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 457 398 T3

<400> 20

Met Gly Val Pro Glu Arg Pro Thr Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ile Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Cys Ala Pro Pro Arg Leu Ile
20 25 30

Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Ile Leu Glu Ala Lys Glu Ala
35 40 45

Glu Asn Val Thr Met Gly Cys Ala Glu Gly Pro Arg Leu Ser Glu Asn
50 55 60

Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys
65 70 75 80

Leu Tyr Thr Gly Glu Val Cys Arg Arg Gly Asp Arg
85 90

- 5 <210> 21
- <211> 591
- <212> ADN
- <213> Mus musculus

10 <400> 21
atgggggtgc ccgaacgtcc caccctgctg cttttactct ccttgctact gattcctctg 60
ggcctcccag tcctctgtgc tccccacgc ctcatctgcg acagtcgagt tctggagagg 120
tacatcttag aggccaagga ggcagaaaat gtcacgatgg gttgtgcaga aggtcccaga 180
ctgagtgaat atattacagt ccagataacc aaagtcaact tctatgcttg gaaaagaatg 240
gaggtggaag aacaggccat agaagtttgg caaggcctgt ccctgctctc agaagctgta 300
cacgggagag gtctgcagga gaggggacag gtgacatgct gctgccaccg tgggtggaccg 360
acgaacttgc tccccgtcac tgtgtcatgc caaccctcca ccactccaa ccctcatcaa 420
acgggtcatt accttcttac cagtctgtcc catggacact ccagcaccag cagtgcacac 480
ctcggggcca gaagaacttc ccagagctcc attctgaaat ctaaagatgt cgctggacaa 540
gcccgaggcc ccagagaaga agagcctcag aatcagctcg gatttgttta g 591

- 15 <210> 22
- <211> 196
- <212> PRT
- <213> Mus musculus

<400> 22

ES 2 457 398 T3

Met Gly Val Pro Glu Arg Pro Thr Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ile Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Cys Ala Pro Pro Arg Leu Ile
20 25 30

Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Ile Leu Glu Ala Lys Glu Ala
35 40 45

Glu Asn Val Thr Met Gly Cys Ala Glu Gly Pro Arg Leu Ser Glu Asn
50 55 60

Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met
65 70 75 80

Glu Val Glu Glu Gln Ala Ile Glu Val Trp Gln Gly Leu Ser Leu Leu
85 90 95

Ser Glu Ala Val His Gly Arg Gly Leu Gln Glu Arg Gly Gln Val Thr
100 105 110

Cys Cys Cys His Arg Gly Gly Pro Thr Asn Leu Leu Pro Val Thr Val
115 120 125

Ser Cys Gln Pro Ser Thr Thr Pro Asn Pro His Gln Thr Gly His Tyr
130 135 140

Leu Leu Thr Ser Leu Ser His Gly His Ser Ser Thr Ser Ser Asp Ile
145 150 155 160

Leu Gly Ala Arg Arg Thr Ser Gln Ser Ser Ile Leu Lys Ser Lys Asp
165 170 175

Val Ala Gly Gln Ala Arg Gly Pro Arg Glu Glu Glu Pro Gln Asn Gln
180 185 190

Leu Gly Phe Val
195

<210> 23

<211> 159

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 23

atgggggtgc acgaatgtcc tgccctggctg tggtctctcc tgtccctgct gtcgctccct 60

ctgggcctcc cagtcctggg cgccccacca cgccctcatct gtgacagccg agtcctggag 120

aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacg 159

<210> 24

<211> 53
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 24
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45
Ala Glu Asn Ile Thr
50

<210> 25
<211> 246
10 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 25
atgggggtgc acgaatgtcc tgccctggctg tggtttctcc tgccctgct gtcgctccct 60
ctgggcctcc cagtcctggg cgtccaccca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120
aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cgggctgtgc tgaacactgc 180
agcttgaatg agaatatcac tgtcccagac accaaagtta atttctatgc ctggaagagg....240
atggag 246

15 <210> 26
<211> 82
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 26
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60
Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu

25 <210> 27

ES 2 457 398 T3

<211> 243
<212> ADN
<213> Mus musculus

5 <400> 27
atgggggtgc ccgaacgtcc caccctgctg cttttactct ccttgctact gattcctctg 60
ggcctcccag tcctctgtgc tccccacgc ctcactcgcg acagtcgagt tctggagagg 120
tacatcttag aggccaagga ggcagaaaat gtcacgatgg gttgtgcaga aggtcccaga 180
ctgagtgaat atattacagt cccagatacc aaagtcaact tctatgcttg gaaaagaatg 240
gag 243

<210> 28
<211> 81
<212> PRT
<213> Mus musculus

10 <400> 28
Met Gly Val Pro Glu Arg Pro Thr Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu
1 5 10 15
Leu Ile Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Cys Ala Pro Pro Arg Leu Ile
20 25 30
Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Ile Leu Glu Ala Lys Glu Ala
35 40 45
Glu Asn Val Thr Met Gly Cys Ala Glu Gly Pro Arg Leu Ser Glu Asn
50 55 60
Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met
65 70 75 80
Glu

15 <210> 29
<211> 326
<212> ADN
<213> Mus musculus

20 <400> 29
atgggggtgc ccgaacgtcc caccctgctg cttttactct ccttgctact gattcctctg 60
ggcctcccag tcctctgtgc tccccacgc ctcactcgcg acagtcgagt tctggagagg 120
tacatcttag aggccaagga ggcagaaaat gtcacgatgg gttgtgcaga aggtcccaga 180
ctgagtgaat atattacagt cccagatacc aaagtcaact tctatgcttg gaaaagaatg 240
gaggtggaag aacaggccat agaagtttgg caaggcctgt ccctgctctc agaagccatc 300
ctgcaggccc aggcctgct agccaa 326

25 <210> 30
<211> 109
<212> PRT

ES 2 457 398 T3

<213> Mus musculus

<400> 30

Met Gly Val Pro Glu Arg Pro Thr Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ile Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Cys Ala Pro Pro Arg Leu Ile
20 25 30

Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Ile Leu Glu Ala Lys Glu Ala
35 40 45

Glu Asn Val Thr Met Gly Cys Ala Glu Gly Pro Arg Leu Ser Glu Asn
50 55 60

Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met
65 70 75 80

Glu Val Glu Glu Gln Ala Ile Glu Val Trp Gln Gly Leu Ser Leu Leu
85 90 95

Ser Glu Ala Ile Leu Gln Ala Gln Ala Leu Leu Ala Asn
100 105

5

<210> 31

<211> 336

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<400> 31

gtcggggcagc aggccgtaga agtctggcag ggcctggccc tgctgtcgga agctgtcctg 60
cgggggccagg ccctgttggc caactcttcc cagccgtggg agcccctgca gctgcatgtg 120
gataaagccg tcagtggcct tcgcagcctc accactctgc ttctgggctct gggagcccag 180
gataaagccg tcagtggcct tcgcagcctc accactctgc ttctgggctct gggagcccag 180
aaggaagcca tctccctcc agatgcggcc tcagctgctc cactccgaac aatcactgct 240
gacactttcc gcaaactctt ccgagtctac tocaatttcc tccggggaaa gctgaagctg 300
tacacagggg aggcctgcag gacaggggac agatga 336

15

<210> 32

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 32

~~Arg~~ Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln
 20 25 30
 Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu
 35 40 45
 Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala
 50 55 60
 Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr
 65 70 75
 Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg
 80 85 90 95
 Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 100 105 110

<210> 33
 <211> 243
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 ccgtgggagccccctgcagc tgcattgtgga taaagccgtc agtggccttc gcagcctcac cactctgctt 69
 cgggctcttg gagcccagaa ggaagccatc tcccctccag atgcggcctc agctgctcca 129
 ctccgaacaa tcaactgctga cactttccgc aaactcttcc gactctactc caatttcctc 189
 cggggaaagc tgaagctgta cacaggggag gcctgcagga caggggacag atga 243

<210> 34
 <211> 80

<400> 34
 Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu
 1 5 10 15
 Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala
 20 25 30
 Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr
 35 40 45
 Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg
 50 55 60
 Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 65 70 75 80

ES 2 457 398 T3

<210> 35
 <211> 156
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 35
 aaggaattga tgtcgctcc agataccacc ccacctgctc cactccgaac actcacagtg 60
 gatactttct gcaagctctt ccgggtctac gccaaacttc tccgggggaa actgaagctg 120
 tacacgggag aggtctgcag gagaggggac aggtga 156

10

<210> 36
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 36
 Lys Glu Leu Met Ser Pro Pro Asp Thr Thr Pro Pro Ala Pro Leu Arg
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Val Asp Thr Phe Cys Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ala Asn
 20 25 30
 Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Val Cys Arg Arg
 35 40 45
 Gly Asp Arg
 50

15

<210> 37
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

20

<400> 37
 cttcctccgg gggaaactga agctgtacac gggagaggtc tgcaggagag gggacaggtg 60
 a 61

25

<210> 38
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30

<400> 38
 Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Val Cys Arg Arg
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg

35

<210> 39
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

40

<400> 39

	gaacttccaa ggatgaagac ttgcagc	27
5	<210> 40 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 40 gtggcagcag catgtcacct gtc	23
15	<210> 41 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 41 tatggatcca tgggggtgcc cgaacgtccc ac	32
25	<210> 42 <211> 33 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Cebador de PCR	
35	<400> 42 tatggatcct cacctgtccc ctctcctgca gac	33
40	<210> 43 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador de PCR	
45	<400> 43 gtcgtgactg ggaaaaccct ggcg	24
50	<210> 44 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador de PCR	
55	<400> 44 agcggataac aatttcacac agga	24
60	<210> 45 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador de PCR	

	<400> 45 gatgggggtg cacgaatgtc ctgc	24
5	<210> 46 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 46 cacacctggt catctgtccc ctgtc	25
15	<210> 47 <211> 33 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 47 aaagaattcc ctgtccctc tcctgcagac etc	33
25	<210> 48 <211> 29 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Cebador de PCR	
35	<400> 48 tatggatcca tgggggtgca cgaatgtcc	29
40	<210> 49 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 49 agagaattct ctgtccctg tcctgcag	28
50	<210> 50 <211> 53 <212> PRT <213> Homo sapiens	
	<400> 50	

ES 2 457 398 T3

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr
50

5 <210> 51
<211> 53
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Mutación puntual en Homo sapiens

<400> 51
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Ala Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr
50

15 <210> 52
<211> 53
<212> PRT
<213> artificial

20 <220>
<223> Mutación puntual en Homo sapiens

<400> 52
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Glu Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr
50

25 <210> 53
<211> 43

<212> PRT
<213> artificial

<220>

5 <223> Mutante de delección ha-10 de Homo sapiens

<400> 53

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
35 40

10 <210> 54
<211> 33
<212> PRT
<213> artificial

15 <220>

<223> Mutante de delección hA-20 de Homo sapiens

<400> 54

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile

20 <210> 55
<211> 159
<212> ADN
<213> Homo sapiens

25 <400> 55

atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggtttctcc tgcctctgct gtcgctccct 60

ctgggcctcc cagtcctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120

aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacg 159

30 <210> 56
<211> 159
<212> ADN
<213> artificial

<220>

35 <223> hAmA (mutante de alanina de la hélice A de hWT-EPO)

<400> 56

atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggtttctcc tgcctctgct gtcgctccct 60

ctgggcctcc cagtcctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120

gcgtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacg 159

<210> 57
 <211> 159
 <212> ADN
 5 <213> artificial

 <220>
 <223> hAmE (mutante de ácido glutámico de la hélice A de hWT-EPO)

 10 <400> 57
 atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60
 ctgggcctcc cagtcctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120
 gagtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacg 159
 ctgggcctcc cagtcctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120
 gagtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacg 159

 15 <210> 58
 <211> 129
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 20 <223> hA-10 (hélice A de hWT-EPO menos 10 aa)

 <400> 58
 atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60
 ctgggcctcc cagtcctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120
 aggtacctc 129

 25 <210> 59
 <211> 99
 <212> ADN
 <213> artificial

 30 <220>
 <223> hA-20 (hélice A de hWT-EPO menos 20 aa)

 <400> 59
 atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60
 ctgggcctcc cagtcctggg cgccccacca cgcctcatc 99

 35 <210> 60
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

 40 <400> 60
 gccccaccacg cctcatctgt gacagccgag tctgggagag gtacctcttg gaggccaagg
 aggccgagaa tatcacg 78

 45 <210> 61
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 61

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu
1 5 10 1518

Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr

20

25

<210> 62

5 <211> 27

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 62

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly

10

20

25

<210> 63

<211> 81

<212> ADN

15 <213> homo sapiens

<400> 63

atgggggtgc acgaatgtcc tgccctggctg tggcttctcc tgcacctgct gtcgctccct 60

ctgggcctcc .cagtcctggg c 81

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que codifica una variante de eritropoyetina (EPO) seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) polinucleótidos que codifican la forma madura de los polipéptidos denominados hs3, h1-4, h1-5, hs4, h1-1, h2-1, mS, mG3, mG5, m301, mK3, ha, hAma, hAmE y hA-10 que tienen la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 50, 51, 52, y 53, respectivamente;
- (b) un polinucleótido que codifica la forma madura del polipéptido denominado secuencia ha sin líder que consiste en la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en SEQ ID NO: 61;
- (c) polinucleótidos que tienen la secuencia codificante, como se muestra en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 55, 56, 57 y 58 que codifican al menos la forma madura del polipéptido;
- (d) un polinucleótido que consiste en la secuencia codificante, como se muestra en SEQ ID NO: 60 que codifica la forma madura del polipéptido denominado secuencia ha sin líder;
- (e) polinucleótidos que codifican una versión humanizada de los polipéptidos mS, mG3, mG5, m301 y mK3 que consisten en la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, y 22;
- (f) polinucleótidos que codifican un polipéptido que comprende una fusión de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 24, 26, 28 y 30, en el extremo N de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 32, 34, 36 y 38, en donde dicha fusión tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora, pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;
- (g) polinucleótidos que comprenden una fusión de secuencias polinucleotídicas seleccionadas del grupo de secuencias polinucleotídicas mostradas en SEQ ID NO: 23, 25, 27 y 29, en 5' de una secuencia polinucleotídica seleccionada del grupo de secuencias polinucleotídicas mostradas en SEQ ID: 31, 33, 35 y 37, en donde dicha fusión tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;
- (h) polinucleótidos que codifican un derivado de un polipéptido codificado por un polinucleótido de cualquiera de (a) a (g), en donde en dicho derivado entre 1 y 10 residuos de aminoácidos están conservadoramente sustituidos comparado con dicho polipéptido, y dicho derivado tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;
- (i) polinucleótidos que codifican un fragmento de un polipéptido n codificado por un polinucleótido de cualquiera de (a) a (h), en donde en dicho fragmento entre 1 y 10 aminoácidos se delecionan N- y/o C-terminalmente y/o entre 1 y 10 aminoácidos se delecionan N- y/o C-terminalmente de la unión comparado con dicho polipéptido, y dicho fragmento tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;
- (j) polinucleótidos que son al menos el 95% idénticos a un polinucleótido como se ha definido en cualquiera de (a) a (d) y que al mismo tiempo tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;
- (k) polinucleótidos cuya hebra complementaria hibrida en condiciones rigurosas a un polinucleótido como se ha definido en cualquiera de (a) a (j) y que codifica un polipéptido que tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;
- (l) polinucleótidos que codifican un polipéptido variante de EPO, que comprende una parte N-terminal de EPO de longitud completa que incluye la hélice A y que carece al menos de uno de los siguientes:
 - (i) un fragmento de al menos 10 aminoácidos entre la hélice A y la hélice B;
 - (ii) un fragmento de al menos 10 aminoácidos de la hélice B;
 - (iii) un fragmento de al menos 6 aminoácidos entre la hélice B y la hélice C;
 - (iv) un fragmento de al menos 10 aminoácidos de la hélice C;
 - (v) un fragmento de al menos 20 aminoácidos entre la hélice C y la hélice D; y/o
 - (vi) un fragmento de al menos 10 aminoácidos de la hélice D;
 en donde dicha variante tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;
- (m) polinucleótidos que codifican un derivado de un polipéptido codificado por un polinucleótido de cualquiera de (l), en donde en dicho derivado entre 1 y 10 residuos de aminoácidos están conservadoramente sustituidos comparados con dicho polipéptido, y dicho derivado tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética;
- (n) polinucleótidos cuya hebra complementaria hibrida en condiciones rigurosas con polinucleótidos como se han definido en cualquiera de (l) a (m) y que codifican un polipéptido que tiene actividad protectora de células y en particular neuroprotectora pero esencialmente ninguna actividad hematopoyética; o la hebra complementaria de tal polinucleótido.

2. El polinucleótido de la reivindicación 1 que es ADN, ADN genómico o ARN.

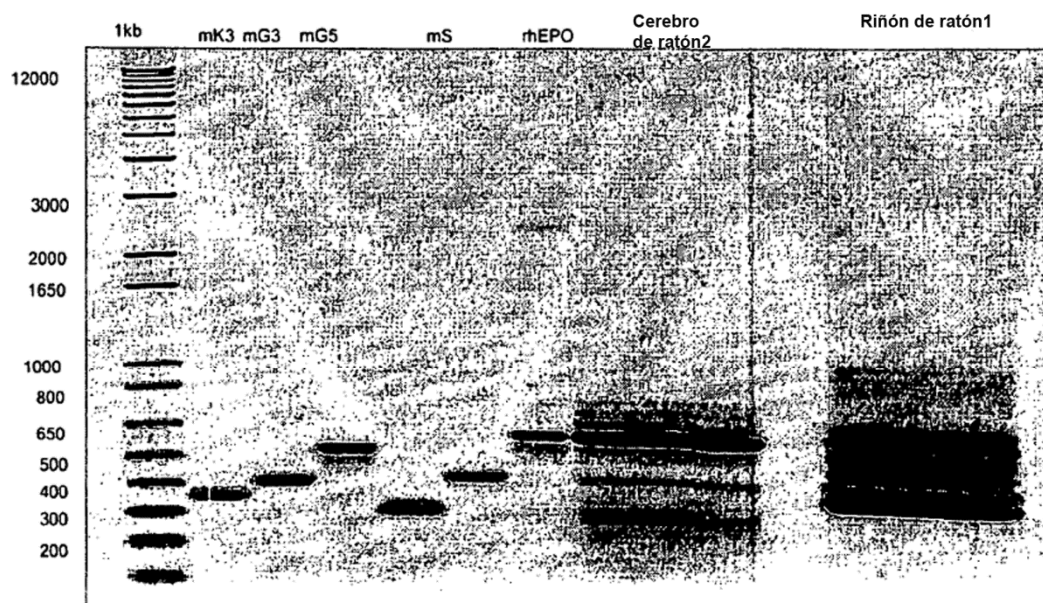
3. Un vector que contienen el polinucleótido de la reivindicación 1 o 2.

4. El vector de la reivindicación 3 en el que el polinucleótido está operativamente unido a secuencias de control de la expresión que permiten la expresión en células huésped procariotas y/o eucariotas.

5. Una célula huésped genéticamente manipulada con el polinucleótido de la reivindicación 1 o 2 o el vector de la reivindicación 3 o 4.
- 5 6. Un mamífero transgénico no humano seleccionado del grupo de primate no humano, caballo, bovino, oveja, cabra, cerdo, perro, gato, conejo, ratón, rata, cobaya, hámster y gerbillo que comprende el polinucleótido de la reivindicación 1 o 2, un vector de la reivindicación 3 o 4 y/o una célula huésped de la reivindicación 5.
- 10 7. Un proceso para producir un polipéptido variante de EPO codificado por el polinucleótido de la reivindicación 1 o 2 que comprende: cultivar la célula huésped de la reivindicación 5 y recuperar el polipéptido codificado por dicho polinucleótido.
- 15 8. El proceso de la reivindicación 7, que comprende además el paso de modificar dicha variante de EPO, en donde la modificación se selecciona del grupo que consiste en oxidación, sulfatación, fosforilación, adición de oligosacáridos o combinaciones de las mismas.
- 20 9. Un proceso para producir células capaces de expresar al menos una de las variantes de EPO que comprende manipular genéticamente células *in vitro* con el vector de la reivindicación 3 o 4, en donde dicho(s) polipéptido(s) variante(s) de EPO está(n) codificado(s) por el polinucleótido de la reivindicación 1 o 2.
- 25 10. Un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por el polinucleótido de la reivindicación 1 o 2 u obtenible por el proceso de la reivindicación 7 u 8.
11. Composición farmacéutica que comprende el polinucleótido de la reivindicación 1 o 2, un vector de la reivindicación 3 o 4, una célula huésped de la reivindicación 5, y/o un polipéptido de la reivindicación 10 y uno o más soportes farmacéuticamente aceptables.
- 30 12. Uso del polinucleótido de la reivindicación 1 o 2, un vector de la reivindicación 3 o 4, una célula huésped de la reivindicación 5, o un polipéptido de la reivindicación 10 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una afección asociada con daño tisular debido a muerte celular.
- 35 13. Uso según la reivindicación 12, en donde dicha muerte celular está inducida por isquemia, hipoxia, infección bacteriana, infección vírica, inducida autoinmunitaria, traumática, químicamente o inducida por radiación.
- 40 14. Uso según las reivindicaciones 12 o 13, en donde dicha afección es un trastorno neurodegenerativo y/o neuroinflamatorio agudo o crónico, es un trastorno agudo o crónico del corazón, pulmón, riñón, hígado o páncreas o dicha afección está asociada con un trasplante de órgano o células.
- 45 15. Uso según la reivindicación 14, en donde dicho trastorno neurodegenerativo y/o neuroinflamatorio agudo se selecciona del grupo que consiste en isquemia o infarto cerebral incluyendo oclusión embólica y oclusión trombótica, reperusión después de isquemia aguda, lesión hipóxica-isquémica perinatal, paro cardíaco, hemorragia intracraneal, hemorragia subaracnoidea y lesiones intracraneales, lesiones de la médula espinal, lesiones intravertebrales, síndrome del niño zarandeado, encefalitis infecciosa, meningitis, y dolor de cabeza.
- 50 16. Uso según la reivindicación 14, en donde dicho trastorno neurodegenerativo y/o neuroinflamatorio crónico se selecciona del grupo que consiste en demencias, enfermedad de Pick, enfermedad con cuerpos de Lewy difusos, parálisis supranuclear progresiva (síndrome de Steele-Richardson), esclerosis múltiple, atrofia de sistemas múltiples, afecciones epilépticas crónicas asociadas con neurodegeneración, enfermedades de neuronas motoras, ataxias degenerativas, degeneración basal cortical, complejo de demencia de ELA-Parkinson de Guam, panencefalitis esclerosante subaguda, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, sinucleinopatías, afasia progresiva primaria, degeneración nigroestriatal, enfermedad de Machado-Joseph/ataxia espinocerebelar de tipo 3 y degeneraciones olivopontocerebrales, enfermedad de Gilles de La Tourette, parálisis bulbar y pseudobulbar, atrofia muscular raquídea y bulborraquídea (enfermedad de Kennedy), esclerosis lateral primaria, paraplejía espástica familiar, enfermedad de Werdnig-Hoffman, enfermedad de Kugelberg-Welander, enfermedad de Tay-Sach, enfermedad de Sandhoff, enfermedad espástica familiar, paraparesia espástica, leucoencefalopatía multifocal progresiva, disautonomía familiar (síndrome de Riley-Day), polineuropatías, enfermedades por priones, adicción, trastornos afectivos, trastornos esquizofrénicos, síndrome de fatiga crónica, dolor crónico.
- 55 17. Uso según las reivindicaciones 13 o 14, en donde dicha afección es envejecimiento.
- 60 18. Uso según las reivindicaciones 13 o 14, en donde el medicamento se administra antes de o después del inicio de dicha afección.

Fig. 1

A



B

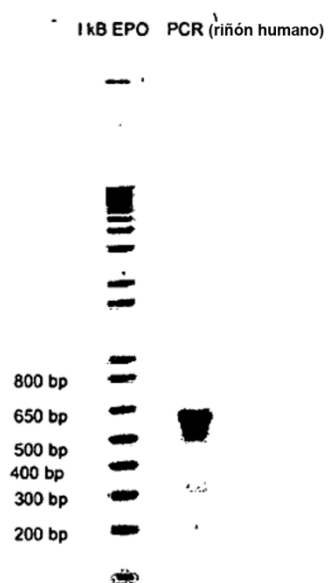


Fig. 2a

mEpo	atgggggtgccgaacgtcccacctgctgcttttactctccttgctactgattc	55
mS	atgggggtgccgaacgtcccacctgctgcttttactctccttgctactgattc	55
mG3	atgggggtgccgaacgtcccacctgctgcttttactctccttgctactgattc	55
mG5	atgggggtgccgaacgtcccacctgctgcttttactctccttgctactgattc	55
m301	atgggggtgccgaacgtcccacctgctgcttttactctccttgctactgattc	55
mK3	atgggggtgccgaacgtcccacctgctgcttttactctccttgctactgattc	55
mEpo	ctctgggcctcccagtcctctgtgctccccacgcctcatctgcgacagtcgagt	110
mS	ctctgggcctcccagtcctctgtgctccccacgcctcatctgcgacagtcgagt	110
mG3	ctctgggcctcccagtcctctgtgctccccacgcctcatctgcgacagtcgagt	110
mG5	ctctgggcctcccagtcctctgtgctccccacgcctcatctgcgacagtcgagt	110
m301	ctctgggcctcccagtcctctgtgctccccacgcctcatctgcgacagtcgagt	110
mK3	ctctgggcctcccagtcctctgtgctccccacgcctcatctgcgacagtcgagt	110
mEpo	tctggagaggtacatcttagaggccaaggaggcagaaaatgtcacgatgggtgt	165
mS	tctggagaggtacatcttagaggccaaggaggcagaaaatgtcacgatgggtgt	165
mG3	tctggagaggtacatcttagaggccaaggaggcagaaaatgtcacgatgggtgt	165
mG5	tctggagaggtacatcttagaggccaaggaggcagaaaatgtcacgatgggtgt	165
m301	tctggagaggtacatcttagaggccaaggaggcagaaaatgtcacgatgggtgt	165
mK3	tctggagaggtacatcttagaggccaaggaggcagaaaatgtcacgatgggtgt	165
mEpo	gcagaagggtcccagactgagtgaataattacagtcccagataccaaagtcaact	220
mS	gcagaagggtcccagactgagtgaataattacagtcccagataccaaagtcaact	220
mG3	gcagaagggtcccagactgagtgaataattacagtcccagataccaaagtcaact	220
mG5	gcagaagggtcccagactgagtgaataattacagtcccagataccaaagtcaact	220
m301	gcagaagggtcccagactgagtgaataattacagtcccagataccaaagtcaact	220
mK3	gcagaagggtcccagactgagtgaataattacagtcccagataccaaagtcaact	220
mEpo	tctatgcttggaagaagaatggaggtggaagaacaggccatagaagtttggcaagg	275
mS	tctatgcttggaagaagaatggag-----	243
mG3	tctatgcttggaagaagaatggaggtggaagaacaggccatagaagtttggcaagg	275
mG5	tctatgcttggaagaagaatggaggtggaagaacaggccatagaagtttggcaagg	275
m301	tc-----	222
mK3	tctatgcttggaagaagaatggaggtggaagaacaggccatagaagtttggcaagg	275
mEpo	cctgtccctgctctcagaagccatcctgcaggcccaggccctgctagccaattcc	330
mS	-----	-
mG3	cctgtccctgctctcagaagccatcctgcaggcccaggccctgctagccaa----	326
mG5	cctgtccctgctctcagaagccatcctgcaggcccaggccctgctagccaattcc	330
m301	-----	-
mK3	cctgtccctgctctcagaagc-----	296
mEpo	tcccagccaccagagacccttcagcttcatatagacaaagccatcagtggtctac	385
mS	-----	-
mG3	-----	-
mG5	tcccagccaccagagacccttcagcttcatatagacaaagccatcagtggtctac	385
m301	-----	-
mK3	:-----:	-

Fig. 2b

mEpo	gtagcctcacttcactgcttcgggtactgggagctcagaaggaattgatgtcgcc	440
mS	-----aaggaattgatgtcgcc	260
mG3	-----	-
mG5	gtagcctcacttcactgcttcgggtactgggagctcagaaggaattgatgtcgcc	440
m301	-----	-
mK3	-----	-
mEpo	tccagataccacccccacctgctccactccgaacactcacagtggatactttctgc	495
mS	tccagataccacccccacctgctccactccgaacactcacagtggatactttctgc	315
mG3	-----	-
mG5	tccagataccacccccacctgctccactccgaacactcacagtggatactttctgc	495
m301	-----	-
mK3	-----	-
mEpo	aagctcttcgggtctacgccaacttcctccgggggaaactgaagctgtacacgg	550
mS	aagctcttcgggtctacgccaacttcctccgggggaaactgaagctgtacacgg	370
mG3	-----cttcctccgggggaaactgaagctgtacacgg	358
mG5	a-----	496
m301	-----ctccgggggaaactgaagctgtacacgg	250
mK3	-----tgtacacgg	305
mEpo	gagaggtctgcaggagaggggacaggtga	579
mS	gagaggtctgcaggagaggggacaggtga	399
mG3	gagaggtctgcaggagaggggacaggtga	387
mG5	-----ggagaggggacaggtga	513
m301	gagaggtctgcaggagaggggacaggtga	279
mK3	gagaggtctgcaggagaggggacaggtgacatgctgctgccaccgtggtggaccg	360
mEpo	-----	
mK3	acgaacttgctccccgtcactgtgtcatgccaacctccaccactcccaaccctc	415
mEpo	-----	
mK3	atcaaacgggtcattaccttcttaccagtctgtcccatggacactccagcaccag	470
mEpo	-----	
mK3	cagtgacatcctcggggccagaagaacttcccagagctccattctgaaatctaaa	525
mEpo	-----	
mK3	gatgtcgctggacaagccccgaggccccagagaagaagagcctcagaatcagctcg	580
mEpo	-----	
mK3	gatttgtttag	591

Fig. 3a

hWT atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgtccctctgggcctcccagtc
 hS3 atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgtccctctgggcctcccagtc
 h1-4 atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgtccctctgggcctcccagtc
 h1-5 atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgtccctctgggcctcccagtc
 hS4 atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgtccctctgggcctcccagtc
 h1-1 atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgtccctctgggcctcccagtc
 h2-1 atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgtccctctgggcctcccagtc

hWT ctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggtacctcttggaggccaaggaggccgag
 hS3 ctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggtacctcttggaggccaaggaggccgag
 h1-4 ctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggtacctcttggaggccaaggaggccgag
 h1-5 ctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggtacctcttggaggccaaggaggccgag
 hS4 ctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggtacctcttggaggccaaggaggccgag
 h1-1 ctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggtacctcttggaggccaaggaggccgag
 h2-1 ctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggtacctcttggaggccaaggaggccgag

hWT aatatcacgacgggctgtgctgaacactgcagcttgaatgagaatatcactgtcccagacaccaaagttaatttc
 hS3 aatatcacg-----
 h1-4 aatatcacgacgggctgtgctgaacactgcagcttgaatgagaatatcactgtcccagacaccaaagttaatttc
 h1-5 aatatcacgacgggctgtgctgaacactgcagcttgaatgagaatatcactgtcccagacaccaaagttaatttc
 hS4 aatatcacgacgggctgtgctgaacactgcagcttgaatgagaatatcactgtcccagacaccaaagttaatttc
 h1-1 aatatcacgacgggctgtgctgaacactgcagcttgaatgagaatatcactgtcccag-----
 h2-1 aatatcacgacgggctgtgctgaacactgcagcttgaatgagaa-----

hWT tatgcctggaagaggatggaggctcgggcagcaggccgtagaagctctggcaggccctggccctgctgtcggaagct
 hS3 -----gtcgggcagcaggccgtagaagctctggcaggccctggccctgctgtcggaagct
 h1-4 tatgcctggaagaggatggaggctcgggcagcaggcc-----
 h1-5 tatgcc-----
 hS4 tatgcctggaagaggatggag-----
 h1-1 -----
 h2-1 -----

hWT gtcctgcggggccaggccctgttggtcaactcttcccagccgtgggagccctgcagctgcatgtggataaaagcc
 hS3 gtcctgcggggccaggccctgttggtcaactcttcccagccgtgggagccctgcagctgcatgtggataaaagcc
 h1-4 -----ctgttggtcaactcttcccagccgtgggagccctgcagctgcatgtggataaaagcc
 h1-5 -----ctgttggtcaactcttcccagccgtgggagccctgcagctgcatgtggataaaagcc
 hS4 -----ccgtgggagccctgcagctgcatgtggataaaagcc
 h1-1 -----gccctgttggtcaactcttcccagccgtgggagccctgcagctgcatgtggataaaagcc
 h2-1 -----

418

hWT gtcagtggccttcgcagcctcaccactctgcttcgggctctgggagccagaaggaagccatctcccctccagat
 hS3 gtcagtggccttcgcagcctcaccactctgcttcgggctctgggagccagaaggaagccatctcccctccagat
 h1-4 gtcagtggccttcgcagcctcaccactctgcttcgggctctgggagccagaaggaagccatctcccctccagat
 h1-5 gtcagtggccttcgcagcctcaccactctgcttcgggctctgggagccagaaggaagccatctcccctccagat
 hS4 gtcagtggccttcgcagcctcaccactctgcttcgggctctgggagccagaaggaagccatctcccctccagat
 h1-1 gtcagtggccttcgcagcctcaccactctgcttcgggctctgggagccagaaggaagccatctcccctccagat
 h2-1 -----

hWT ggggcctcagctgctccactccgaacaatcactgctgacactttccgcaaactcttccgagctactccaatttc
 hS3 ggggcctcagctgctccactccgaacaatcactgctgacactttccgcaaactcttccgagctactccaatttc
 h1-4 ggggcctcagctgctccactccgaacaatcactgctgacactttccgcaaactcttccgagctactccaatttc
 h1-5 ggggcctcagctgctccactccgaacaatcactgctgacactttccgcaaactcttccgagctactccaatttc
 hS4 ggggcctcagctgctccactccgaacaatcactgctgacactttccgcaaactcttccgagctactccaatttc
 h1-1 ggggcctcagctgctccactccgaacaatcactgctgacactttccgcaaactcttccgagctactccaatttc
 h2-1 -----caatcactgctgacactttccgcaaactcttccgagctactccaatttc

Fig 3b

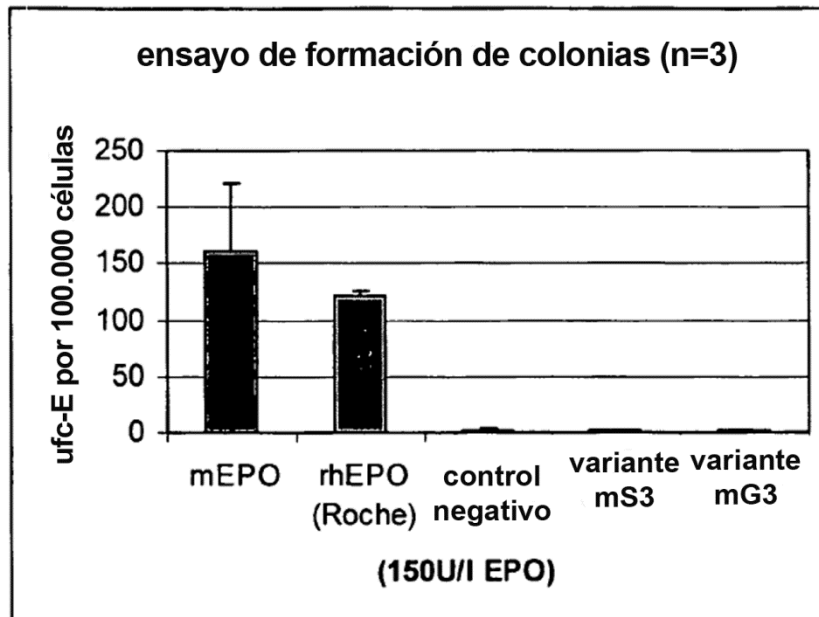
```
hWT  ctccggggaaagctgaagctgtacacaggggaggcctgcaggacaggggacagatga
hS3  ctccggggaaagctgaagctgtacacaggggaggcctgcaggacaggggacagatga
h1-4 ctccggggaaagctgaagctgtacacaggggaggcctgcaggacaggggacagatga
h1-5 ctccggggaaagctgaagctgtacacaggggaggcctgcaggacaggggacagatga
hS4  ctccggggaaagctgaagctgtacacaggggaggcctgcaggacaggggacagatga
h1-1 ctccggggaaagctgaagctgtacacaggggaggcctgcaggacaggggacagatga
h2-1 ctccggggaaagctgaagctgtacacaggggaggcctgcaggacaggggacagatga
```

Fig. 4

Afinidad de hélice	Hélice A x xx	B' x	Hélice B x
hWT	MGVHECPAWLWLLLSLSPLGLPVLGAPPRLLCDLRLVRLYLLEAKEAENITTCGAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVN		
hS3	MGVHECPAWLWLLLSLSPLGLPVLGAPPRLLCDLRLVRLYLLEAKEAENITTCGAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVN		
h1-4	MGVHECPAWLWLLLSLSPLGLPVLGAPPRLLCDLRLVRLYLLEAKEAENITTCGAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVN		
h1-5	MGVHECPAWLWLLLSLSPLGLPVLGAPPRLLCDLRLVRLYLLEAKEAENITTCGAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVN		
hS4	MGVHECPAWLWLLLSLSPLGLPVLGAPPRLLCDLRLVRLYLLEAKEAENITTCGAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVN		
h1-1	MGVHECPAWLWLLLSLSPLGLPVLGAPPRLLCDLRLVRLYLLEAKEAENITTCGAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVN		
h2-1	MGVHECPAWLWLLLSLSPLGLPVLGAPPRLLCDLRLVRLYLLEAKEAENITTCGAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVN		
mWT	MGVPERP-TLLLLLSLLLIPLGLPVLGAPPRLLCDLRLVRLYLLEAKEAENITTCGAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVN		
mS	MGVPERP-TLLLLLSLLLIPLGLPVLGAPPRLLCDLRLVRLYLLEAKEAENITTCGAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVN		
mG3	MGVPERP-TLLLLLSLLLIPLGLPVLGAPPRLLCDLRLVRLYLLEAKEAENITTCGAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVN		
mG5	MGVPERP-TLLLLLSLLLIPLGLPVLGAPPRLLCDLRLVRLYLLEAKEAENITTCGAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVN		
m301	MGVPERP-TLLLLLSLLLIPLGLPVLGAPPRLLCDLRLVRLYLLEAKEAENITTCGAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVN		
mK3	MGVPERP-TLLLLLSLLLIPLGLPVLGAPPRLLCDLRLVRLYLLEAKEAENITTCGAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVN		
Afinidad de hélice	Hélice C x x x	C' x	Hélice D x xx
hWT	SSQPWEPLQLHVVDKAVSGRLSLTTLRALGAQKEAISPDDAASAAPLRTITADTFKFLFRVYSNFLRGKLYTGEACRTGDRstop		
hS3	SSQPWEPLQLHVVDKAVSGRLSLTTLRALGAQKEAISPDDAASAAPLRTITADTFKFLFRVYSNFLRGKLYTGEACRTGDRstop		
h1-4	SSQPWEPLQLHVVDKAVSGRLSLTTLRALGAQKEAISPDDAASAAPLRTITADTFKFLFRVYSNFLRGKLYTGEACRTGDRstop		
h1-5	SSQPWEPLQLHVVDKAVSGRLSLTTLRALGAQKEAISPDDAASAAPLRTITADTFKFLFRVYSNFLRGKLYTGEACRTGDRstop		
hS4	SSQPWEPLQLHVVDKAVSGRLSLTTLRALGAQKEAISPDDAASAAPLRTITADTFKFLFRVYSNFLRGKLYTGEACRTGDRstop		
h1-1	SSQPWEPLQLHVVDKAVSGRLSLTTLRALGAQKEAISPDDAASAAPLRTITADTFKFLFRVYSNFLRGKLYTGEACRTGDRstop		
h2-1	SSQPWEPLQLHVVDKAVSGRLSLTTLRALGAQKEAISPDDAASAAPLRTITADTFKFLFRVYSNFLRGKLYTGEACRTGDRstop		
mWT	SSQPWEPLQLHIDKAISGLRLSLTLRLVGAQKELMSPPDTPPAFLRTITVDTFKFLFRVYANFLRGKLYTGEVCRGRDRstop		
mS	SSQPWEPLQLHIDKAISGLRLSLTLRLVGAQKELMSPPDTPPAFLRTITVDTFKFLFRVYANFLRGKLYTGEVCRGRDRstop		
mG3	SSQPWEPLQLHIDKAISGLRLSLTLRLVGAQKELMSPPDTPPAFLRTITVDTFKFLFRVYANFLRGKLYTGEVCRGRDRstop		
mG5	SSQPWEPLQLHIDKAISGLRLSLTLRLVGAQKELMSPPDTPPAFLRTITVDTFKFLFRVYANFLRGKLYTGEVCRGRDRstop		
m301	SSQPWEPLQLHIDKAISGLRLSLTLRLVGAQKELMSPPDTPPAFLRTITVDTFKFLFRVYANFLRGKLYTGEVCRGRDRstop		
mK3	QVTCCHRGGFTNLLFVTVSCQPSTTPNPHQTGHYLLTSLSHGHSSTSSDILGARTSQSSILKSKDVAGQARGPREEPQNQLGFV		

Fig. 5

A



B

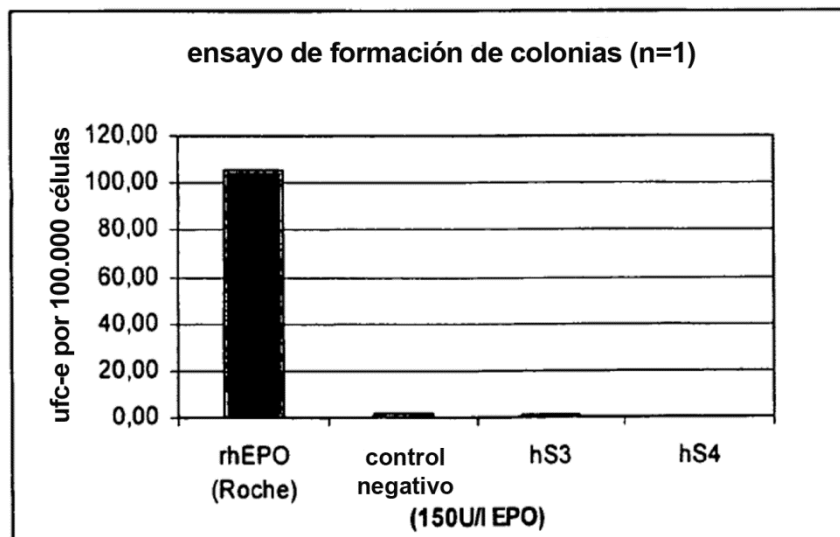


Fig. 6

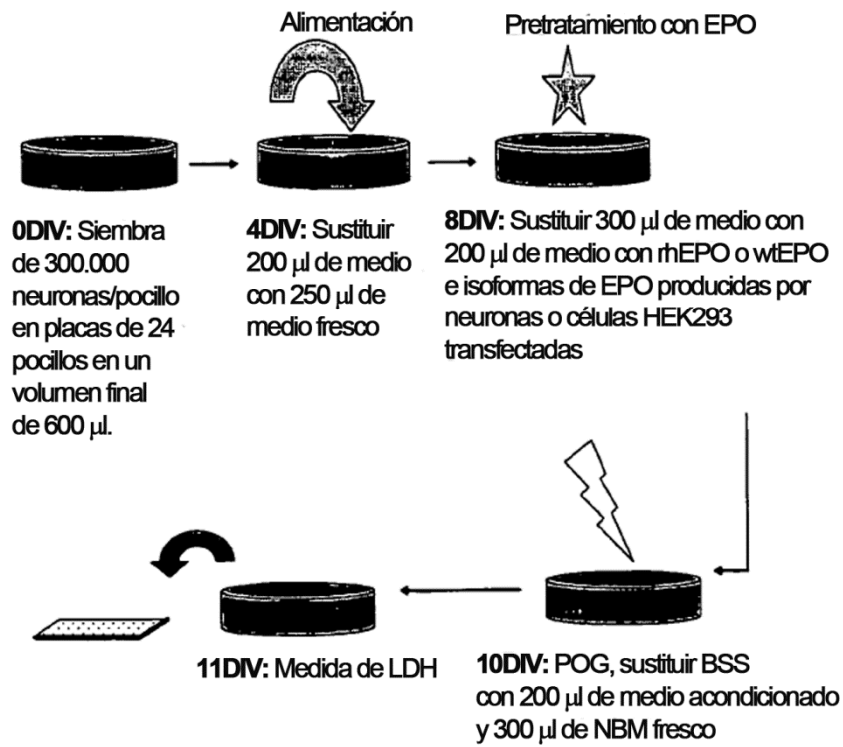
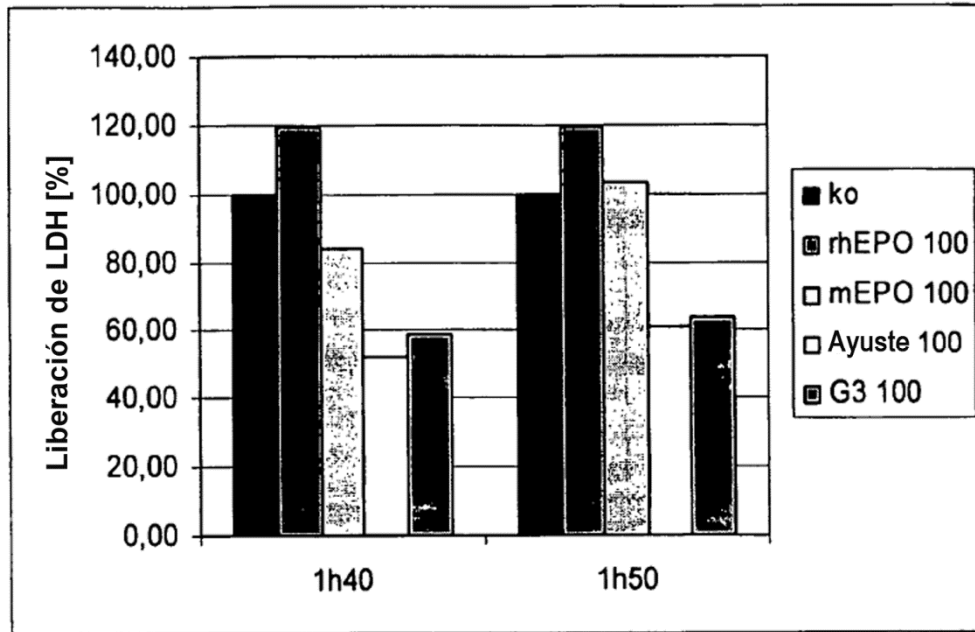


Fig. 7

A



B

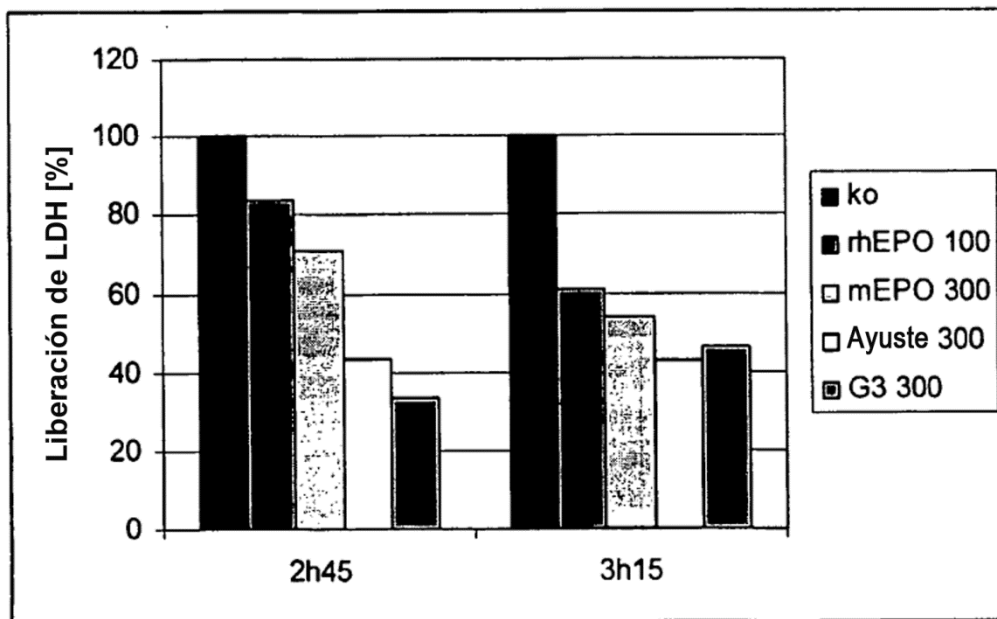
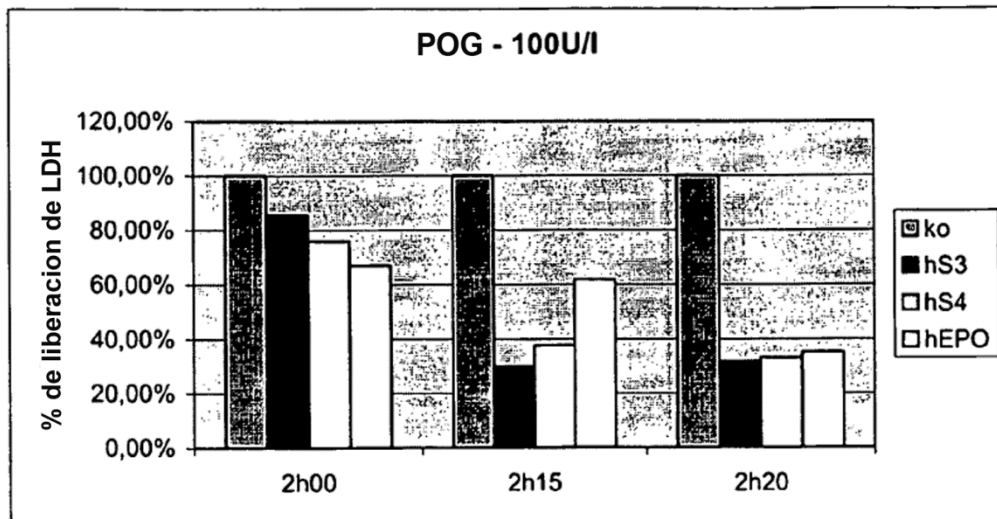


Fig. 8

A



B

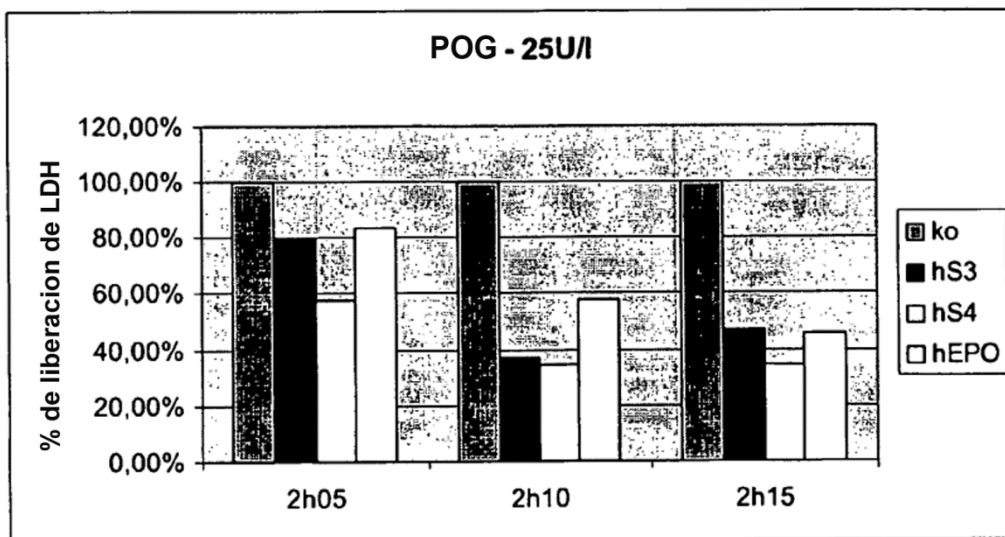
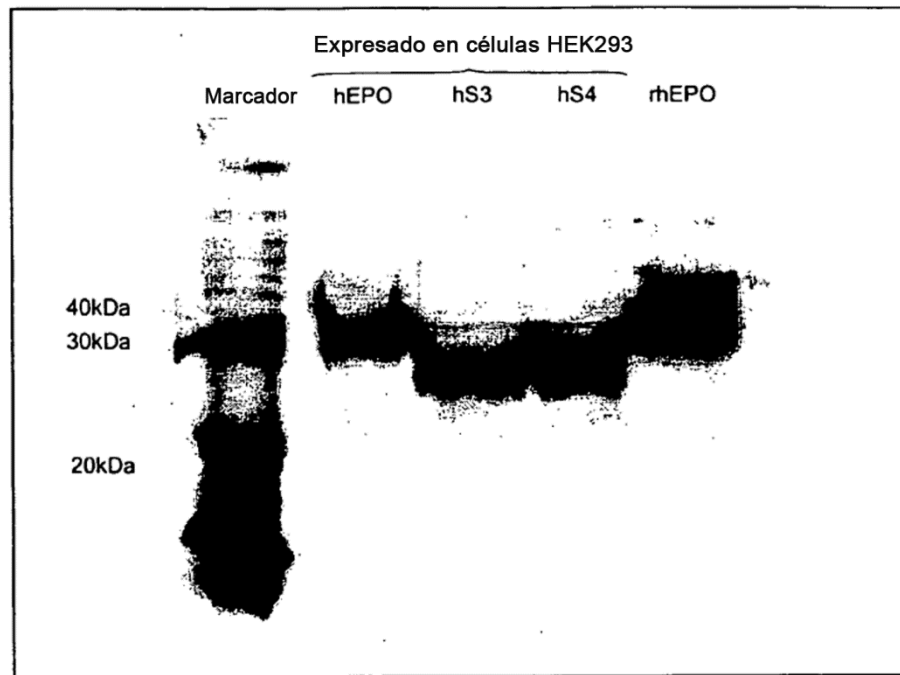


Fig. 9

A



B

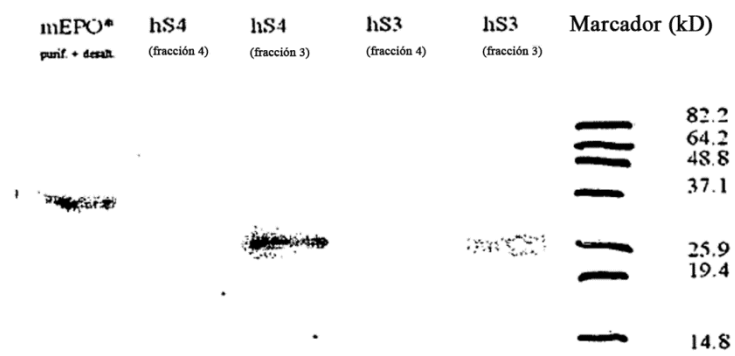


Fig. 11

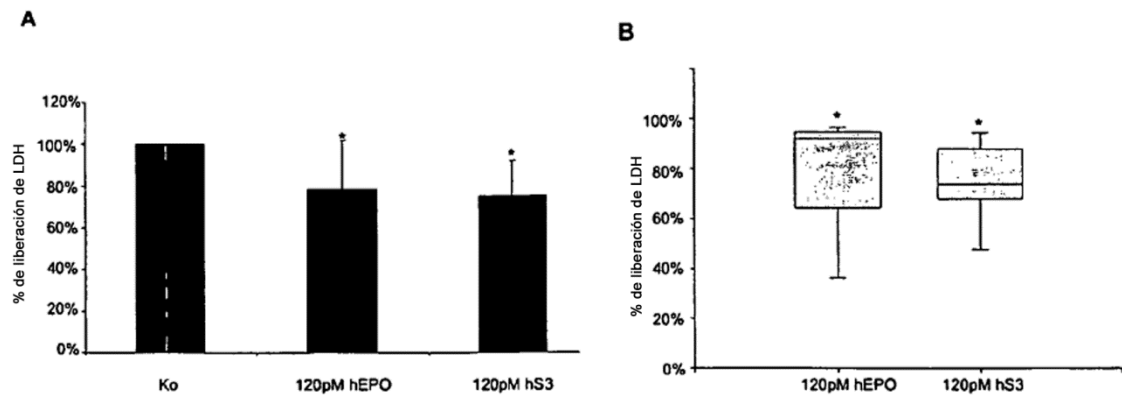


Fig. 12

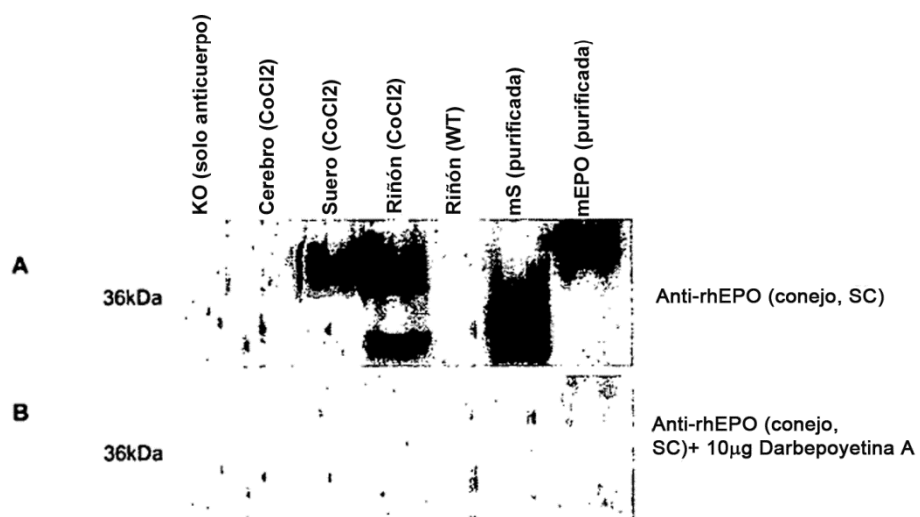


Fig. 13

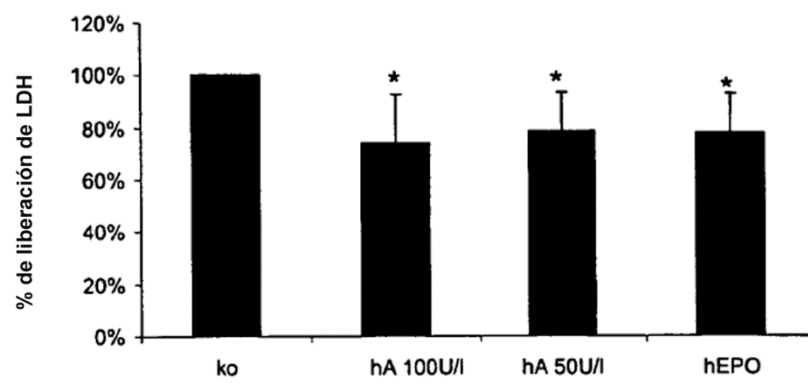


Fig. 14

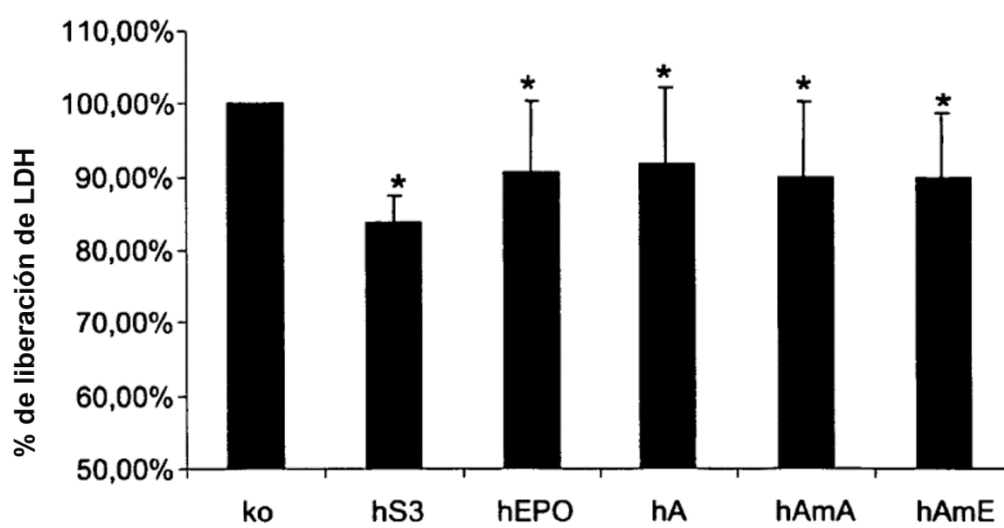
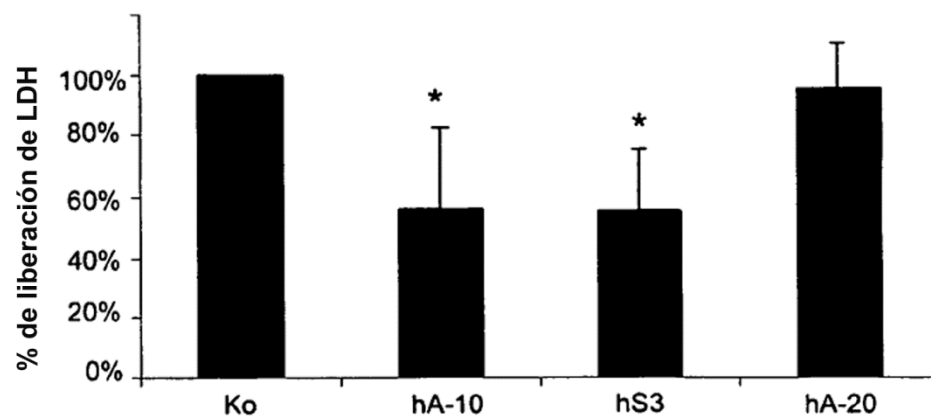


Fig. 15

A



B

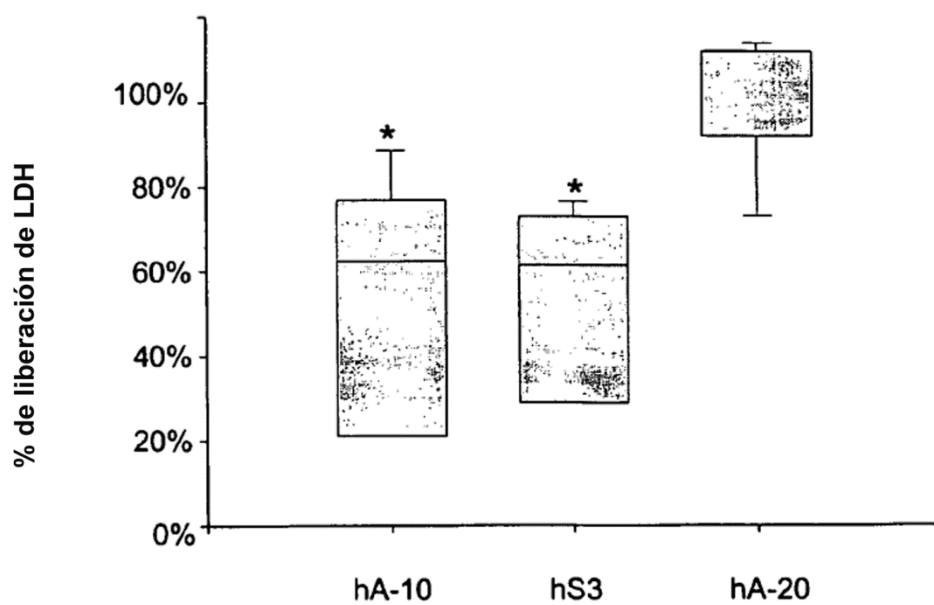


Fig. 16

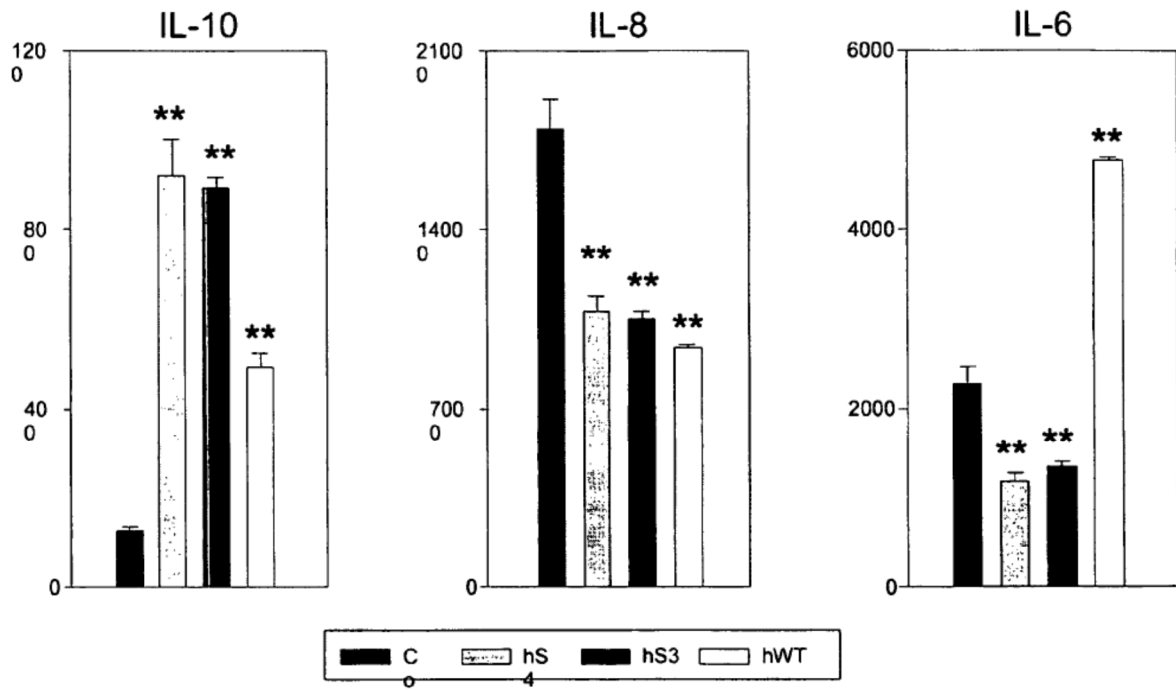


Fig. 17

atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgctccctctgggcctcccagtc
 Atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgctccctctgggcctcccagtc
 Atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgctccctctgggcctcccagtc
 Atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgctccctctgggcctcccagtc
 Atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgctccctctgggcctcccagtc
 Atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgctccctctgggcctcccagtc

ctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggtacctcttgaggccaaggaggccgag
 ctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggtacctcttgaggccaaggaggccgag
 ctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggtacctcttgaggccaaggaggccgag
 ctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggtacctcttgaggccaaggaggccgag
 ctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggtacctc-----
 ctgggcgccccaccacgcctcatc-----

aatatcacgacgggctgtgctgaacactgcagcttgaatgagaatatcactgtcccagacaccaaagttaatttc
 aatatcacg-----
 aatatcacg-----
 aatatcacg-----

tatgcctggaagaggatggaggtcgggcagcagggcgtagaagtctggcagggcctggccctgctgtcggaagct

gtcctgcggggccaggccctgttggtcaactcttcccagccgtgggagccctgcagctgcatgtggataaagcc

gtcagtgcccttcgcagcctcaccactctgcttcgggctctgcgagcccagaaggaagccatctccctccagat

gcggcctcagctgctccactccgaacaatcactgctgacactttccgcaaactcttcgagctactccaatttc

ctccggggaaagctgaagctgtacacaggggaggcctgcaggacaggggacagatga

hWT
 hA
 hAmA
 hAmE
 hA-10
 hA-20

Fig. 18

hA (Hélice A de hWT-EPO) - SEQ ID NO 55

atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgctccctct
ggcctcccagtcctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggt
acctcttgaggccaaggaggccgagaatatcacg

hAmA (Mutante de alanina en la hélice A de hWT-EPO) SEQ ID NO 56

atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgctccctct
ggcctcccagtcctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggaggcg
acctcttgaggccaaggaggccgagaatatcacg

hAmE (Mutante de ácido glutámico en la hélice A de hWT-EPO) SEQ ID NO 57

atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgctccctct
ggcctcccagtcctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggaggagt
acctcttgaggccaaggaggccgagaatatcacg

hA-10 (Hélice A de hWT-EPO menos 10aa) - SEQ ID NO 58

atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgctccctct
ggcctcccagtcctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggt
acctc

hA-20 (Hélice A de hWT-EPO menos 20aa) - SEQ ID NO 59

atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgctccctct
ggcctcccagtcctgggcgccccaccacgcctcatc

Fig. 19

A - ADN de hA sin líder:

(Hélice A de hWT-EPO sin secuencia de transporte líder) - SEQ ID NO 60 - (proteína exportada madura)

5'-
gccccaccacgccatctgtgacagccgagtcctggagaggtacctcttgaggccaaggaggccgagaatatcacg....-3'

Secuencia líder (SEQ ID NO 63):

5'-atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctggcttctcctgtccctgctgctcctctgggcctcccagtcctgggc-3'

B - Aminoácidos de hA sin líder:

(Hélice A de hWT-EPO sin secuencia de transporte líder) - SEQ ID NO 61 - (proteínas exportadas maduras):

APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENIT

Secuencia líder (SEQ ID NO 62): MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLG