

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 033**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/74** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2008 E 11004689 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2492355**

54 Título: **Receptor de eritropoyetina protector de tejido (NEPOR) y métodos de uso**

30 Prioridad:

**29.11.2007 US 991042 P**

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

**29.07.2015**

73 Titular/es:

**MOLECULAR HEALTH GMBH (100.0%)  
Belfortstrasse 2  
69115 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**JACKSON, DAVID B.;  
STEIN, MARTIN;  
VOSS, HARTMUT y  
BROCK, STEPHAN**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 542 033 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

Receptor de eritropoyetina protector de tejido (NEPOR) y métodos de uso

## Campo Técnico

5 La presente descripción proporciona un complejo de la proteína del receptor de unión de eritropoyetina (EPO) protector de tejido novedoso, denominado aquí como NEPOR. Se propone que el NEPOR media las propiedades protectoras del tejido de EPO. Por lo tanto, la presencia de NEPOR en un tumor permite que el EPO incida en la supervivencia de las células asociadas mejorando de esta manera la evolución del tumor y afectando negativamente la supervivencia del paciente. En esta circunstancia, la presencia de NEPOR representa un bioetiquetador de pronóstico para resultados del paciente más pobres, aunque también representa una única proteína objetivo anti-neoplásica clínicamente tratable, de forma similar, el NEPOR media la actividad neuroprotectora de EPO y así representa un objetivo único para el tratamiento de enfermedades asociadas con lesiones neuronales, tales como apoplejía.

15 En el primer caso, la presente descripción proporciona un método para evaluar un tumor para expresión de esta proteína. La presente descripción proporciona adicionalmente un método para estratificar pacientes que tienen un tumor que es adecuado (es decir no está presente NEPOR) o no adecuado (es decir, está presente NEPOR) para tratamiento de EPO. El método descrito comprende: (a) aislar una muestra de tejido de un individuo quien recibe o es un candidato para recibir eritropoyetina, (b) determinar el nivel de expresión de los genes NEPOR (mARN) y/o la presencia del producto de gen NEPOR (proteína) a partir del tejido aislado, y (c) correlacionar la presencia de un producto de expresión génico NEPOR o la presencia de la proteína NEPOR con una respuesta fisiológica para el tratamiento con eritropoyetina. En un segundo caso, la presente descripción proporciona un método para tratar pacientes con tumores positivos a NEPOR. Adicionalmente, la presente descripción proporciona un método para tratar apoplejía. Finalmente, la presente descripción proporciona un método para detectar compuestos terapéuticos dirigidos a NEPOR (compuestos terapéuticos antagonistas para tratar cáncer, y compuestos terapéuticos agonistas para el tratamiento de daño de tejido asociado con hipoxia, tal como apoplejía).

## 25 Antecedentes

Aprobado por la FDA en 1993 para el tratamiento de anemia, la eritropoyetina (EPO) es una hormona de glicoproteína de 193 aminoácidos, producida por los riñones para regular la producción de glóbulos rojos (RBC); un proceso comúnmente denominado eritropoyesis. La EPO se identifica originalmente como una citoquina que promueve la supervivencia y diferenciación del progenitor eritrocito, pero también ha mostrado que posee funciones neuroprotectoras, particularmente en respuesta a lesión isquémica en el sistema nervioso central, (SNC). El uso clínico de EPO ha sido prevalente en el tratamiento de pacientes con cáncer anémico, mientras que los estudios en curso exploran el potencial de la EPO en el tratamiento de enfermedades neurológicas (por ejemplo apoplejía). No obstante, estudios clínicos recientes en pacientes con cáncer han empezado a revelar eventos adversos altamente preocupantes, que sugieren que la administración de la EPO humano recombinante (rHuEPO) puede afectar adversamente la supervivencia general del paciente. Subsiste una necesidad urgente en la oncología médica para entender mejor y predecir la prevalencia o susceptibilidad a este efecto, de tal manera que la administración de rHuEPO se puede contra-indicar, continuar o detener.

## EPO: Función biológica

40 La eritropoyetina (EPO) es una citoquina tipo I de 193 aminoácidos, producida por células de la corteza renal para regular la producción de glóbulos rojos (RBC) en un proceso denominado eritropoyesis. La eritropoyesis tiene naturaleza de multietapas, que implica la diferenciación de blastocitos hematopoyéticos pluripotentes a través de las células progenitoras de unidades formadoras de brotes de eritrocitos (BFU-E) de linaje comprometido y unidades formadoras de colonia de eritrocitos (CFU-E), que surgen en una serie de eritoblastos tempranos y tardíos, que conducen eventualmente a la formación de reticulocitos y eritrocitos maduros. Durante este proceso, la formación secuencial de pro-eritroblastos, eritoblastos basófilos, policromatófilos, y ortocromáticos se regula positivamente por EPO. La EPO induce múltiples efectos positivos en eritoblastos tempranos, que incluyen proliferación aumentada, progresión a través de maduración, y protección de muerte celular programada.

50 En términos del mecanismo molecular, la EPO se une a dos receptores idénticos (EpoR), un evento que activa diversas rutas de señalización intracelular. Estas incluyen el transductor de señal 2 de quinasa Janus y el activador de transcripción 5 (JAK2-STAT5), 3-quinasa fosfatidilinositol (PI3K), proteína quinasa C (PKC), y Ras-Raf-MEK (proteína quinasa regulada por la señal extracelular o activada por mitógeno)-ERK (proteína quinasa regulada por la señal extracelular). Las rutas JAK2- STAT5 y RAS-RAF-MEK-ERK se considera que están asociadas con la acción

mitogénica de Epo, mientras que la ruta PI3K, que actúa a través Akt (PI3K-Akt), se ve como un mediador de actividades anti-apoptóticas de EPO.

EPO: Uso clínico

5 La anemia (AmE) o anæmia/anemia (BrE), del Griego (ἄναιμία) (an-haîma) significa “sin sangre”, es una deficiencia de glóbulos rojos (RBC) y/o hemoglobina. La afección se observa comúnmente en pacientes con enfermedades crónicas, y es particularmente común en cáncer cuando aproximadamente 50% de los pacientes son anémicos en la presentación y algunos, el 70-90% desarrolla la afección durante el curso de tratamiento (típicamente denominado anemia inducida por quimioterapia (CIA)). En un estudio reciente de the European Cancer Anemia Survey (ECAS), Ludwig et al. cita en un índice de anemia inicial del 50 % (hemoglobina [Hb] < 12 g/dL) entre 3010 pacientes con cánceres hematológicos y un índice de anemia inicial de 41 % entre 11.453 pacientes con tumores sólidos (Blood, 2002; 100: 234a-235a. Resumen 884). El análisis longitudinal adicional revela que 72 % de los 2780 pacientes con cánceres hematológicos y 66 % de los 10.067 pacientes con tumores sólidos sucumben a CIA. Otros estudios publicados han reportado altos índices variados en pacientes en diferentes fases y con diferentes tipos de tratamiento (Tabla 1). No obstante, todos los estudios demuestran la extremadamente alta prevalencia de anemia en pacientes con cáncer.

Tabla 1. Prevalencia de Anemia en Pacientes con Cáncer que Experimentan Tratamiento

Tipo de cáncer	Prevalencia de anemia (Hb < 12 g/dL)
Cáncer cervical <sup>[3]</sup>	82 %
Tumores sólidos <sup>[1]</sup>	66 %
Cáncer colorrectal <sup>[3]</sup>	67 %
Cáncer de pulmón <sup>[3]</sup>	63%
Cánceres hematológicos	72 %

Un número de factores contribuyen a la alta incidencia de anemia entre pacientes con cáncer, que incluyen no solo quimioterapia y mielosupresión inducida por radiación, sino también anemia mediada por citoquina de enfermedad crónica, hemorragia, infiltración de la médula ósea por el tumor, hemólisis, y deficiencias nutricionales. Cualquiera que sea la fuente, la anemia resulta en una capacidad reducida de la sangre para transferir oxígeno a los tejidos, lo que conduce a hipoxia de tejido y un rango asociado de consecuencias clínicas, que afectan todos los ámbitos de salud del paciente: estado fisiológico, bienestar sicosocial y calidad de vida. No es sorprendente que la anemia pueda afectar en forma negativa la respuesta del paciente a una terapia contra el cáncer, un hecho que destaca la importante función de soporte de rHuEPO para restaurar los conteos normales de RBC.

EPO: Señales de Seguridad Clínica

Durante muchos años se consideró que el ESA era extremadamente seguro en sus indicaciones etiquetadas de enfermedad crónica de riñón y anemia inducida por quimioterapia. Los primeros indicios de problemas de seguridad se produjeron en el 2003 cuando los resultados de un par de estudios que examinan la potenciación de la radiación y la quimioterapia de la EPO dieron lugar a una reunión de la FDA en Mayo de 2004. Este primer estudio (the ENHANCE study: Lancet 2003; 362: 1255-1260) sugirió el riesgo relativo de la supervivencia libre de evolución que fue peor para pacientes quienes recibieron radioterapia más beta epoyetina NeoRecormon de Roche que para pacientes que recibieron placebo más radioterapia. Se realizó un ensayo multi-institucional doble ciego, aleatorizado que incluyó una población de estudio de 351 pacientes quienes recibieron radioterapia. Los pacientes se trataron 3 veces por semana con placebo o EPO en la forma de beta epoyetina que inicia 10 a 14 días antes y continúa durante la terapia de radiación. Aunque los niveles de hemoglobina aumentan en 82 % de los pacientes que recibieron EPO, comparado con 15 % en pacientes que recibieron placebo, el índice de supervivencia libre de evolución loco-regional es significativamente menor. Adicionalmente, el grupo EPO tiene un mayor riesgo relativo para evolución y muerte loco-regional.

40 El segundo ensayo involucra 939 pacientes con cáncer de mama que recibieron quimioterapia (the BEST study: J. Clin. Oncol. 2005; 23:5960-5972; ver tabla 2), se les suministró alfa epoyetina Eprex de Johnson & Johnson que tiene un índice mayor de mortalidad de 4 meses y un índice menor de supervivencia de 12 meses que aquellos con

5 placebo. Ambos estudios intentaron llevar los límites de los niveles de hemoglobina más allá de lo permitido para su comercialización por la FDA – el objetivo de hemoglobina recomendado para Aranesp era en el momento hasta de 12 g/dL, mientras que las etiquetas de Epogen y Procrit recomiendan 10-12 g/dL. Henke trató hombres a niveles objetivo de por lo menos 15 g/dL, mientras que las mujeres fueron tratadas con por lo menos 14 g/dL. El nivel objetivo en el estudio BEST fue 12- 14 g/dL.

Tabla 2: Resumen de los resultados de Leyland-Jones et al. (J. Clin. Oncol. 2005; 23:5960-5972) que muestran que 8,7 % de los pacientes tratados en el brazo con EPO murieron dentro de los 4 meses de tratamiento, comparado con 3,4 % de los pacientes no tratados en el brazo. ITT = Intención de tratar.

Tabla 2.4: Causas de Muerte Entre Pacientes Quienes Murieron Dentro de los 4 Meses de Asignación Aleatoria (Población ITT, N = 939)				
Resultado	Alfa epoyetina (n=469)		Placebo (n = 470)	
	No. de pacientes	%	No. de pacientes	%
Vivo en 4 meses	428	91.3	454	96.6
Muerto dentro de 4 meses	41	8.7	16	3.4

10 Johnson & Johnson (JNJ, New Brunswick, N.J.) ya ha reportado datos del ensayo CHOIR Fase IV (N. Engl. J. Med. 2006 Nov 16; 355 (20): 2085-98.) que probó si utilizar la alfa epoyetina Procrit para obtener niveles de hemoglobina a 13.5 g/dL mejoraría los resultados vs. el tratamiento con 11.3 g/dL (dentro del rango de 10-12 g/ dL en la etiqueta del fármaco). Los pacientes en el grupo mayor de hemoglobina tuvieron una incidencia significativamente  
 15 aumentada de mortalidad y eventos cardiovasculares. Mientras este estudio se llevó a cabo en el espacio de enfermedad renal, las implicaciones de seguridad se enfatizaron adicionalmente en un estudio más reciente - DAHANCA10. En Febrero de 2007, Amgen describe que este estudio independiente había sido detenido tres meses antes, después que los datos provisionales mostraron que Aranesp más la radiación perdieron el objetivo principal del control loco-regional de 3 años vs. la radiación sola. El estudio también muestra un aumento no significativo en la  
 20 muerte en el brazo de Aranesp. DAHANCA10 explora si el uso de Aranesp para mantener un nivel de hemoglobina de 14-15.5 g/dL durante radioterapia puede mejorar el control de la enfermedad locoregional en pacientes con carcinoma epidermoide primario de cabeza y cuello (HNSCC).

Las señales de seguridad también emergen del uso de Aranesp en el espacio AoC (estudio 103). En Enero 2007, Amgen reporta que el perfil de riesgo/beneficio de Aranesp es “el mejor de los neutros” en un ensayo Fase III en  
 25 pacientes quienes tienen AoC y quienes no reciben quimio- o radio-terapia. Aquí los datos revelan significativamente más muertes en pacientes Aranesp que en pacientes placebo. El ensayo, que trata pacientes con un nivel de hemoglobina de 12-13 g/dL, también pierde su criterio principal de valoración de una reducción significativa en frecuencia de transfusión a 16 semanas. El estudio recluta 103 pacientes con diversos cánceres, que incluyen cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer de mama y cáncer de próstata. Los investigadores canadienses publican hallazgos similares (J. Clin. Oncol. 2007 Mar 20; 25(9): 1027-32). Aquí los autores muestran que los 70  
 30 pacientes con NSCLC avanzado con AoC, que reciben Procrit, tienen un índice de mortalidad significativamente mayor que aquellos que reciben placebo. Una sinopsis de cada uno de estos estudios se proporciona en la Tabla 3 adelante:

Tabla 3: Resumen de los resultados de estudios de seguridad EPO que destacan los temas de supervivencia.

ESTUDIO	Tipo EPO	POBLACIÓN	DISEÑO	ESTADO
DAHANCA (SE20029001)	Aranesp	HNSCC; Hb inicial <= 14,5	Ensayo de etiqueta abierta, multicentro de radioterapia +/- Aranesp	Finalizado antes por DMC (después de 522 de 600 pacientes previamente inscritos) con base en menores índices LRC e incremento de muertes en el brazo ESA en el análisis interino previsto; 522 de 600 pacientes previamente inscritos; resumen de resultados 12/06; CSR anticipado 9/08.
EPO-CAN-20	Eporex/Procrit	NSCLC no recibe quimio; Hb inicial <=12	placebo controlado, doble ciego, aleatorizado (1:1) +/- Eprex	Finalizado antes por DSMB para incremento de muertes en brazo ESA; 70 de 300 pacientes inscritos; los resultados publicados en el resumen en 2004 y en el diario de oncología clínica 3/07
BEST (EPO-INT-76)	Eporex/Procrit	Cáncer de mama metastásico	Placebo controlado, doble ciego, aleatorizado	Finalizado en Abril 2002, después de la revisión de los datos en los primeros 938 pacientes por el DMC, debido a evidencia de exceso de mortalidad en el brazo Eprex
RTOG 9903	Eporex/Procrit	HNSCC; Hb inicial 9-12,5 (hembra), 9-13,5 (macho)	Etiqueta abierta, aleatorizada (1:1), quimio/radiación +/- procrit	Finalizado antes por DSMB para tendencia hacia LRC más pobre y OS en brazo EPO. 14B de 372 pacientes inscritos. Resultados publicados en el resumen 2004
Estudio 103 (Amgen)	Aranesp	NSCLC, cáncer de mama, próstata		

Seguridad clínica EPO; ¿una función para EPOR?

Estos hallazgos clínicos han conducido a muchos investigadores a sugerir una posible función de la ESA en promover el crecimiento de tumor a través de la estimulación de la señalización de supervivencia del receptor EPO en células neoplásicas, y por medio de la estimulación de angiogénesis. Está implícito en estas actividades propuestas la noción que el receptor EPO puede conferir algo de ventaja de supervivencia a las células neoplásicas, un efecto colateral negativo. Esto, a su vez, sugiere que el receptor EPO está presente y activado por la unión de EPO en dichas células. Utilizando RT-PCR cuantitativo, en tiempo real, el gen EPOR no solo ha mostrado que se expresa fuertemente en la médula ósea (que contiene los progenitores eritroides sensibles a EPO), sino también en niveles significativos en tejidos normales (por ejemplo riñón, corazón, cerebro, endotelio, y músculo liso). Más aún, los niveles de transcritos de EPOR en tejidos de tumor de mama, colon, ovario, próstata, pulmón, linfoma, íleo, estómago, y tejidos neoplásicos renales y estirpes de células neoplásicas no son mayores que aquellos niveles observados en las contrapartes de tejido normal. Estos hallazgos están de acuerdo con otros informes que demuestran que los niveles de transcritos de EPOR son básicamente equivalentes en muestras sin tumor y de tumor correspondientes de pacientes con cáncer de pulmón, colon y próstata. Desde la perspectiva de estos datos, es cuestionable si el gen EPOR puede proporcionar de alguna manera la ventaja selectiva a las células neoplásicas, por lo menos por medio de niveles de expresión anormales.

Por lo tanto, existe una posible función para EPOR en mediar la supervivencia de la célula neoplásica en respuesta a EPO. A partir de una perspectiva molecular, no sería sorprendente la capacidad de las células neoplásicas para subvertir el sistema EPO/EPOR. Un número de estudios preclínicos han demostrado la activación mediada por EPO de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), 3-quinasa fosfatidilinositol (PI<sub>3</sub>K)-Akt, JAK-STAT (Transductor de Señal de quinasa Janus y Activador de Transcripción), y las rutas de señalización del factor kappa B nuclear (NF<sub>κ</sub>B) en una variedad de cánceres humanos. Cada una de estas cascadas de señalización se ha asociado con funciones celulares que promueven la evolución del tumor. La EPO estimula no solo la quimiotaxis de las células endoteliales, junto con la migración e invasión de cáncer de mama y células HNSCC, sino también parece inducir la proliferación de células neoplásicas e inhibir la apoptosis. Más aún, el pretratamiento con rHuEPO protege algunas estirpes de células neoplásicas de los efectos citotóxicos del agente quimioterapéutico, cisplatina. Por lo tanto, la señalización EPO/EPOR parece contribuir a una amplia variedad de funciones que promueven el tumor en diferentes tipos de cáncer.

A pesar de esta evidencia, la posible contribución de la señalización EPO/EPOR a la evolución de cáncer es cualquier cosa menos sencilla. La influencia de EPO/EPOR en diferentes tipos de cáncer parece ser muy variable y no del todo comprendida. Los estudios han mostrado que la EPO no influencia la proliferación de estirpes de células neoplásicas. Rosti et al. (Haematologica 1993 Jul-Aug; 78(4): 208-12.), por ejemplo, investiga el potencial proliferativo de rHuEPO al probar los efectos de este factor en el crecimiento clonogénico y la síntesis de ADN en 10 diferentes estirpes celulares derivadas de cánceres hematológicos y tumores sólidos. Las estirpes celulares K-562 y HEL se incluyen en este estudio, ambos expresan los receptores EPO. Los resultados muestran que rHuEPO no tiene efecto sobre ya sea el crecimiento de colonia o la síntesis de ADN (ver Tabla 4).

Tabla 4. Muestra la carencia de efecto de rHuEPO en el porcentaje de células en fase S en las estirpes celulares humanas

Estirpe celular	EPO (IU/ml)		
	0	1.0	5.0
K-562	37.0 ± 2.0	37.1 ± 2.1	36.8 ± 1.7
HEL	27.3 ± 1.9	26.2 ± 1.3	25.8 ± 1.4
HL-60	26.4 ± 1.8	24.8 ± 2.1	25.6 ± 2.0
PLB 985	30.0 ± 1.7	27.8 ± 2.3	28.2 ± 2.5
KG-1	14.2 ± 1.3	14.0 ± 1.7	15.5 ± 1.8
H69	15.3 ± 1.5	15.8 ± 1.3	14.9 ± 1.6
N417	16.6 ± 1.8	17.0 ± 1.4	16.3 ± 2.2
MCF-7	20.0 ± 0.9	21.1 ± 1.2	19.7 ± 1.0
OCUM-1	16.1 ± 2.1	17.3 ± 2.4	15.3 ± 2.3
GBL-HU12	19.2 ± 1.5	20.9 ± 1.6	19.1 ± 2.0

En un estudio similar, Westphal et al. (Tumori 2002 Mar-Apr; 88(2): 150-9.) investigó los efectos del EPO en más de 25 diferentes estirpes celulares humanas malignas y benignas. Se analiza la expresión del mRNA de receptor EPO y la proteína con RT-PCR, transferencia Western, e inmunocitoquímica. Las respuestas celulares en diversas concentraciones de EPO se evalúan utilizando la captación de timidina tritiada, análisis de transferencia Northern de expresión c-fos, y ensayo de actividad de tirosina quinasa. El mRNA del receptor EPO y la proteína se identifican en la mayoría de estirpes de células neoplásicas evaluadas. A pesar de estos hallazgos, el tratamiento con rHuEPO no influencia significativamente el índice de proliferación de las estirpes de células neoplásicas positivas del receptor EPO. Más aún, el tratamiento con EPO no afecta el mRNA c-fos del gen de aquellas estirpes celulares ni la activación de tirosina quinasa estimulada. Con base en sus hallazgos, los autores concluyen que la expresión del receptor EPO en células neoplásicas no parece ser esencial para crecimiento y por lo tanto no debe tener un efecto perjudicial en pacientes con cáncer.

Puede un receptor EPO novedoso explicar estos hallazgos clínicos y moleculares?

Los resultados de Lu et al. (J. Biol. Chem., Vol. 281, Issue 11, 7002-7011, 2006) establecen que la activación del receptor no se acompaña simplemente al colocar dos receptores en proximidad cercana a través de enlaces de disulfuro en los dominios de transmembrana o extracelular. En su lugar, la orientación relativa de los dos dominios de transmembrana de un dímero EpoR, a diferencia de su proximidad, determina el grado de activación del receptor. Más específicamente, estos autores proponen que la unión Epo al dímero EpoR simétrico, inactivo provoca el reposicionamiento de los dos dominios de fibronectina III en una orientación relativa asimétrica de 120°, que a su vez cambia la orientación de los dominios de transmembrana y los dominios intracelulares, y yuxtapone los JAK2 adjuntos para iniciar la cascada de fosforilación. No se esperaría necesariamente que los mutantes EPO sean capaces de iniciar la señalización de EPOR, debido a su incapacidad de inducir la conformación relativa correcta de los dominios de fibronectina III. De manera interesante, parece que ciertos aspectos de la función EPO se pueden desacoplar de la actividad EPOR. Leist et al. (Science 305, 239-242.) ha demostrado que las actividades protectoras de tejido y hematopoyéticas de Epo son distintas y separadas, demostrando por ejemplo que la EPO carbamílada (CEpo) no estimula la eritropoyesis, sin embargo evita la lesión del tejido en una amplia variedad de modelos in vivo e in vitro.

EPO y protección neuronal:

La eficiencia de la EPO en tratar la enfermedad del sistema nervioso se ha demostrado en diversos modelos experimentales de cerebro y lesión de la médula espinal. Como tal, la EPO ha llegado a ser un candidato para

neuro-protección terapéutica. No obstante, el uso de EPO como un neuro-protector eleva diversos problemas de seguridad. Aunque la EPO recombinante parece ser potencialmente seguro en dosis neuroprotectoras probadas, pueden ocurrir eventos cardiovasculares o cerebrovasculares como resultado de sus actividades estimulantes de médula ósea. De manera interesante, como se destacó anteriormente, la función protectora neuronal de EPO parece molecularmente separable de la actividad hematopoyética, como EPO carbamylada y determinados mutantes EPO son neuroprotectores pero fallan en inducir la hematopoyesis. Dichos mutantes fallan en unir EPOR (Leist et al. Science 305, 239-242).

#### Sinopsis:

La EPO se consideró durante mucho tiempo que actúa únicamente en las células hematopoyéticas, un hecho que conduce a su emergencia como un tratamiento líder para anemia inducida por quimioterapia. Sin embargo, la evidencia emergente ha mostrado que la EPO se expresa en una variedad de tipos de tejido y células, que incluyen células neoplásicas, vasculares endoteliales, y neuronales. Se induce la expresión de EPO en respuesta a hipoxia, un evento mediado por el factor de transcripción HIF-1. Se considera que la EPO ejerce prototípicamente sus efectos biológicos por medio de la unión a su receptor EPOR de superficie celular, que resulta en la fosforilación de tirosina del receptor y otras proteínas intracelulares, que incluyen JAK2 y STAT5. La ruta JAK/STAT se utiliza en células hematopoyéticas y no hematopoyéticas (que incluyen células del cerebro) luego de la unión de EPO al receptor EPO. Los hallazgos recientes de la expresión del receptor EPO en células neoplásicas de mama y renales humanas, así como también en diversas estirpes de células neoplásicas, han planteado preguntas importantes en el ámbito de la oncología a cerca de un efecto que promueve el posible crecimiento del tumor de rHuEPO en tumores que llevan el receptor EPO. Esta posibilidad ha sido confirmada en diversos ensayos clínicos. De manera interesante, otros estudios han mostrado que ciertos mutantes EPO que son citoprotectores pero no más capaces de inducir hematopoyesis, funcionan independientemente de EPOR. Esto sugiere que puede existir otro receptor EPO que carece de los requerimientos de conformación de unión estricta de EPOR.

En vista de la descripción proporcionada aquí y su descubrimiento relacionado, se proporciona una breve descripción de receptores efrina y de la biología de efrina como sigue.

#### Efrina y Biología del Receptor Efrina

Los receptores del carcinoma hepatocelular que producen eritropoyetina (Eph) forman la familia más grande de las quinasas tirosina del receptor. Los receptores Eph se dividen en dos grupos (Eph-A y Eph-B) con base en la similitud de sus secuencias de dominio extracelular y las distintas propiedades estructurales de los ligandos de efrina (Eph Nomenclature Committee, 1997). Se han identificado aproximadamente 16 genes del receptor de efrina (EphA1-10, EphB1-6) en el genoma de vertebrado (Pasquale, Nat. Rev., Mol. Cell Biol. 6 (2005), pp. 462-475.), 14 de los cuales están presentes en humanos (Figura 1) y otros mamíferos (EphA1-8, EphA10, EphB1-4, EphB6).

Los receptores Eph son proteínas de transmembrana de un solo paso con dominios extracelulares e intracelulares altamente conservados. Los dominios anteriores consisten de un dominio de unión de ligando de terminal N, una región similar a EGF rica en cisteína y dos repeticiones de fibronectina tipo III (Yamaguchi and Pasquale, Curr. Opin. Neurobiol. 14 (2004), pp. 288-296.). Intracelularmente, la región de yuxtamembrana está seguida por un dominio tirosina quinasa, seguido por un motivo  $\alpha$  estéril (SAM), y un motivo de unión tipo II PSD-95/Disco grande/ZO-1 (PDZ) en el terminal carboxilo (Kullander and Klein, Nat. Rev., Mol. Cell Biol. 3 (2002), pp. 475-486.). El dominio tirosina quinasa de un receptor de cada clase (EphA10 y EphB6) carece de los residuos que son esenciales para actividad catalítica. Las variantes del receptor Eph se generan mediante corte y empalme alternativo y sus estructuras difieren de la estructura de dominio prototípico. La arquitectura de dominio de los receptores Eph y las Efrinas (subclases A y B) se muestran en la Figura 2.

Los receptores Eph puede experimentar homodimerización orientada cis así como también heterodimerización (Freywald et al., J. Biol. Chem. 277 (2002), pp. 3823-3828.), que está mediada directamente por la región extracelular rica en cisteína, las repeticiones de fibronectina tipo III (Lackmann et al., J. Biol. Chem. 273 (1998), pp. 20228-20237.) y el motivo SAM (Stapleton et al., Nat. Struct. Biol. 6 (1999), pp. 44-49. y Thanos et al., Science 283 (1999), pp. 833-836.) o indirectamente a través de las interacciones de la proteína PDZ (Fanning and Anderson, J. Clin. Invest. 103 (1999), pp. 767-772). Las interacciones orientadas trans ocurren normalmente con moléculas efrina seleccionadas en células opuestas. En común con sus receptores, las efrinas (mencionadas derivadas del receptor de la familia Eph que interactúa con las proteínas o eforos) se dividen en dos subclases distintas A y B. Los ligandos de efrina -A son moléculas de membrana periférica de anclaje GPI. En contraste, los ligandos de efrina-B son moléculas de transmembrana cuyo dominio citoplásmico corto es capaz de participar en diversos eventos de señalización. Las moléculas de efrina-A y efrina-B se describen inicialmente al interactuar selectivamente con receptores EphA y EphB, respectivamente. Sin embargo, puede haber interferencias entre los miembros de la familia A y B. Por ejemplo, la efrina-A5 es capaz de unir EphB2, mientras que el EphA4 se une a los miembros de la familia efrina- A y efrina-B. Aunque se limitan las interacciones a través de las clases, dentro de una clase son promiscuos, con múltiples receptores EphA de unión a una efrina A dada y viceversa.

Aunque ni la clase de efrinas posee una actividad catalítica, pueden activar las rutas de transducción de señal después de interacción con los receptores Eph (señalización inversa). La señalización inversa activada por las efrinas de transmembrana incluye la fosforilación de tirosina de su cola citoplásmica e interacción con diversas moléculas de señalización. Todavía no es claro el mecanismo mediante el cual las efrinas ligadas a GPI estimulan la señalización en la dirección 3'.

La señalización algunas veces implica la formación de ensambles de señalización, un proceso que empieza con una interacción monovalente (afinidad nanomolar) entre un receptor Eph y una efrina en una célula yuxtapuesta. El trabajo cristalográfico ha mostrado que el dominio de unión de efrina globular de EphB2 contiene una cavidad que acomoda una protrusión hidrófoba de las efrinas. Los cambios estructurales ocurren luego de la unión. Por ejemplo, el EphB2 experimenta diferentes redistribuciones estructurales luego de la unión a efrina-B2 o efrina-A5.

También está presente una interfaz de unión de baja afinidad en el lado opuesto del dominio de unión de ligando EphB2 (Eph\_1b), con interfaces complementarias también presentes en el dominio de unión del receptor Eph de efrina-B2. Mientras que solo la afinidad de unión micromolar, la segunda interfaz puede mediar la dimerización de dos dímeros de efrina Eph en un tetrámero que comprende dos moléculas receptoras y dos moléculas de efrina que se extienden desde superficies celulares adyacentes. La interfaz de baja afinidad contiene determinantes importantes de la especificidad de subclase y no participa en el complejo EphB2-efrina-A5.

La señalización se inicia luego de transfosforilación por medio de los dominios de quinasa orientados correctamente. Los receptores Eph se llegan a fosforilar extensamente luego de activación mediante efrinas y por medio de asociación de la quinasa src. La fosforilación promueve el orden conformacional en el segmento de activación del dominio quinasa que favorece la unión del sustrato y también interrumpe las interacciones inhibitoras intramoleculares que ocurren entre el segmento de yuxtamembrana y el dominio quinasa. La fosforilación mediada por la familia Src de los receptores Eph también ha mostrado que actúa en una forma similar.

#### Resumen

El objeto de la presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Se describen los miembros de la familia de efrina (efrina A1 y EPH-B4) como mediadores de la señalización citoprotectora de EPO, como socios homodímeros y/o como heterodiméricos de EPOR y/o entre sí. Nuestros datos enfatizan la importancia de EPH-B4 y Efrina A1 en mediar esta función. Como tal, NEPOR representa un receptor EPO novedoso derivado de una combinación única (es decir por medio de homo- y/o hetero-dimerización) de los componentes derivados de biología de efrina y posiblemente el receptor EPO. Ver figura 3 para resumen.

La presente descripción se basa en los datos de que EPH-B4 y Efrina A1 son los componentes de un receptor EPO novedoso (NEPOR). Somos capaces de mostrar que la EPO estimula el crecimiento de tumor mejorado en un sistema modelo de tumor de ratón. La EPO estimula la ruta de señalización Akt en las estirpes celulares que carecen de la expresión del receptor EPO. Estas células expresan EPH-B4 que es un receptor que estimula la señalización por medio de la ruta Akt. Adicionalmente en un modelo de tumor de ratón se puede mostrar que la EPO es capaz de estimular el crecimiento significativo del tumor. Dicha actividad se inhibe por medio de la atenuación del receptor EPH-B4 que destaca la naturaleza dependiente de EPH-B4 de una tumorigenia mediada por EPO. Como tal, el NEPOR se compone principalmente de EPH-B4 como un homodímero y/o en asociación heterodimérica con EPOR o una Efrina. Adicionalmente, los puntos de análisis simulados por ordenador destacan la complementariedad estructural entre las moléculas de EPO y Efrina, particularmente Efrina A1. Por lo tanto, el NEPOR también puede estar compuesto de Efrina A1 como un homodímero y/o en asociación heterodimérica EPH-B4. Se proporciona un resumen de estas especies NEPOR putativas en la Figura 3 y Tabla 5.

La presente descripción proporciona un método para evaluar un tejido para la expresión del complejo del receptor NEPOR protector de tejido y/o EPH-B4 y/o Efrina A1. Al hacer esto, la presente descripción proporciona un método pronóstico para estratificar pacientes que tienen un tumor que es adecuado (NEPOR no está presente en el tumor; NEPOR-) o no adecuado (NEPOR presente en el tumor; NEPOR+) para el tratamiento de EPO. Específicamente, el método para evaluar el tejido de tumor NEPOR y/o los componentes de expresión de gen comprende:

(a) aislar una muestra de tejido de un individuo quien recibe o debe recibir eritropoyetina,

(b) determinar el nivel de expresión de los transcritos del gen NEPOR (es decir mRNA EPH-B4, y/o Efrina A1) y/o la presencia del producto de gen NEPOR (es decir proteínas EPH-B4, y/o Efrina A1) del tejido aislado, y

(c) correlacionar la presencia de estos productos de expresión de gen del componente NEPOR con una respuesta fisiológica negativa para el tratamiento con eritropoyetina.

Preferiblemente, la expresión de los genes de componente NEPOR (es decir mRNA EPH-B4, y/o Efrina A1) se determina mediante una técnica de biología molecular seleccionada del grupo que consiste de PCR, QPCR, R-PCR,

análisis de microdisposición de expresión de gen, análisis de transferencia northern, transcripción inversa y amplificación, zimografía, reacción de cadena ligasa, NASBA, Ensayo de Protección de RNasa (RPA), electrofóresis capilar con fluorescencia inducida por láser (CE-LIF) y combinaciones de los mismos.

5 Preferiblemente, la determinación de la presencia del producto de gen NEPOR se hace mediante la detección de las proteínas respectivas con un procedimiento de inmunoensayo, cuando el procedimiento de inmunoensayo se selecciona del grupo de inmunoprecipitación, inmunoensayo de enzima (EIA), radioinmunoensayo (RIA) o inmunoensayo fluorescente, un ensayo quimioluminiscente, un ensayo de aglutinación, ensayo nefelométrico, ensayo turbidimétrico, una transferencia Western, un inmunoensayo competitivo, un inmunoensayo no competitivo, un inmunoensayo homogéneo, un inmunoensayo heterogéneo, un bioensayo y un ensayo indicador tal como un ensayo de luciferasa. El procedimiento de inmunoensayo se basa más preferiblemente en ELISA.

15 Preferiblemente, el método para detección de NEPOR y/o EPH-B4, y/o Efrina A1 en tejido de tumor también puede ser un método de formación de imágenes in situ, que comprende administrar un anticuerpo anti-NEPOR o péptido de unión NEPOR ligado a un radio-ligando u otro agente formador de imágenes, y medir la distribución de tejido y ubicación del radio-ligando u otro agente formador de imágenes. Preferiblemente, la muestra de tejido se selecciona del tejido canceroso o células circulantes derivadas del mismo, o de un grupo de tejidos biológicos y fluidos tales como sangre, linfa, orina, fluido cerebral. Específicamente, el individuo es un paciente con cáncer quien se va a tratar con eritropoyetina o se está tratando con eritropoyetina. Preferiblemente, el efecto fisiológico negativo aumenta la evolución del tumor y/o la supervivencia más pobre del paciente. Preferiblemente, la presencia de los productos de gen NEPOR y/o EPH-B4, y/o Efrina A1 es indicadora de la evolución aumentada del tumor y/o la supervivencia más pobre del paciente luego de tratamiento con eritropoyetina. Preferiblemente, el cáncer es uno de cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de intestino delgado, leucemia, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer endometrial, cáncer de estómago, linfoma no Hodgkin, cáncer de riñón, carcinoma de célula renal (RCC), melanoma maligno, cáncer de vesícula, cáncer de vejiga, cáncer vulvar, cáncer de pene, cáncer testicular, cáncer de timo, sarcoma de Kaposi, 20 cáncer ocular, cáncer de glándula suprarrenal, cáncer cerebral, cáncer cervical, cáncer de apéndice, cáncer adenoide, cáncer de las vías biliares, cáncer uretral, cáncer espinal, familia de tumores de Ewing, cáncer de célula reproductora extragonal, cáncer de las vías biliares extra hepático, cáncer del tubo falopiano, cánceres de tejido blando, cáncer óseo, Linfoma de Hodgkin, cáncer anal, mesotelioma maligno, cáncer vaginal, cáncer de piel, cáncer del sistema nervioso central (craniofaringioma), blastoma pleuropulmonar, cáncer sinu paranasal y de cavidad nasal, 25 cáncer de célula transicional de pelvis renal y uretra, cáncer de glándula pituitaria, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer cerebral, cáncer de vejiga, y cáncer de glándula salivar. Preferiblemente, el cáncer se selecciona del grupo de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer cerebral, cáncer de vejiga y cáncer de mama.

35 La presente descripción proporciona adicionalmente un método para diseñar una terapia que modula la actividad de NEPOR y/o EPH-B4, y/o Efrina A1, que comprende:

1) desarrollar un ensayo de detección in vitro para terapias específicas NEPOR y/o EPH-B4, y/o Efrina A1; al medir la unión de compuestos de prueba a un complejo del receptor NEPOR protector de tejido y/o EPH-B4, y/o Efrina A1 (también en comparación con los complejos de homodímero EPOR), en donde el compuesto de prueba se etiqueta (la unión del compuesto de prueba etiquetado a los complejos receptores detallados en la figura 9) y se mide al detectar la etiqueta unida al compuesto de prueba;

2) desarrollar un método de detección libre de etiqueta tal como resonancia de plasmón de superficie. En este caso el compuesto de prueba no se etiqueta y su unión a los complejos del receptor NEPOR (como se detalla en la figura 9) se mide mediante un método independiente etiquetado (óptico).

45 3) probar la actividad de NEPOR y/o EPH-B4, y/o Efrina A1 al (a) poner en contacto un compuesto de prueba con un complejo del receptor NEPOR protector de tejido (N) o célula que expresa el complejo receptor NEPOR protector de tejido; medir el nivel de la actividad de (N) en la célula; identificar un compuesto de prueba que aumenta o reduce el nivel de actividad de (N) cuando se compara con el nivel de actividad de (N) medido en la ausencia del compuesto de prueba; y evaluar el compuesto de prueba identificado para actividad protectora de tejido;

50 4) probar la modulación de la unión de NEPOR/ligando y/o unión de ligando EPH-B4, y/o Efrina A1 al (a) poner en contacto (N) con un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido y/o el ligando EPH-B4, y/o Efrina A1 unido a una primera etiqueta, y una cantidad equivalente de un compuesto de prueba unido a una segunda etiqueta bajo condiciones que conducen a unión, retirar el material no unido de (N), y detectar el nivel de la primera y segunda etiquetas, en donde si la segunda etiqueta está presente el compuesto se une a (N) y si el nivel de la primera etiqueta se reduce con relación al nivel de la primera etiqueta cuando el ligando etiquetado se pone en contacto con (N) bajo condiciones conductoras para unión en la ausencia de un compuesto de prueba después de la eliminación del material no unido, luego se identifica un compuesto que se une a (N).

5) identificar un compuesto que modula una actividad protectora de tejido en un mamífero, que comprende: (a) administrar el compuesto a un primer animal inmediatamente luego de provocar una lesión, en donde el primer animal expresa endógenamente un complejo del receptor NEPOR protector de tejido; y (b) administrar el compuesto a un segundo animal inmediatamente luego de provocar la misma lesión como en la etapa (a), en donde el segundo animal es deficiente en la expresión de un complejo del receptor NEPOR protector de tejido y/o EPH-B4, y/o Efrina A1 o componentes de los mismos; de tal manera que si se recupera de la lesión difiere en el animal de la etapa (a) cuando se compara con el animal de la etapa (b), se identifica un compuesto que modula una actividad protectora de tejido.

La presente descripción proporciona adicionalmente métodos para tratar o evitar una enfermedad o trastorno en un humano que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que modula la actividad de un complejo del receptor NEPOR protector de tejido a un humano en necesidad de dicho tratamiento o prevención, con la condición que el compuesto no es EPO. El compuesto se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo específico para el complejo del receptor NEPOR protector de tejido, un anticuerpo es específico para un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido, una molécula pequeña, un péptido, un mutante EPO, una quimera del dominio EPO:Efrina\_ligando\_unión, un miembro de una colección, y una combinación de los mismos. Preferiblemente, dichos compuestos modulan negativamente la función protectora de tejido del complejo del receptor NEPOR en los cánceres mencionados anteriormente. Preferiblemente, dichos compuestos modulan positivamente la función protectora de tejido del complejo del receptor NEPOR en donde la enfermedad o trastorno está provocado por hipoxia, trastornos de convulsión, enfermedades neurodegenerativas, envenenamiento de neurotoxinas, esclerosis múltiple, hipotensión, paro cardíaco, radiación, o hipoglicemia.

La presente descripción proporciona adicionalmente un método para identificar los compuestos que modulan la actividad de señalización protectora de tejido de NEPOR, que comprende (a) poner en contacto un compuesto de prueba con el complejo del receptor NEPOR que expresa la célula; (b) medir el nivel de actividad protectora de tejido iniciada por la activación NEPOR en la célula; (c) identificar un compuesto de prueba que aumenta o reduce el nivel de la actividad del complejo NEPOR protector de tejido en una célula; (d) evaluar los compuestos identificados para actividad protectora de tejido mediada por NEPOR; y (e) evaluar los productos terapéuticos identificados para actividad inhibitoria de NEPOR. Preferiblemente, el ensayo en la etapa (d) es una actividad del complejo del receptor NEPOR protector de tejido que se mide mediante un ensayo de proliferación/diferenciación celular. Más preferiblemente, las células en el ensayo de proliferación/diferenciación celular se construyen recombinantemente por ingeniería para expresar EPH-B4, y/o EPOR, y/o Efrina A1. Más preferiblemente, las células expresan endógenamente un receptor EPO y se transforman con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que (i) se liga operablemente a un promotor, y (ii) codifica ya sea EPH-B4 y/o Efrina A1. Aún más preferiblemente, las células expresan endógenamente EPH-B4 y/o Efrina A1 y se transforman con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que (i) se liga operablemente a un promotor, y (ii) codifica un polipéptido del receptor EPO.

La presente descripción proporciona adicionalmente un método para identificar un compuesto que modula la interacción entre un complejo del receptor NEPOR protector de tejido y un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido, que comprende: (a) poner en contacto un complejo del receptor NEPOR protector de tejido con uno o más compuestos de prueba; y (b) medir la actividad del complejo del receptor NEPOR protector de tejido, por lo cual si la actividad medida en (b) difiere de la actividad del complejo del receptor NEPOR protector de tejido en la ausencia de uno o más compuestos de prueba, entonces se identifica un compuesto que modula la interacción entre el complejo del receptor NEPOR protector de tejido y se identifica el ligando de complejo del receptor NEPOR protector de tejido. Preferiblemente, la actividad del complejo del receptor NEPOR protector de tejido se mide mediante proliferación celular o diferenciación celular. Preferiblemente, la actividad del complejo del receptor NEPOR protector de tejido medido es la capacidad del complejo del receptor NEPOR protector de tejido de interactuar con un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido. Preferiblemente, la etapa de evaluar el compuesto identificado para la actividad protectora de tejido comprende detectar la presencia de nucleolina en la célula. Preferiblemente, la etapa de evaluar el compuesto identificado para actividad protectora de tejido comprende detectar o medir un nivel aumentado de actividad de neuroglobina o citoglobina en una célula. Preferiblemente, el complejo del receptor NEPOR protector de tejido está en la solución. Preferiblemente, el complejo del receptor NEPOR protector de tejido está en una célula. Preferiblemente, el compuesto inhibe la unión de un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido a un complejo del receptor NEPOR protector de tejido. Preferiblemente, el compuesto mejora la unión de un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido a un complejo del receptor NEPOR protector de tejido. Preferiblemente, el complejo receptor NEPOR protector de tejido que se pone en contacto en la etapa (a) está sobre una superficie celular. Preferiblemente, el complejo del receptor NEPOR protector de tejido está sobre una membrana celular aislada. Preferiblemente, la actividad del complejo del receptor NEPOR protector de tejido se compara con la activación del receptor EPOR para identificar los compuestos específicos NEPOR. Preferiblemente, el complejo del receptor NEPOR protector de tejido se inmoviliza en una superficie sólida y más preferiblemente, la superficie sólida es una placa de microtítulo o un chip.

La presente descripción proporciona adicionalmente un método para identificar un compuesto que se une a un complejo del receptor NEPOR protector de tejido, que comprende: (a) poner en contacto un compuesto de prueba

con un fragmento del complejo de receptor NEPOR protector de tejido de unión a ligando que comprende por lo menos un dominio extracelular de receptor EPO o receptor EPH-B4 o receptor Efrina A1 y por lo menos un receptor EPO o receptor EPH-B4 o receptor Efrina A1, el dominio extracelular se fusiona a un fragmento Fc unido a un soporte sólido; y (b) poner en contacto un compuesto de prueba con un fragmento de complejo de receptor EPOR de unión a ligando que comprende por lo menos dos receptores de dominio extracelular EPO fusionados a un fragmento Fc unido a un soporte sólido (c) retirar los compuestos de prueba no unidos de los soportes sólidos; (d) identificar el compuesto unido al fragmento de complejo receptor NEPOR protector de tejido, pero no el complejo receptor EPOR (y viceversa), por lo que un compuesto unido al soporte sólido se identifica como un compuesto que se une específicamente a un complejo del receptor NEPOR protector de tejido o un compuesto que se une específicamente a un complejo receptor EPOR.

La presente descripción proporciona adicionalmente un método para identificar un compuesto que se une a un complejo del receptor NEPOR protector de tejido, que comprende: (a) poner en contacto un compuesto de prueba con un fragmento de complejo de receptor NEPOR protector de tejido de unión a ligando que comprende por lo menos un receptor EPO o receptor EPH-B4 o receptor Efrina A1, el dominio extracelular fusionado a un fragmento Fc unido a un soporte sólido; (b) retirar los compuestos de prueba no unidos de los soportes sólidos; (c) identificar el compuesto unido al fragmento de complejo receptor NEPOR protector de tejido, por lo que un compuesto unido al soporte sólido se identifica como un compuesto que se une específicamente a un complejo del receptor NEPOR protector de tejido.

La presente descripción proporciona adicionalmente un método para identificar un compuesto que se une a un complejo del receptor NEPOR protector de tejido, que comprende: (a) poner en contacto un fragmento del complejo del receptor NEPOR protector de tejido que comprende por lo menos un dominio extracelular de receptor EPO o receptor EPH-B4 o receptor Efrina A1 y por lo menos un receptor EPO o receptor EPH-B4 o receptor Efrina A1, el dominio extracelular fusionado a un fragmento Fc unido a un soporte sólido con (i) un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido unido a una primera etiqueta y (ii) una cantidad equivalente de un compuesto de prueba unido a una segunda etiqueta bajo condiciones que conducen una unión; (b) retirar el material no unido del complejo del receptor NEPOR protector de tejido; y (c) detectar el nivel de la primera y segunda etiquetas en donde si la segunda etiqueta está presente el compuesto se une al complejo y si el nivel de la primera etiqueta se reduce con relación al nivel de la primera etiqueta cuando el ligando etiquetado se pone en contacto con un complejo del receptor NEPOR protector de tejido bajo condiciones que conducen a una unión en la ausencia de un compuesto de prueba después del retiro del material no unido, entonces se identifica un compuesto que se une a un complejo del receptor NEPOR protector de tejido.

La presente descripción proporciona adicionalmente un método para identificar un compuesto que modula la unión de un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido a un complejo del receptor NEPOR protector de tejido, que comprende: (a) poner en contacto un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido con un fragmento del complejo del receptor NEPOR protector de tejido que comprende por lo menos un dominio extracelular del receptor EPO o receptor EPH-B4 o receptor Efrina A1 y por lo menos un receptor EPO o receptor EPH-B4 o receptor Efrina A1, el dominio extracelular fusionado a un fragmento Fc unido a un soporte sólido; en la presencia de uno o más compuestos de prueba bajo condiciones que conducen a unión; y (b) medir la cantidad del complejo receptor NEPOR protector de tejido unido al complejo del receptor NEPOR protector de tejido; por lo que si la cantidad del ligando de complejo receptor NEPOR protector de tejido unido medido en (b) difiere de la cantidad de ligando de complejo de receptor NEPOR protector de tejido unido medido en la ausencia de uno o más compuestos de prueba, luego se identifica un compuesto que modula la unión de un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido al complejo del receptor NEPOR protector de tejido.

Preferiblemente, la cantidad de ligando de complejo de receptor NEPOR protector de tejido unido se mide utilizando un anticuerpo específico del complejo del receptor NEPOR protector de ligando de tejido. Preferiblemente, el ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido se etiqueta y la unión del ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido al complejo del receptor NEPOR protector de tejido se mide al detectar la etiqueta unida al ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido. Preferiblemente, el ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido se etiqueta y se mide la unión del ligando etiquetado al complejo del receptor NEPOR protector de tejido al detectar la etiqueta unida al ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido. Preferiblemente, la etiqueta es fluorescente. Preferiblemente, el compuesto de prueba es un anticuerpo específico para el complejo del receptor NEPOR protector de tejido. Preferiblemente, el compuesto de prueba es una molécula pequeña. Preferiblemente, el compuesto de prueba es un péptido o un miembro de una colección. Preferiblemente, el ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido es EPO, o derivados del mismo. Preferiblemente, el compuesto se une al complejo del receptor NEPOR protector de tejido o ligando del mismo. Preferiblemente, la actividad del complejo del receptor NEPOR protector de tejido se compara con la activación del receptor EPOR para identificar los compuestos específicos NEPOR.

La presente descripción proporciona adicionalmente un método para identificar un compuesto que modula una actividad protectora de tejido en un mamífero, que comprende: (a) administrar el compuesto a un primer animal inmediatamente luego de provocar una lesión, en donde el primer animal expresa endógenamente un complejo del

receptor NEPOR protector de tejido; y (b) administrar el compuesto a un segundo animal inmediatamente luego de provocar la misma lesión como en la etapa (a), en donde el segundo animal tiene deficiente expresión de un complejo del receptor NEPOR protector de tejido o los componentes del mismo; de tal manera que si se recupera de la lesión difiere del animal de la etapa (a) cuando se compara con el animal de la etapa (b), se identifica un compuesto que modula una actividad protectora de tejido.

La presente descripción proporciona adicionalmente un método para designar un compuesto que interfiere con la actividad que promueve la supervivencia de NEPOR, que comprende:

(a) proporcionar la composición molecular de las especies NEPOR y proporcionar las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos del componente NEPOR;

(b) utilizar el software compuesto por el ordenador digital para diseñar una construcción de compuesto químico/proteína que se predice se une a NEPOR; y

(c) opcionalmente diseñar las construcciones de proteína que imitan NEPOR en su estado dimerizado/multimerizado (por ejemplo construcciones Fc).

La presente descripción proporciona adicionalmente un método para identificar los compuestos que modulan la actividad de señalización protectora de tejido de NEPOR, que comprende (a) poner en contacto un compuesto de prueba con el complejo del receptor NEPOR; (b) medir el nivel de actividad protectora de tejido iniciada por la activación de NEPOR; (c) identificar un compuesto de prueba que aumenta o reduce el nivel de la actividad del complejo NEPOR protector de tejido; (d) evaluar los productos terapéuticos identificados para actividad protectora de tejido mediada por NEPOR; y (e) evaluar los productos terapéuticos identificados para actividad inhibidora de NEPOR. Preferiblemente, se mide la actividad del complejo del receptor NEPOR protector de tejido al medir la unión del compuesto de prueba al complejo del receptor NEPOR. Más preferiblemente, el compuesto de prueba se etiqueta y la unión del compuesto de prueba etiquetado al complejo del receptor NEPOR protector de tejido se mide al detectar la etiqueta unido al compuesto de prueba. Aún más preferiblemente, se mide la actividad del complejo del receptor NEPOR protector de tejido al medir la unión del compuesto de prueba al complejo del receptor NEPOR protector de tejido.

La presente descripción proporciona adicionalmente un método para formar imágenes del tumor de tejido que es susceptible a supervivencia mejorada en respuesta al tratamiento EPO, que comprende administrar un anticuerpo anti-NEPOR o péptido de unión NEPOR ligado a un radio-ligando u otro agente formador de imágenes, y medir la distribución de tejido y ubicación del radio-ligando u otro agente formador de imágenes. Preferiblemente, el anticuerpo anti-NEPOR es un anticuerpo monoclonal o policlonal seleccionado del grupo de anticuerpos mencionados en la Tabla 6.

La presente descripción proporciona adicionalmente un método para modular la supervivencia de la célula en el tejido positivo NEPOR que comprende administrar mutantes y péptidos EPO seleccionados del grupo que consiste de los péptidos de la SEQ ID NO. 17 a SEQ ID NO. 212.

La presente descripción proporciona adicionalmente un método para modular la supervivencia celular en el tejido positivo NEPOR que comprende administrar una cantidad efectiva de una quimera EPO, que comprende un dominio de unión de ligando del receptor efrina seleccionado del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 215, y SEQ ID NO. 216.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la localización genómica del receptor Eph humano (EPH) y los genes efrina (EFN) en los cromosomas humanos.

La Figura 2 muestra la arquitectura de dominio de los receptores Eph y Efrinas (subclases A y B).

La Figura 3 muestra un proceso para identificar los receptores de transmembrana de unión EPO putativos. Todas las proteínas que contienen dos dominios FN3 próximos de membrana se extraen (84 en todos) y se evalúan para evidencia de respuesta a hipoxia. El EPH-B4 está entre una de las cuatro proteínas posibles extraídas. Más aún, este es el único miembro de la familia del receptor Efrina que es embrionario letal, con la muerte en el embrión que precede al de los transgénicos EPOR.

La Figura 4 muestra el locus humano EPO que muestra la vecindad del gen EPH-B4.

- La Figura 5 muestra un esquema de los resultados de análisis de los UTR 5' y 3' (y 500 bp adicional en cada lado) de los genes EPO, EPOR y EPH-B4 para la presencia de sitios de unión del factor de transcripción inducible de hipoxia. Este estudio se desarrolla empleando el algoritmo "Match" de TRANSFAC (Nucleic Acids Res. 2003 Jan 1, 31 (1):374-8) para analizar la composición de los sitios de unión HIF1. Sorprendentemente, se encuentra solo que los genes EPO y EPH-B4 contienen dichos sitios, que soportan la hipótesis que EPH-B4 es de hecho inducible de hipoxia.
- La Figura 6 muestra un análisis estructural de asociación de Efrina A5:EphB2 en comparación con aquel de EPO:EPOR. Este análisis estructural revela diversas similitudes de conformidad con una propensión para que la Efrina A1 se una a EPO. El panel superior muestra homología de la región de unión EPO de EPOR para las moléculas humanas de Efrina A. Los dos paneles inferiores comparan los aspectos estructurales de Efrina A con EPOR.
- La Figura 7 muestra el teñido del hipocampo con anticuerpos anti-EPH-B4 y anti-EpoR. Cabe notar que existe una co-expresión sorprendente de ambas proteínas restringida a solo ciertas células. Estos datos sugieren el acoplamiento funcional de la actividad EPH-B4 y EPOR.
- La Figura 8 muestra la co-inmunoprecipitación de EPH-B4 utilizando EpoR etiquetado flag. Este hallazgo es consistente con la noción de que el EPH-B4 y EPOR pueden heterodimerizar.
- La Figura 9 muestra las posibles diversas especies de NEPOR (sin estar limitado por la teoría). En esta representación, se muestran las especies de homo/heterodímero NEPOR como construcciones Fc. Esto imita la dimerización de monómeros separados de receptor. Se puede emplear cualquier método que permite la producción de tales dímeros NEPOR en la detección de agonistas y antagonistas específicos NEPOR, que incluye moléculas pequeñas, péptidos, proteínas y variantes EPO.
- La Figura 10 muestra una alineación de los mutantes de proteína EPO que se predice se unen a NEPOR más favorablemente que a EPOR. Se predice que dichos mutantes son principalmente protectores de tejido cuando se oponen a versiones hematopoyéticas, particularmente aquellas versiones que combinan las mutaciones descritas.
- La Figura 11 muestra los niveles de mRNA de estirpes de células neoplásicas de ovario. El ARN se aísla de un panel de estirpes de células neoplásicas de ovario y se hace transcripción inversa en cADN. Los PCR se hacen utilizando cebadores específicos del receptor EPO, EPH-B4, Efrina A1 y actina.
- La Figura 12 muestra la expresión de proteína en estirpes de células neoplásicas de ovario. Los extractos de proteína se aíslan de un panel de estirpes de células neoplásicas de ovario. Las muestras se separan utilizando electroforesis en gel SDS-Page. Se utilizan inmunotransferencias utilizando anticuerpos para el Receptor EPO (R&D biosystems), EPH-B4 (un obsequio de Prakash Gil), Efrina A1 y actina (Sigma Aldrich) para comparar la expresión de la proteína.
- La Figura 13 muestra la protección ESA de apoptosis inducida por quimioterapia. Las estirpes de células neoplásicas de ovario Hey A8, SkoV3 ipl, y HeyA8-MDR (quimioresistentes) se tratan con 50 U de eritropoyetina (EPO), docetaxel 50 nM, o una combinación de EPO y docetaxes durante 48 horas. Las células luego se fijan y el ADN se tiñe con yoduro de propidio. El porcentaje de células sub G1 luego se cuantifica utilizando citometría de flujo (BD).
- La Figura 14 muestra las rutas de señalización activadas en respuesta a EPO en estirpes de células neoplásicas de ovario. Las estirpes celulares previamente caracterizadas para los niveles de expresión de EPOR, EPH-B4, y Efrina A1 se lavan y se cultivan en medio libre de suero durante dos horas. Las células luego se tratan con 50 U de EPO y se recolectan y designan los puntos de tiempo (0, 5 y 30 minutos). Se aíslan los extractos de proteína y se analizan mediante inmunotransferencias utilizando anticuerpos para fosfor-STAT5 (Invitrogen), fosfor-AKT, fosfor-ERK (Cell Signaling) y actina(Sigma Aldrich).
- La Figura 15 muestra el crecimiento del tumor inducido por eritropoyetina en ratones sin pelo. Los ratones se inyectan i.p. con  $1 \times 10^6$  células neoplásicas de ovario Hey MDR. En el día ocho luego de las inyecciones los ratones se inyectan con las cantidades designadas de EPO (10, 50, 100 U, tres ratones por grupo) cada segundo día. A) los ratones se sacrifican en el día 26 y se mide el peso del tumor. B) Se aíslan los extractos de proteína de tumores y se analizan mediante inmunotransferencia utilizando anticuerpos específicos para fosfor AKT ser 473, fosfor ERK (Cell Signaling) y pSTAT5b (Invitrogen).
- La Figura 16 muestra los efectos de la expresión EPH-B4 en el tumor que promueve el efecto de EPO. Se inyectan ratones sin pelo hembra i.p. con  $1 \times 10^6$  células HeyA8-MDR. El día ocho luego de inyección las células se tratan con siARN de control - DOPC, EPHB4 siRNA-DOPC, EPO, o en EPO + control o EPH-B4 siARN-DOPC (10 por grupo). (50 U EPO dado 3 x semana, 5  $\mu$ g de siARN 2 x semana). Los ratones se sacrifican en el día 25 y se miden los

pesos del tumor. Se hacen estadísticas utilizando la prueba T de Student. B) Distribución del peso de tumor por grupo.

La Figura 17 muestra distribuciones de peso de tumor.

Descripción Detallada

5 La presente descripción resulta de la identificación de un receptor EPO novedoso, denominado en adelante como NEPOR. Se identifica NEPOR utilizando flujo de trabajo de bioinformático que abarca un análisis funcional y con base en secuencia del genoma/proteoma humano. Se utiliza análisis de homología que implica una base de datos de proteína extracelular (denominado XtraCellDB) en conjunto con análisis de contexto de genoma y extracción de información oculta y predecible. Estas predicciones a través de simulación por ordenador se verificaron posteriormente en experimentos realizados en el laboratorio. Sin embargo, la presente descripción proporciona evidencia genómica, proteómica y experimental que la proteína EPH-B4 (Proteína B4 de Hepatoma que Produce Eritropoyetina) y/o Éfrina A1 actúan como receptores EPO.

15 Trabajando en la teoría de que los efectos adversos de EPO vistos en muchos pacientes con cáncer puede estar mediado por un complejo de receptor distinto del homodímero del receptor EPO prototípico (EPOR), iniciamos un proyecto de descubrimiento a través de simulación por ordenador para tratar de identificar un receptor EPO novedoso. Si existen tales especies novedosas del receptor EPO, hacemos hipótesis de que serían responsables de mediar la actividad de supervivencia de la célula inducida por EPO, a diferencia de la actividad hematopoyética mediada por EPO. Sin embargo, proponemos la existencia de por lo menos dos especies del receptor EPO; el homodímero prototípico EPOR que es principalmente responsable de la actividad hematopoyética de EPO, y un receptor novedoso EPO, denominado NEPOR, que es principalmente responsable de las actividades citoprotectoras de EPO. La existencia de tal receptor EPO novedoso es convincente por tres razones principales. En primer lugar permite la predicción de un paciente con cáncer en respuesta a EPO. La presencia de NEPOR en una célula de tumor implicaría una respuesta negativa a EPO, debido a que la unión de EPO por NEPOR induciría una cascada de señales de supervivencia dentro de las células y tejidos del tumor, contribuyendo así a la evolución del cáncer y peor supervivencia del paciente. Sin embargo, la detección de la expresión de NEPOR en un tumor proporciona un bioetiquetador novedoso para estratificar los pacientes con cáncer según sea adecuado (es decir no está presente NEPOR) o no adecuado (es decir está presente NEPOR) para el tratamiento de EPO. Una consecuencia de este modelo es una segunda perspectiva interesante. Si el NEPOR es capaz de iniciar las señales de supervivencia en las células neoplásicas, entonces este representa un excelente objetivo terapéutico para el tratamiento contra los cánceres que expresan este receptor. Por lo tanto, las moléculas terapéuticas que dirigen y antagonizan la función protectora de tejido de este receptor deben ser agentes anti-neoplásicos eficaces. Finalmente, bajo condiciones donde es favorable la inducción de la supervivencia de la célula, tal como en respuesta a apoplejía isquémica, las moléculas terapéuticas capaces de activar las señales de supervivencia mediadas por NEPOR proporcionan una ruta eficaz para tratar una variedad de enfermedades neurológicas. La definición de la composición molecular de NEPOR por lo tanto proporciona la base molecular para diseñar dichas terapias.

40 Se ha propuesto previamente que el rHuEPO puede promover el crecimiento del tumor a través de la estimulación de la señalización del receptor Epo (EPOR) en células de tumor, y por medio de la estimulación de angiogénesis. La unión de EPO a los homodímeros EPOR se asume que confiere algo de ventaja de supervivencia a las células neoplásicas, lo que conduce a evolución loco-regional aumentada e índices de supervivencia más pobres en pacientes que tienen una forma de cáncer. Sin embargo, consciente de la promiscuidad de unión de los productos terapéuticos administrados exógenamente, estamos ansiosos de hacer frente a la posibilidad de si otro receptor podría ser responsable de los resultados negativos observados, ya sea solos o en interacción funcional con EPOR.

45 En un esfuerzo por identificar tal receptor EPO citoprotector novedoso, desarrollamos un método de análisis con base en simulación por ordenador diseñado específicamente para extraer el proteoma humano para las moléculas candidatas. Combinando la potencia de extracción de información oculta y predecible y el análisis de bioinformáticos en profundidad, este método con base en múltiple evidencia identifica exitosamente un receptor EPO novedoso putativo. La validación con base en laboratorio posterior soporta estos hallazgos. Dada su función fisiológica establecida, proponemos que al incidir en esta actividad de los receptores, la EPO puede conferir ventaja de supervivencia a determinadas células, que incluye células neoplásicas y neuronas. Como una consecuencia, la expresión de esta proteína en células neoplásicas se puede utilizar para estratificar la adecuabilidad de pacientes con cáncer para el tratamiento de EPO. Los pacientes con cáncer asociado a la expresión NEPOR deben estar contraindicados para el tratamiento de EPO. Sin embargo, un corolario de este hallazgo es que estos mismos individuos representan candidatos excelentes para tratamiento con terapias antagonistas anti-NEPOR. Adicionalmente, también proponemos que al mediar la actividad citoprotectora de EPO, el NEPOR representa un objetivo terapéutico excelente para una variedad de enfermedades que implican isquemia de tejido (por ejemplo apoplejía).

Por lo tanto, en el primer caso, la presente descripción proporciona un método para evaluar un tumor para expresión de NEPOR. La descripción proporciona un método para estratificar pacientes que tienen un tumor que es adecuado

(es decir no está presente NEPOR) o no adecuado (es decir, está presente NEPOR) para el tratamiento de EPO. El método descrito comprende: (a) aislar una muestra de tejido de un individuo quien recibe o debe recibir eritropoyetina, (b) determinar el nivel de expresión de los genes NEPOR (mARN) y/o la presencia del producto de gen NEPOR (proteína) del tejido aislado, y (c) correlacionar la presencia de un producto de expresión génica NEPOR o la presencia de la proteína NEPOR a una respuesta fisiológica para el tratamiento con eritropoyetina. En un segundo caso, la presente descripción un método para el tratamiento de pacientes que poseen tumores positivos NEPOR. Adicionalmente, se describe la presente descripción que proporciona un método para tratar apoplejía. Finalmente, al proporcionar un medio para comparar las afinidades de unión de los productos terapéuticos putativos con NEPOR y EPOR, la presente descripción proporciona un método para detectar los productos terapéuticos específicos NEPOR (productos terapéuticos antagonistas para cáncer, y productos terapéuticos agonistas para el tratamiento de hipoxia asociados con la enfermedad tal como apoplejía). Tales terapéuticos carecerán de la actividad hematopoyética asociada con la unión y señalización de EPOR.

NEPOR – Definición molecular

Identificamos un receptor EPO multimérico novedoso, que denominamos NEPOR. El NEPOR comprende las moléculas de EPHB4 y/o Efrina A1 ya sea como homodímeros o heterodímeros. Sin estar limitado por la teoría, estos componentes también pueden heterodimerizar con el receptor EPO. En la Figura 3 se proporciona una sinopsis de las posibles composiciones moleculares de NEPOR. A pesar del margen para la promiscuidad molecular que implica otros componentes de biología de efrina, el EPH-B4 y/o la Efrina A1 son componentes de un receptor EPO novedoso (NEPOR). Como tal el NEPOR se compone principalmente de EPH-B4 y Efrina A1, ya sea como homodímeros y/o en asociación heterodimérica entre sí, o el receptor EPO. Sin estar limitado por la teoría, dada la fuerte asociación funcional entre EPH-B4 y Efrina B2, el NEPOR también puede comprender Efrina B2 descrita aquí como la SEQ ID NO. 4 (secuencia de aminoácidos), SEQ ID NO. 8 (secuencia de mARN), y SEQ ID NO. 12 (región de unión).

La Tabla 5 muestra, sin estar limitado por la teoría, la posible composición molecular de receptores EPO diméricos. El receptor EPO hematopoyético prototípico (EPOR) representa un homodímero de dos monómeros EPOR (SEQ ID NO. 1) (1). Nuestros resultados sugieren que un dímero del receptor EPO protector de tejido novedoso está comprendido de Efrina A1 (SEQ ID NO. 3) y EPH-B4 (SEQ ID NO. 2). Se muestran posibles escenarios en la Tabla 5.

Tabla 5:

	Descripción	Monómero 1	Monómero 2
1	EPOR	SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 1
2	NEPOR	SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 2
3	NEPOR	SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 3
4	NEPOR	SEQ ID NO. 2	SEQ ID NO. 2
5	NEPOR	SEQ ID NO. 2	SEQ ID NO. 3
6	NEPOR	SEQ ID NO. 3	SEQ ID NO. 3
7	NEPOR	SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 4
8	NEPOR	SEQ ID NO. 2	SEQ ID NO. 4
9	NEPOR	SEQ ID NO. 3	SEQ ID NO. 4
10	NEPOR	SEQ ID NO. 4	SEQ ID NO. 4

SEQ ID NO. 1

>EPOR

```
MDHLGASLWFPQVGSCLLLAGAAWAPPNLPDPKPFESKAALLAARGPEELLCFTERLEDL
VCFWEBAASAGVGFPGNYSFSYQLEDEPWKLCRLHQAPTARGAVRFWC SLPTADTSSFVPL
ELRVTAASGAPRYHRVVIHINEVLLDAPVGLVARLADESGHVLRWLP PPEPMTSHIRY
EVDVSAGNGAGSVQRVEILEGRTECVLSNLRGRTRYTFAVRARMAEPSFGGFWSAWSEPV
SLLTPSDLDPLILTL SLILVVLVLLTVLALLSHRRALKQKIWPGI PPSPESEF EGLFPTH
KGNFQLWLYQNDGCLWSPCTPFTEDPPASLEVL SERCWGTMQAVEPGT DDEGPLLEPVG
SEHAQDQTYLVLDKWL LPRNPPSEDLPGPGGSVDIVAMDEGSEASSC SSSALASKPSPEGAS
```

**AASFYEYTLDPSSQLLRPWTLCPPELPTPHLKYLYLVVSDSGISTDYSSGDSQGAQGGL  
SDGPYSNPYENSLI PAAEPLPPSYVACS**

SEQ ID NO. 2

> EPH-B4

**MELRVLLCWASLAAALEETLLNFKLETADLKWVTFPQVDGQWEELSGLDDEEQHSVRTYEV  
CDVQRAPGQAHWLRGTGWVPRRGAVHVYATLRFTMLECLSLPRAGRSCKETFTVFYYESDA  
DTATALTPAWMENPYIKVDTVAAEHLTRKRPGAETGKVNKTLRLGPLSKAGFYLAQD  
QGACMALLSLHLFYKCAQLTVNLTRFPETVPRELVVPVAGSCVVDVAVPAGPSPSLYCR  
EDGQWAEQPVGTGCSCAPGFEAAEGNTKCRACAQGTFFKPLSGEGSCQPCPANSHTSNTIGSA  
VCQCRVGYFRARTDPRGAPCTTTPSAPRSVVSRLNGSSLHLEWSAPLES GGREDLTYALR  
CRECRPGGSCAPCGDLTFDPRDLVEPWVVRGLRDPFTYTFEVTALNGVSSLATGPV  
PFEPVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSSLSLAWAVPRAPSGAVLDYEVKYHEKGAEGPS  
SVRFLKTSENRAELRGLKRGASYLVQVRARSEAGYGFQGEHHSQTQLDESEGWREQLAL  
IAGTAVVGVVLLVVIIVAVLCLRKQSNGREAEYSDKHGQYLI GHGTVYIDPFTYEDPN  
EAVREFAKEIDVSYVKIEEVI GAGEFGEVCRGRLKAPGKKECVAIKTLKGGYTERQRRE  
FLSEASIMQFEHPNIIRLEGVVTNSMPVMILTEFMENGALDSFLRLNDGQFTVIQLVGM  
LRGIASGMRYLAEMSYVHRDLAARNILVNSNLVCKVSDPGLSRFLEENSSDPTYTSSLGG  
KIPIRWTAPEAIAFRKFTSASDAWSYGIWMWEVMSFGERPYWDMNQDVINAIEQDYRLP  
PPDCPTSLHQLMLDCWQKDRNARPRFPQVVSALDKMIRNPASLKIVARENGGASHPLLD  
QRQPHYSAFGSVGEWLRRAIKMGRYEE SFAAAGFGS FELVSI SAEDLLRIGVTLAGHQK  
ILASVQHMKSQAKPGTGGTGGPAPQY**

5 SEQ ID NO. 3

> Efrina A1

**MEFLWAPLLGLCCSLAAADRHTVFWNSSNPKFRNEDYTIHVQLNDYVDIICPHYEDHVA  
DAAMEQYIYLVEHEEYQLCQFPQSKDQVRWQCNRPSAKHGPEKLEKFORFTPF TLGKEF  
KEGHSYYYISKPIHQHEDRCLRLKVTVSGKI THSPQAHNDNPQEKRLAADDPEVRVLHSIG  
HSAAPRLFLAWTVLLLPLLLLQTP**

SEQ ID NO. 4

> Efrina B2

**MAVRRDSVWKYCWGVLMLVLCRTAISKSIVLEPIYWNSSNSKFLPGQGLVLYPQIGDKLDI  
ICPKVDSKTVGQYEQYKVMVDKQADRCTIKKENTPLLCAKPDQDIKFTIKFQEFSPN  
LWGLEFQKNKDYYIISTSNGLSLEGLDNQEGGVCQTRAMKILMKVGDASSAGSTRNKDPT  
RRPELEAGTNGRSSTSPFVKPNPGSSTDCNSAGHSGNNILGSEVALFAGIASGCIIFIV  
IIITLVVLLLKYRRRHRKHS PQHTTTLSTLATPKRSGNNNGSEPSDIIIPLR TADSVF  
CPHYEKVSGDYGHPVYIVQEMPPQSPANIYYKV**

10

La presente descripción incluye cualquier variante de división de los componentes de los polipéptidos de la SEQ ID NOS 1-4 que poseen la región de unión extracelular EPO (para esta región EPH-B4 se propone abarcar los dos dominios fibronectina III; las estructuras ovales rosadas en la Figura 3B, D y F) y la parte de señalización intracelular, también es capaz de mediar el efecto cito-protector de EPO (y sus derivados).

15 NEPOR: Implicaciones de pronóstico

La citoquina tipo 1, Eritropoyetina (EPO), posee actividades protectoras de tejido y hematopoyéticas. La presente descripción establece que la funcionalidad de este último está mediada a través de las interacciones de EPO con un receptor novedoso EPO, denominado NEPOR. El modelo proporciona que la unión de los complejos del receptor de EPO a NEPOR, en células neoplásicas positivas NEPOR, confiere ventaja de supervivencia a dichas células. El resultado fisiológico implícito para pacientes que poseen cánceres positivos NEPOR aumenta por lo tanto la evolución loco-regional del cáncer y supervivencia general más pobre.

20

Por lo tanto, la presente descripción proporciona una prueba diagnóstica o pronóstica que puede predecir sí o no los pacientes con cáncer que se les administra EPO responderán negativamente en términos del resultado de

5 supervivencia. La prueba pronóstica comprende determinar NEPOR (es decir EPH-B4, y/o Efrina A1) en tejido de tumor, o más particularmente células neoplásicas. En otra realización los niveles de expresión del gen de componente NEPOR en las células neoplásicas se puede comparar con niveles en valores iniciales o niveles en las células o tejido normal circundante. Por lo tanto, un análisis comparativo que estudia los niveles de expresión  
 5 iniciales elevados o normales de la expresión del componente NEPOR, utilizando métodos de análisis de expresión de gen estándar (tales como q-PCR y análisis de micromatriz de ADN) proporciona una prueba diagnóstica que puede determinar si o no la administración de EPO a pacientes con cáncer mejoraría sin saberlo la supervivencia de la célula neoplásica (un resultado negativo).

10 Como se indica, un método que se puede utilizar para comparar los niveles de expresión de gen de los componentes de NEPOR y/o EPH-B4, y/o Efrina A1 es reacción de cadena polimerasa cuantitativa (qPCR). Esto es una modificación de PCR o la reacción de cadena polimerasa utilizada para medir rápidamente la cantidad de ADN presente en una muestra de tejido. Como otras formas de reacción de la cadena polimerasa, se utiliza el proceso para amplificar las muestras de ácido nucleico, por medio de la polimerasa de ADN de enzima mediada por  
 15 temperatura. El PCR amplifica el ADN exponencialmente, doblando el número de moléculas presentes con cada ciclo de amplificación. El número de ciclos de amplificación y la cantidad de producto final PCR nos debe permitir calcular la cantidad inicial del material genético específico de NEPOR y/o el material genético EPH-B4 y/o Efrina A1 en particular moléculas de mRNA utilizando secuencias de componente específico de NEPOR en particular y/o las secuencias EPH-B4, y/o Efrina A1 para los dos cebadores utilizados para amplificación.

20 Adicionalmente, el análisis de expresión de gen de los componentes NEPOR y/o EPH-B4, y/o Efrina A1 se puede hacer con un análisis de micromatriz que contiene una pluralidad de sondas de captura específicas para las secuencias del complejo NEPOR en particular y/o EPH-B4, y/o Efrina A1. Se propone que EPO estimula la supervivencia de células neoplásicas positivas NEPOR y/o células positivas EPH-B4, y/o Efrina A1, es importante probar todos los pacientes con cáncer para el estado NEPOR y/o el estado EPH-B4, y/o Efrina A1 antes de y durante la administración de EPO. Esto se hace mejor con un análisis de micromatriz para el estado de expresión de  
 25 los genes de componente NEPOR en tejido de tumor y con muestras de mRNA tomadas del tejido de tumor. Determinar los niveles de tumor endógeno asociado con la expresión NEPOR (es decir EPH-B4, y/o Efrina A1), proporciona correlaciones como un índice de pronóstico/supervivencia del paciente.

30 La presente descripción así proporciona un método para estratificar pacientes que tienen un tumor que es adecuado (es decir NEPOR no está presente y/o EPH-B4, y/o Efrina A1 presente) o no adecuado (es decir, NEPOR está presente y/o EPH-B4, y/o Efrina A1) para el tratamiento de EPO. El método descrito comprende: (a) aislar una muestra de tejido de un individuo quien recibe o recibirá eritropoyetina, (b) determinar el nivel de expresión de EPH-B4 y/o Efrina A1 del tejido aislado, y (c) correlacionar la presencia de estos productos de expresión de gen de componente a la respuesta fisiológica negativa para el tratamiento con eritropoyetina.

SEQ ID NO. 5

35 > receptor de eritropoyetina (EPOR), mRNA

ACTTAGAGGCGCCTGGTCGGGAAGGGCCTGGTCAGCTGCGTCCGGCGGAGGCAGCTGCTGACCCAGCTGT  
GGACTGTGCCGGGGCGGGGGACGGAGGGGCAGGAGCCCTGGGCTCCCCGTGGCGGGGGCTGTATCATGG  
ACCACCTCGGGGCGTCCCTCTGGCCCCAGGTCCGGCTCCCTTTGTCTCCTGCTCGCTGGGGCCGCTGGGC  
GCCCCCGCCTAACCTCCCGGACCCCCAAGTTCGAGAGCAAAGCGGCCCTTGCTGGCGGCCCGGGGGCCCCGAA  
GAGCTTCTGTGCTTACCGAGCGGTGGAGGACTTGGTGTGTTCCTGGGAGGAAGCGGCAGAGCTGGGG  
TGGGCCCCGGGCAACTACAGCTTCTCCTACCAGCTCGAGGATGAGCCATGGAAGCTGTGTGCGCTGCACCA  
GGCTCCACGGCTCGTGGTGCGGTGCCTTCTGGTGTTCGCTGCCTACAGCCGACACGTCGAGCTTTCGTG  
CCCCTAGAGTTGCGCGTACAGCAGCCTCCGGCGCTCCCGCATATCACCCTGTATCCACATCAATGAAG  
TAGTGTCTCTAGACGCCCCGTGGGGCTGGTGGCGCGGTGGCTGACGAGAGCGGCCACGTAGTGTTCG  
CTGGCTCCCGCCGCTGAGACACCCATGACGTCTCACATCCGCTACGAGGTGGACGCTCTGGCCGGCAAC  
GGCGCAGGGAGCGTACAGAGGGTGGAGATCTGGAGGGCCGACCGAGTGTGTGCTGAGCAACCTGCGGG  
GCCGGACGCGCTACACCTTCGCCGTCCGCGCGCGTATGGCTGAGCCGAGCTTCGGCGGCTTCTGGAGCGC  
CTGGTCCGAGCCTGTGTGCTGCTGACGCCCTAGCGACCTGGACCCCCCTCATCCTGACGCTCTCCCTCATC  
CTCGTGGTTCATCTGGTGTGCTGACCGTGTCCGCGTGTCTCTCCACCGCCGGGCTCTGAAGCAGAAGA  
TCTGGCCTGGCATCCCGAGCCAGAGAGCGAGTTTGAAGGCCCTCTTACCACCCACAAGGGTAACTTCCA  
GCTGTGGCTGTACCAGAATGATGGCTGCCCTGTGGTGGAGCCCTGCACCCCTTACGGAGGACCCACCT  
GCTTCCCTGGAAGTCCCTCTCAGAGCGCTGCTGGGGGACGATGCAGGCAGTGGAGCCGGGGACAGATGATG  
AGGGCCCCCTGCTGGAGCCAGTGGGCAGTGGCATGCCAGGATACCTATCTGGTGTGAGCAAAATGGTT  
GCTGCCCGGAACCCGCCCAGTGGAGACCCTCCAGGGCCCTGGTGGCAGTGTGGACATAGTGGCCATGGAT  
GAAGGCTCAGAAGCATCTCTGCTCATCTGCTTTGGCCTCGAAGCCAGCCAGAGGGAGCCTCTGCTG  
CCAGCTTTGAGTACACTATCTGGACCCCAGCTCCAGCTCTTGCCTCCATGGACACTGTGCCCTGAGCT  
GCCCCCTACCCACCCACCTAAAGTACCTGTACCTTGTGGTATCTGACTCTGGCATCTCAACTGACTAC  
AGCTCAGGGGACTCCAGGGGAGCCCAAGGGGGCTTATCCGATGGCCCTACTCCAACCTTATGAGAACA  
GCCTTATCCAGCCGCTGAGCCTCTGCCCCAGCTATGTGGCTTGTCTTATAGGACACCAGGCTGCAGAT  
GATCAGGGATCCAAATGACTCAGAGAACCAGTGCAGACTCAAGACTTATGGAACAGGGATGGCGAGGCC  
TCTCTCAGGAGCAGGGGCATTGCTGATTTGTCTGCCCAATCCATCCTGCTCAGGAAACCACAACCTTGC  
AGTATTTTTAAATATGTATAGTTTTTTTTG

SEQ ID NO. 6

> Receptor EPH B4 (EPHB4), mRNA

TTCCAGCGCAGCTCAGCCCCGCCCCGGCCCGCCGGCTCCGCGCCGACAGTCTCCCTCCCTCCCGC  
TCCGTCCCCGCTCGGGCTCCACCATCCCCGCCCCGCGAGGAGCACTCGGCCCGGGCGGCGAGCAGAG  
CCACTCCAGGGAGGGGGGAGACCGCGAGCGGCCGGCTCAGCCCCGCCACCCGGGGCGGGACCCCGAGG  
CCCCGGAGGGACCCCACTCCAGCCAGTCTTGTGCTGCGCGCCCGCCCGGCGCGGCCACTGCCAGCAGCT  
CCGGGCCCCGCCCCGCGCGCGGGCACAGACCGGGGCCACACTTGGCGCCCGCCCGGCTGCCCGCA  
CGCTCGCATGGGCCCGCGCTGAGGGCCCCGACGAGGAGTCCCGCGCGGAGTATCGGCGTCCACCCGCCA  
GGGAGAGTCAAGCTGGGGGGGCGAGGGCCCCCAACTCAGTTCGGATCCTACCCGAGTGGGCGGCGC  
CATGGAGCTCCGGGTGCTGCTCTGCTGGGCTTCGTTGGCCGCACTTGTGAAGAGACCCTGCTGAACACA  
AAATGGAAACTGCTGATCTGAAGTGGGTGACATTCCTCAGGTGGACGGGCAGTGGGAGGAACTGAGCG  
GCTGGATGAGGAACAGCACAGCGTGCACCTACGAAGTGTGTGACGTGCAGCGTGCAGGCGGGCCAGGC  
CCACTGGCTTCGCACAGGTGGGTCCCAGGGCGGGCGCCCTCCAGTGTACGCCACGCTGCGCTTACC  
ATGCTCGAGTGCCTGTCCTGCTCGGGCTGGGCGCTCCGCAAGGAGACCTTACCGTCTTCTACTATG  
AGAGCGATGCGGACACGGCCACGGCCCTACGCCAGCTGGATGGAGAACCCTACATCAAGGTGGACAC  
GGTGGCCGCGGAGCATCTACCCGGAAGCGCCCTGGGGCCGAGGCCACCGGAAGGTGAATGTCAAGACG  
CTGCGTCTGGGACCGCTCAGCAAGGCTGGCTTCTACCTGGCTTCCAGGACCAGGGTGCCTGCAAGGCC  
TGCTATCCCTGCACCTCTTCTACAAAAGTGCGCCAGCTGACTGTGAACCTGACTCGATTCCCGGAGAC  
TGTGCTCGGGAGCTGGTTGTGCCCGTGGCCGGTAGCTGCGTGGTGGATGCCGTCCCCGCCCTGGCCCC  
AGCCCCAGCCTTACTGCGGTGAGGATGGCCAGTGGGCCGAACAGCCGGTACGGGCTGCAGCTGTGCTC  
CGGGTTTCAGGGCAGTGGGGGAACACCAAGTGGCGAGCCTGTGCCAGGGCACCTTCAAGCCCCGTCTC  
AGGAGAAGGGTCTGCCAGCCATGCCAGCCAATAGCCACTTAAACACCATTGGATCAGCCGCTGCCAG  
TGCCGCGTGGGTACTTCCGGGCACGCACAGACCCCCGGGGTGCAACCTGCACCACCCCTCTTCCGGCTC  
CGCGGAGCGTGGTTTCCCGCTGAACGGCTCCTCCCTGCACCTGGAATGGAGTGCACCCCTGGAGTCTGG  
TGCCCGAGAGGACTCACCTACGCCCTCCGCTGCCGGGAGTGCAGCCCGGAGGCTCCTGTGCCCTG

GGGGGAGACCTGACTTTTTGACCCCGGCCCGGGACCTGGTGGAGCCCTGGGTGGTGGTTTCGAGGGCTAC  
 GTCCTGACTTACCTATACCTTTGAGGTCACTGCATTGAACGGGGTATCCTCCTTAGCCACGGGGCCCGT  
 CCCATTTGAGCCTGTCAATGTCACCAC TGACCGAGAGGTACCTCCTGCAGTGTCTGACATCCGGGTGACG  
 CGGTCCACCCAGCAGCTTGAGCCTGGCCTGGGCTGTTCCCGGGCACCCAGTGGGGCTGTGCTGGACT  
 ACGAGGTCAAATACCATGAGAAGGGCGCCGAGGGTCCCAGCAGCGTCCGGTTCCTGAAGACGTGAGAAAA  
 CCGGGCAGAGCTGCGGGGGCTGAAGCGGGGAGCCAGCTACCTGGTGCAGGTACGGGGCGCGCTCTGAGGCC  
 GGCTACGGGCCCTTCGGCCAGGAACATCACAGCCAGACCCAAC TGGATGAGAGCGGAGGGCTGGCGGGAGC  
 AGCTGGCCCTGATTGCGGGCACGGCAGTCGTGGGTGTGGTCC TGGTCC TGGTGGTCAATTGTGGTCCGAGT  
 TC'TCGCTCAGGAAGCAGAGCAATGGGAGAGAAGCAGAATATTCGGACAAACACGGACAGTATCTCATC  
 GGACATGGTACTAAGGTCTACATCGACCCCTTCACTTATGAAGACCC TAATGAGGCTGTGAGGGAAATTTG  
 CAAAAGAGATCGATGTCTCCTACGTCAAGATTGAAGAGGTGATTGGTGCAGGTGAGTTTGGCGAGGTGTG  
 CCGGGGCGGCTCAAGGCCCCAGGGAAAGAAGGAGAGCTGTGTGGCAATCAAGACCCTGAAGGGTGGCTAC  
 ACGGAGCGGCAGCGGCGTGAGTTTCTGAGCGAGGCCTCCATCATGGGCCAGTTCGAGCACCCCAATATCA  
 TCCGCTGGAGGGCGTGGTACCAACAGCATGCCCGTCATGATTCACAGAGTTCATGGAGAACGGCGC  
 CCTGGACTCCTTCTGCGGCTAAACGACGGACAGTTCACAGTCATCCAGCTCGTGGGCATGCTGCGGGGC  
 ATCGCCTCGGGCATGCGGTACCTTGCCGAGATGAGCTACGTCCACCGAGACCTGGCTGCTCGCAACATCC  
 TAGTCAACAGCAACCTCGTCTGCAAAGTGTCTGACTTTGGCCTTCCCGATTCCTGGAGGAGAACTCTTC  
 CGATCCACCTACACGAGCTCCCTGGGAGGAAAGATTCCCATCGATGGACTGCCCGGAGGCCATTGGC  
 TTCCGGAAAGTTCACCTCCGCCAGTGTGCTGGAGTTACGGGATTGTGATGTGGGAGGTGATGTCAATTTG  
 GGGAGAGGCCGTACTGGGACATGAGCAATCAGGACGTGATCAATGCCATTGAACAGGACTACCGGCTGCC  
 CCGCCCCAGACTGTCCACCTCCCTCCAC CAGCTCATGCTGGACTGTTGGCAGAAAGACC GGAATGCC  
 CGGCCCCGCTTCCCCAGGTGGTCAGCGCCCTGGACAAGATGATCCGGAACCCCGCCAGCCTCAAAATCG  
 TGGCCCGGAGAATGGCGGGGCTCACACCTCTCCTGGACCAGCGGCAGCTCACTACTCAGCTTTTGG  
 CTCTGTGGGCGAGTGGCTTCGGGCCATCAAAATGGGAAGATACGAAGAAAGTTTCGCAGCCGCTGGCTTT  
 GGC'TCCTTCGAGCTGGTCAAGCAGATCTCTGCTGAGGACCTGCTCCGAATCGGAGTCACTCTGGCGGGAC  
 ACCAGAAGAAAATCTTGGCCAGTGTCCAGCACATGAAGTCCAGGCCAAGCCGGGAACCCCGGTGGGAC  
 AGGAGBACC GGCCCGCAGTAC TGACCTGCAGGAACTCCCCACCCAGGGACACCGCTTCCCCATTTTC  
 GGGCAGAGTGGGACTCACAGAGGCCCCAGCCCTGTGCCCCGCTGGATTGCACTTTGAGCCCGTGGGG  
 TGAGGAGTTGGCAATTTGGAGAGACAGGATTTGGGGGTTCTGCCATAATAGGAGGGGAAAATCACCCCC  
 AGCCACCTCGGGAACTCCAGACCAAGGGTGAGGGCGCTTTCCCTCAGGACTGGGTGTGACCAGAGGAA  
 AAGGAAGTGCCCAACATCTCCAGCC'TCCCCAGGTGCCCCCTCACCTTGATGGGTGCGTTCCCGCAGAC  
 CAAAGAGAGTGTGACTCCCTTGCCAGCTCCAGAGTGGGGGGCTGTCCAGGGGGCAAGAAGGGGTGTCA  
 GGGCCAGTGACAAAATCATTGGGGTTTGTAGTCCCAACTTGTGCTGTACCACCAAAC TCAATCAATTT  
 TTTTCCCTTGTAAATGCCCTTCCCCAGCTGCTGCCTTCATATTGAAGGTTTTTTGAGTTTTTGTTTTTGGT  
 CTTAATTTTTCTCCCCGTTCCTTTTTTGTTCGTTTTTGTTTTTTCTACCGTCTTGTGATAACTTTGT  
 GTTGGAGGAACTGTTTCACTATGGCC TCTTTGCCAAGTTGAAACAGGGGCCATCATATGTCTGT  
 TTCCAGAACAGTGCCTTGGTTCATCCACATCCCCGACCCCGCTGGGACCCCAAGCTGTGTCTTATGA  
 AAGGGTGTGGGGTGGGTAGTGAAGGGCGGTAGTTGGTGGTGGAAACCAGAAACGGACGCCGGTGTCT  
 GGAGGGGTTCTTAAATATATTTAAAAAAGTAACTTTTGTATAAATAAAAAGAAAATGGGACGTGTCCCA  
 GCTCCAGGGGTAAAAA AAAAAAAAAA

SEQ ID NO. 7

> Efrina A1 (EFNA1) mRNA

GCCAGATCTGTGAGCCAGCGCTGACTGCGCCGCGGAGAAAGCCAGTGGGAACCCAGACCCATAGGAGAC  
CCGCGTCCCCGCTCGGCCCTGGCCAGGCCCCCGCTATGGAGTTCCCTCTGGGCCCTCTCTTGGGTCTGTG  
CTGCAGTCTGGCCGCTGCTGATCGCCACACCGTCTTCTGGAACAGTTCAAAATCCCAAGTTCGGGAATGAG  
GACTACACCATACATGTGCAGCTGAATGACTACGTGGACATCATCTGTCCGCACTATGAAGATCACTCTG  
TGGCAGACGCTGCCATGGAGCAGTACATACTGTACCTGGTGGAGCATGAGGAGTACCAGCTGTGCCAGCC  
CCAGTCCAAGGACCAAGTCCGCTGGCAGTGCACCGGCCAGTGCCAAGCATGGCCCGGAGAAGCTGTCT  
GAGAAGTTCAGCGCTTACACCTTTTCAACCTGGGCAAGGAETTCAAAGAAGGACACAGCTACTACTACA  
TCTCCAACCATCCACCAGCATGAAGACCCTGCTTGGAGTTGAAGGTGACTGTCAGTGGCAAAATCAC  
TCACAGTCTCAGGCCATGACAATCCACAGGAGAAGAGACTTGCAGCAGATGACCCAGAGGTGCGGGTT  
CTACATAGCATCGGTCACAGTGTGCCCCACGCTCTTCCCCTTGGACTGTGTCTTCCCTCCAC  
TTCTGTGCTGCAAACCCGTAAGGTGTATGCCACACCTGGCCTTAAAGAGGGACAGGCTGAAGAGAGG  
GACAGGCACTCAAACCTGTCTTGGGGCCACTTTCAGAGCCCCAGCCCTGGGAACCACTCCACCACAG  
GCATAAGCTATCACCTAGCAGCCTCAAACCGGGTCAGTATTAAGGTTTTCACCCGGAAGGAGGCCAACCA  
GCCCCAGCTGCCATCCCCACCTTCCCTCGGAGGGATGGAGAAAGAAGTGGAGACAGTCTTTCCACC  
ATTCCTGCTTTAAGCCAAAGAAACAAGCTGTGCAGGCATGGTCCCTTAAGCCACAGTGGGAGCTGAGCT  
GGAAGGGCCACGTGGATGGCAAAGCTTGTCAAAGATGCCCCCTCCAGGAGAGAGCCAGGATGCCAGA  
TGAAGTACTGAAGGAAAAGCAAGAAACAGTTTCTTGTCTTGGAAAGCCAGGTACAGGAGAGGCAGCATGCT  
TGGGCTGACCCAGCATCTCCAGCAAGACCTCATCTGTGGAGCTGCCACAGAGAAGTTTGTAGCCAGGTA  
CTGCATTCTCTCCCATCTGGGGCAGCACCCCCAGAGCTGTGCCAGCAGGGGGCTGTGCCAACCTGTT

CTTAGAGTGTAGCTGTAAGGGCAGTGCCCATGTGTACATTCTGCCTAGAGTGTAGCTTAAAGGGCAGGGC  
CCACGTGTATAGTATCTGTATATAAGTTGCTGTGTGTCTGTCTGATTTCTACAACCTGGAGTTTTTTTAT  
ACAATGTCTTTGTCTCAAATAAAGCAATGTGTTTTTTCGGACATGCTTTCTGCCACTCCATATTA  
ACATATGACCATTGAGTCCCTGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO. 8

> Efrina B2 (EFNB2), mRNA

GC GCGGAGCTGGGAGTGGCTTCGCCATGGCTGTGAGAAGGGACTCCGTGTGGAAGTACTGCTGGGGTGT  
TTGATGGTTTTATGCAGAAGTTCGATTTTCAAATCGATAGTTTTAGAGCCTATCTATTGGAAATTCCTCGA  
ACTCCAAATTTCTACCTGGACAAGGACTGGTACTATACCACAGATAGGAGACAAATTGGATATTATTTG  
CCCCAAAGTGGACTCTAAAACCTGTTGGCCAGTATGAATATTTATAAAGTTTATATGGTTGATAAAGACCAA  
GCAGACAGATGCATATTAAGAAGGAAAATACCCCTCCTCAACTGTGCCAAACCAGACCAAGATATCA  
AATTCACCATCAAGTTTCAAGAATTCAGCCCTAACCTCTGGGGTCTAGAATTTTCAGAAACAAGATTA  
TTACATTATATCTACATCAAATGGGTCTTTGGAGGGCTGGATAACCAGGAGGGAGGGGTGTGCCAGACA  
AGAGCCATGAAGATCCTCATGAAAGTTGGACAAGATGCAAGTTCTGCTGGATCAACCAGGAATAAAGATC  
CAACAAGACGCTCCAGAACTAGAAGCTGGTACAAATGGAAGAAGTTGCAACAACAGTCCCTTTGTAAAACC  
AAATCCAGGTTCTAGCACAGACGGCAACAGCGCCGGACATTCGGGGAAACAATCCTCGGTTCCGAAGTG  
GCCTTATTTGCAGGGATGTCTCAGGATGCATCATCTTCATCGTCATCATCATCACGCTGGTGGTCCCT  
TGCTGAAGTACCGGAGGAGACACAGGAAGCACTCGCCGACGACACGACCAGCTGTGCTCAGCACACT  
GGCCACACCCAAAGCGCAGCGGCAACAACAACGGCTCAGAGCCAGTGACATTATCATCCCGCTAAGGACT  
GCGGACAGGCTCTTCTGCCCTCACTACGAGAAGGTGAGCGGGGACTACGGGCACCCGGTGTACATCGTCC  
AGGAGATGCCCCGACAGACCCCGCGAACATTTACTACAAGGCTGAGAGGGACCCCTGGTGGTACCTGTG  
CTTTCCAGAGGACACTTAATGTCCCGATGCCCTCCCTTGAGGGTTGAGAGCCCGCTGTGGAGAATTG  
ACTGAAGCACAGCACCGGGGAGAGGGACACTCCTCCTCGAAGAGCCGTCGCGCTGGACAGCTTACCT  
AGTCTTGTAGCATTCGGCCTTTGGTGAACACACAGCTCCCTGGAAGCTGGAAGACTGTGCAGAAAGACGCC  
CATTCGGACTGCTGTGCCGCTCCACGCTCCTCCTCGAAGCCATGTGCTGCGGTCACTCAGGCCCTCTG  
CAGAAGCCAAGGGAAGACAGTGGTTTTGTTGGACGAGAGGGCTGTGAGCATCCTGGCAGGTGCCCCAGGATG  
CCACGCTTGAAGGGCCGGCTTCGCTGGGGTGCATTTCCCGCAGTGCATACCGGACTTGTACACAG  
GACCTCGGCTAGTTAAGGTGTGCAAAAGATCTCAGAGTTTGTAGCTTACTGTCTCACTCTCTGTCTTAC  
CCAGGGCTCTGCAGCACTCACCTGAGACCTCCACTCCACATCTGCATCACTCATGGAACACTCATGTCT  
GGAGTCCCTCCTCCAGCCGCTGGCAACAACAGCTTCAGTCCATGGTAAATCCGTTTCATAGAAATTGTGT  
TTGCTAACAAAGGTGCCCTTTAGCCAGATGCTAGGCTGTCTGCGAAGAAGGCTAGGAGTTCTAGAAAGGGA  
GTGGGGCTGGGAAAGGGCTGGCTGCAATTGCAGCTCACTGTCTGCTGCCCTGAAACAGAAAGTTGGAAA  
GGAAAAAGAAAAAGCAATTAGGTAGCACAGCACTTTGGTTTTGCTGAGATCGAAGAGGCCAGTAGGAG  
ACACGACAGCACACAGTGGATTCAGTGCATGGGGAGGCACTCGCTGTTATCAAATAGCGATGTGCAG  
GAAAGAAAGCCCTCTTCATTTCCGGGAAACAAGACGGGTATTGTTGGGAAAGGAACAGGCTTTGGAGGGA  
AGGGAGAAAGTAGGCCGCTGATGATATATTCGGGCAGGACTGTTGTGGTACTGGCAATAAGATACACAGC  
TCCGAGCTGTAGGAGAGTCCGCTGTCTTTGGATGATTTTTTAAGCAGACTCAGCTGTATACTTTATCACA  
TTTTTAAACACAGGGAAGCAATTAGGTAGCACAGCACTTTGGTTTTGCTGAGATCGAAGAGGCCAGTAGGAG  
CAAAGGTCAAACAGGCTGTAATTCATCATCATCGTTGTTATTAAGAATCCTTATCTATAAAAAGGTAGG  
TCAGATCCCCCTCCCCCAGGTTCTCTCTCCCTCCCGATTGAGCCTTACGACACTTTGGTTTTATGCGG  
TGCTGTCCGGGTGCCAGGGCTGCAGGGTCCGTTACTGATGGAGGCTGCAGCGCCCGGTGCTCTGTGTCAAG  
GTGAAGCAGATACGGCAGACCTCTTAGAGTCTTAAGACGGAAGTAAATTAATGATGTCCAGGGGGAGAAG  
GAAGATAGGACGTATTTATAATAGGTATATAGAACAAGGGATATAAATGAAAGATTTTTACTAATAT  
ATATTTTAAAGTTGCACACAGTACACAGGAAGATGTGAAATTCATTTGTGGCAATTAAGTGGTCCCAA  
TGCTCAGCGCTTAAAAAACAATTTGGACAGCTACTTCTGGGAAAAACAACATCAATCCAAAAAGAACA  
TAATGAGAGCAAAATGCAAAAATAACCAAGTCTCCGAAGGCATCTCAGGAAACCGTAGACTAGGAAGTAC  
GAGCCCCACAGAGCAGGAAGCCGATGTGACTGCATCATATATTTAAACAATGACAAGATGTTCCGGCCTT  
ATTTCTCGGTTGGGTTTTCCCTGCTCTATGGGCTGAAGTGTCTCTAGAATCCAGCAGGTCACACTGGG  
GGCTTCAGGTGACGATTTAAGCTGTGGCTCCCTCCTCTGCTCCCGCACCCCTCCCTCTCTGGGAAA  
CAAGAAGAGTAAACAGGAAACCTACTTTTTATGTGCTATGCAAAATAGACATCTTTAACATAGTCTCTGT  
ACTATGGTAACACTTTGCTTTCTGAATTGGAAGGGAAAAAATGTAGCGACAGCATTTTAAGGTTCTCA  
GACCTCCAGTGAGTACCTGCAAAAATGAGTTGTACAGAAAATATGATCCTCTATTTCTGAACTGGAA  
ATGATGTTGGTCCAAAGTGCCTGTGTGTATGTGTGAGTGGGTGCGTGGTATACATGTGTACATATATGTA  
TAATATATATCTACAAATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT  
GCCACAGTACATATGTAATCTTTCCATCACCCCAACCTCTCCTTTCTGTGCATTCATGCAAGAGTTTCT  
TGTAAGCCATCAGAAGTACTTTTAGGATGGGGGAGAGGGGCGAGAAGGGGAAAAATGGGAAATAGTCTG  
ATTTTAAATGAAATCAAATGTATGTATCATCAGTTGGCTACGTTTTGGTTCTATGCTAAACTGTGAAAAAT  
CAGATGAATTGATAAAAAGAGTCCCTGCAACCAATTGAAAAGTGTCTGTGCGCTGTGTTTTGTGTCTGGT  
GCAGAATATGACAATTCACCAACTGTCCTTTGTTGAACTTGGTTAGCTTTGGAAAGTTACTGTAAAT  
GCCTTGCTTGTATGATGCTCCCTGGTCAACCGACTTTGGAATTTGCACCATCATGTTTCACTGAAAGATGC  
TGTAATAGGTTAGATTTTACTGTCTATGGAATTTGGGGTGTACAGTAGCCTTATTCACCTTTTAAATA  
AAAATACACATGAAAACAAGAAAGAAATGGCTTTTCTTACCAGATGTGTACATAGAGCAATGTTGGTT

TTTTATAAAGTCAAGCAAGATGTTTTGTATAAAAATCTGAATTTTGCATGATTTAGCTACAGCTTGT  
TAACGGCAGTGTCAATCCCTTTGCACTGTAATGAGGAAAAAATGGTATAAAGGTTGCCAAATTTGCTGC  
ATATTTGTGCCGTAATATGTAACCATGAATATTTATTTAAAAATTTCCGTTGTCCAAATTTGTAAGTAACACA  
GTATTTAGCCTGAGTTATAAATATTTTCTTTCTTTGTTTTATTTTAAAGCCTGTATAGGTTTAA  
ATCTGCTTTAGTTTACATTCAGTTAGCCCCAGAAAATGAAATCCGTGAAGTCAATTCACATCTGTT  
TCAAATGAATTTGTTCTTAAAAAATAAATAATTTTTTTCTATGAAAAAATAAAAAAAAAA

La detección del mARN del componente NEPOR (SEQ ID NOs 5-8) se debe realizar preferiblemente utilizando sondas complementarias a la subregión de la SEQ ID NOs 5-8, que codifican el dominio de unión EPO y es particular a la SEQ ID NO. 6 y/o 7 que codifica EPH-B4 y Efrina A1. Esto implica para EPH-B4, sondas complementarias a la SEQ ID NO. 10.; para Efrina A1, sondas complementarias a la SEQ ID NO. 11.

5

SEQ ID NO. 9

>epor\_unión a epo\_región de codificación

```
AGCAAAGCGGCCCTTGCTGGCGGCCCGGGGGCCGAAGAGCTTCTGTGCTTACCCGAGCGGTTGGAGGACTTGTGTG
TTTCTGGGAGGAAGCGGCAGCGCTGGGGTGGGCCCGGGCAACTACAGCTTCTCCTACCAGCTCGAGGATGAGCCAT
GGAAGCTGTGTGCGCTGCACCAAGGCTCCACGGCTCGTGGTGGGTCGCTTCTGGTGTTCGCTGCCTACAGCCGAC
ACGTTCGAGCTTCGTGCCCTTAGAGTTCGCGCTCACAGCAGCCTCCGGCGCTCCGCGATATCACCGTGTATCCACAT
CAATGAAGTAGTGTCTTAGACGCCCCCGTGGGGCTGGTGGCGCGGTTGGCTGACGAGAGCGGCCACGTAGTGTTC
GCTGGCTCCCGCCGCTGAGACACCCATGACGTCTACATCCGCTACGAGGTGGACGTCTCGGCCGGCAACGGCGCA
GGGAGCGTACAGAGGTTGGAGATCTGGAGGGCCGACCGAGTGTGTGCTGAGCAACCTGCGGGCCGGACGCGCTA
CACCTTCGCCGTCGCGCGCTATGGCTGAGCCGAGCTTCGGCGGCTTCTGGAGCGCCTGGTCGGAGCCTGTGTGCG
TGCTGACGCCTAGCGACCTGGACCC
```

SEQ ID NO. 10

5 >ephb4\_unión a epo\_región de codificación

```
CCTTCGGCTCCGCGGAGCGTGGTTTCCCGCTGAACGGCTCCTCCCTGCACCTGGAATGGAGTGCCCCCTGGAGTC
TGGTGGCCGAGAGGACCTCACCTACGCCCTCCGCTGCCGGGAGTGCAGCCCGGAGGCTCCTGTGCGCCCTGC
GGGGGAGACCTGACTTTTGACCCCGGCCCGGGACCTGGTGGAGCCCTGGGTGGTGGTTCGAGGGCTACGTCTGA
CTTCACCTATACCTTTGAGGTCATGCAATGAACGGGGTATCCTCCTTAGCCACGGGGCCCGTCCCATTTGAGCCTG
TCAATGTACCACTGACCGAGAGGTACCTCCTGCAGTGTCTGACATCCGGGTGACGGGTCTCACCAGCAGCTTG
AGCCTGGCTGGGCTGTCCC CGGGCACCCAGTGGGGCTGTGCTGGACTACGAGGTCAAATACCATGAGAAGGGCGC
CGAGGGTCCCAGCAGCGTCCGCTTCTGAAGACGTGAGAAACCGGGCAGAGCTGCGGGGGCTGAAGCGGGGAGCCA
GCTACCTGGTGCAGGTACGGCGCGCTCTGAGGCCGGCTACGGGCCCTTCGGCCAGGAACATCACAGCCAGACCCAA
CTGGATGAGAGCGAGGGCTGGCGGGAGCAGCTGGCCCTG
```

SEQ ID NO. 11

>ephrinA1\_unión a epo\_región de codificación

```
CTGGCCGCTGCTGATCGCCACACCGCTTCTGGAACAGTTCAAATCCAAAGTTCCGGAATGAGGACTACACCATAACA
TGTGCAGCTGAATGACTACGTGGACATCATCTGTCCGCACTGAAGATCACTCTGTGGCAGACGCTGCCATGGAGC
AGTACATACTGTACCTGGTGGAGCATGAGGAGTACCAGCTGTGCCAGCCCAAGGACCAAGTCCCGTGGCAG
TGCACCCGGCCCAAGTGCCTAAGCATGGCCCGGAGAAGCTGTCTGAGAAGTTCAGCGCTTCACACCTTTACCCTGGG
CAAGGAGTTCAAAGAAGGACACAGCTACTACTACATCTCCAAACCCATCCACCAGCATGAAGACCCTGCTTGGAGT
TGAAGGTGACTGTGCTGAGTGGCAAAATCACTCAC
```

10 SEQ ID NO. 12

>ephrinb2\_unión a epo\_región de codificación

```
TCCAAATCGATAGTTTTAGAGCCTATCTATTGGAATTCCTCGAACTCCAAATTTCTACCTGGACAAGGACTGGTACT
ATACCCACAGATAGGAGACAAATGGATATTTTGGCCCAAGTGGACTCTAAAACGTGGCCAGTATGAATATTT
ATAAAGTTTATATGGTTGATAAAGACCAAGCAGACAGATGCATATTAAGAAGGAAAATACCCCTCCTCAACTGT
GCCAAACAGACCAAGATATCAAATTCACCATCAAGTTTCAAGAAATTCAGCCCTAACCTCTGGGGTCTAGAATTTCA
GAAGAACAAGATTATTACATTTATATCTACATCAAATGGGCTTTTGGAGGGCTGGATAACCAGGAGGGAGGGTGT
GCCAGACAAGAGCCATGAAGATCCTCATGAAAGTTGGACAA
```

15 La determinación de la presencia de la Efrina A1 y/o la determinación de la presencia del producto de gen EPH-B4 (mARN) se puede hacer al utilizar una técnica de hibridación o una técnica de amplificación. Se prefiere que la técnica se selecciona del grupo que consiste de, PCR en tiempo real, análisis de transferencia northern, transcripción y amplificación inversa, zimografía, reacción de cadena ligasa, NASBA, Ensayo de Protección RNasa (RPA), electrofóresis capilar con fluorescencia inducida por láser (CE-LIF) y combinaciones de los mismos.

20 Específicamente, el individuo es un paciente con cáncer quien se va a tratar con eritropoyetina o se está tratando con eritropoyetina. Preferiblemente, el efecto fisiológico negativo es la supervivencia menor del paciente debido a evolución mejorada del tumor. Preferiblemente, la presencia de un mayor nivel de los genes del componente NEPOR (mARN) y/o la presencia de los productos de expresión del gen de componente NEPOR (proteínas) y/o EPH-B4 y/o Efrina A1 en tejidos de tumor es indicador de pronóstico de supervivencia más pobre luego de tratamiento con eritropoyetina.

25 Preferiblemente, la determinación de la presencia del complejo de dímero NEPOR se hace al detectar las proteínas respectivas NEPOR con un inmunoensayo. También se pueden detectar los péptidos de los mismos. El

inmunoensayo se selecciona del grupo de inmunoprecipitación, una disposición de proteína o unión a un instrumento de microbalance de masa (por ejemplo, QSense o Attana), inmunoensayo de enzima (EIA), radioinmunoensayo (RIA) o inmunoensayo fluorescente, un ensayo quimioluminiscente, un ensayo de aglutinación, ensayo nefelométrico, ensayo turbidimétrico, una transferencia Western, un inmunoensayo competitivo, un inmunoensayo no competitivo, un inmunoensayo homogéneo, un inmunoensayo heterogéneo, un bioensayo y un ensayo indicador tal como ensayo luciferasa. Preferiblemente, el inmunoensayo es un ELISA. Preferiblemente, el anticuerpo anti-NEPOR y/o el anticuerpo EPH-B4 y/o Efrina A1 es un anticuerpo monoclonal o policlonal, por ejemplo seleccionado de - o similar a - los anticuerpos enumerados en la Tabla 6.

Preferiblemente, la detección de las proteínas del componente NEPOR se debe realizar preferiblemente utilizando anticuerpos que detectan las sub-regiones de la SEQ ID NOs 6 y 7, que representan el dominio de unión EPO. Esto implica EPH-B4, anticuerpos específicos para SEQ ID NO. 14; para Efrina A1, anticuerpos específicos para la SEQ ID NO. 15.

SEQ ID NO. 13

>epor\_unión a epo\_región

**SKAALLAARGPEELLCTFERLEDLVCFWEEAA SAGVGPNGYSFSYQLEDEPWKLCRLHQAPTARGAVRFWCSLPTAD  
TSSFVPLELRVTAASGAPRYHRVVIHINEVVLLDAPVGLVARLADESGHVLRWLP PPEPMTSHIRYEVDVSAGNGA  
GSVQRVEILEGRTECVLSNLRGRTRYTF AVRARMAE P SFGGFW SAWSEPVSL LTPSDLD P**

SEQ ID NO. 14

>ephb4\_unión a epo\_región

**PSAPRSVVSRLNGSSLHLEWSAPLES GGREDLTYALRCRECRPGGSCAPCGGDLTFDPGPRDLVEPWVVVRGLRPDF  
TYTFEVTALNGVSSLATGPVPFEPVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSSLAWAVPRAPSGAVLDYEVKYHEKGAE  
GPSVVRFLKTSENRAELRGLKRGASYLVQVRARSEAGYGPFGQEHHSQTQLDESEGWREQLAL**

SEQ ID NO. 15

>efrinaA1\_unión a epo\_región

**LAAADRHTVFWNSSNPKFRNEDYTIHVQLNDYVDIICPHYEDH SVADAAMEQYI LYLVEHEEYQLCQPQSKDQVRWQ  
CNRPSAKHGPEKLSEKFORFTPTLKGKEFGHSHYIISKPIHQHEDRCLRLKVTVSGKITH**

SEQ ID NO. 16

>efrinab2\_unión a epo\_región

**SKSIVLEPIYWNSSNSKFLPGQGLVLYPQIGDKLDIICPKVDSKTVGQY EYK VY MVDKDQADRCTIKKENTPLLNC  
AKPDQDIKFTIKFQEFSPNLWGLEFQKNKDYI I I STSNGSLEGLDNQEGGVCQTRAMKILMKVGQ**

Preferiblemente, el individuo es un paciente con cáncer quien se va a tratar con eritropoyetina o se está tratando con eritropoyetina. La muestra de tejido se puede seleccionar del grupo de tejidos biológicos y fluidos tales como sangre, linfa, orina, fluido cerebral. La muestra de tejido también puede ser una muestra de biopsia de tumor. Se prefiere que la muestra de tejido es de tejido de cáncer o de células circulantes derivadas del mismo.

Se prefiere que el cáncer del paciente con cáncer se selecciona del grupo de, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de intestino delgado, leucemia, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer endometrial, cáncer de estómago, linfoma no Hodgkin, cáncer de riñón, Carcinoma de célula renal (RCC), melanoma maligno, cáncer de vesícula, cáncer de vejiga, cáncer vulvar, cáncer de pene, cáncer testicular, cáncer del timo, Sarcoma de Kaposi, cáncer ocular, cáncer de glándula suprarrenal, cáncer cerebral, cáncer cervical, cáncer de apéndice, cáncer adenoide, cáncer de las vías biliares, cáncer uretral, cáncer espinal, familia de tumores de Ewing, cáncer de célula reproductora extragonal, cáncer de las vías biliares extra hepático, cáncer del tubo falopiano, cánceres de tejido blando, cáncer óseo, linfoma de Hodgkin, cáncer anal, mesotelioma maligno, cáncer vaginal, cáncer de piel, cáncer del sistema nervioso central (craniofaringioma), blastoma pleuropulmonar, cáncer sinu paranasal y de cavidad nasal, cáncer de célula transicional de pelvis renal y uretra, cáncer de glándula pituitaria, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer cerebral, cáncer de vejiga, y cáncer de glándula salivar. Particularmente se prefiere que el cáncer que se selecciona del grupo de carcinoma epidermoide

de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer cerebral y cáncer de vejiga.

NEPOR e intervención de enfermedad y diseño/detección de terapia.

5 Sin estar limitado por la teoría, se propone NEPOR que media los efectos cito-protectores de EPO y sus variantes. Sin embargo, EPO y variantes que se han mostrado por poseer actividad cito-protectora (pero no hematopoyética) puede afectar la función de NEPOR. Por lo tanto, la presente descripción proporciona el conocimiento de la composición de NEPOR que se puede utilizar para optimizar la estructura y eficacia de dichas moléculas terapéuticas (es decir, mejor manejo de relación de estructura-actividad o SAR del farmacóforo EPO). Más aún, la presente descripción proporciona el conocimiento de la composición de NEPOR que se puede utilizar para identificar los compuestos reguladores NEPOR novedosos. Por ejemplo, en enfermedades asociadas con condiciones hipóxicas (por ejemplo, apoplejía, ataque cardíaco), los compuestos de unión a NEPOR de eficiencia mejorada se pueden desarrollar para imitar los efectos de EPO en NEPOR. De forma similar, los antagonistas específicos NEPOR (tales como aquellas moléculas que se unen al sitio activo de NEPOR que aún no transducen la señal son antagonistas de la función EPO. Dichos agentes de antagonistas EPO, cuando se administran concomitantemente con EPO, pueden permitir que los efectos de EPO mejoren la hematopoyesis (es decir, tratar la anemia) que previene aún el efecto colateral de promover el crecimiento de célula neoplásica, supervivencia y angiogénesis en cánceres positivos NEPOR tales como HNSCC. Más aún, contrasta la actividad relativa de los compuestos al complejo de receptor NEPOR protector de tejido en comparación con el homodímero del receptor EPOR que proporciona la generación de terapias específicas/dirigidas de NEPOR.

20 La definición de NEPOR describe métodos para identificar las moléculas terapéuticas que modulan la actividad de señalización protectora del tejido de NEPOR. Esto comprende: (a) poner en contacto un compuesto de prueba con el complejo del receptor NEPOR y/o EPH-B4 y/o Efrina A1 y un complejo de homodímero EPOR; (b) medir y comparar el nivel de actividad protectora de tejido iniciada por la activación NEPOR con la activación de la señalización del homodímero EPOR; (c) identificar un compuesto de prueba que aumenta o reduce el nivel de la actividad del complejo NEPOR protector de tejido cuando se compara con el nivel de activación del complejo EPOR; y (d) evaluar los productos terapéuticos identificados para la actividad protectora de tejido mediada por NEPOR, pero que carece de la activación EPOR y (e) evaluar los productos terapéuticos identificados para actividad inhibidora de NEPOR. El método es útil para identificar los productos terapéuticos que modulan la interacción entre un complejo NEPOR protector de tejido y/o EPH-B4 y/o Efrina A1 y el ligando EPO. El método es adicionalmente útil para identificar terapias para tratar enfermedades del sistema nervioso central o el sistema nervioso periférico que tienen principalmente síntomas psiquiátricos o neurológicos, enfermedades oftálmicas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cardiopulmonares, enfermedades respiratorias, enfermedades de riñón, urinarias y reproductivas, enfermedades óseas, enfermedades de piel, enfermedades gastrointestinales y anomalías endocrinas y metabólicas y cáncer.

35 Más específicamente, la identificación de NEPOR proporciona un método que identifica (I1) un compuesto que modula la actividad protectora de tejido de NEPOR, que comprende:

40 (a) poner en contacto un compuesto de prueba con un complejo del receptor NEPOR protector de tejido (N) y/o EPH-B4 y/o Efrina A1 o célula que expresa el complejo del receptor de citoquina protector de tejido; medir el nivel de la actividad de (N) en la célula; identificar un compuesto de prueba que aumenta o reduce el nivel de actividad de (N) cuando se compara con el nivel de actividad de (N) medido en la ausencia del compuesto de prueba; y evaluar el compuesto de prueba identificado para actividad protectora de tejido;

45 (b) poner en contacto un compuesto de prueba con una célula que se construye recombinantemente por ingeniería para expresar (N), donde la célula o la célula recombinante se transforma con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que se liga funcionalmente a un promotor y codifica los polipéptidos EPH-B4 y/o Efrina A1; medir el nivel de actividad de (N) en la célula; y

50 (c) poner en contacto un compuesto de prueba con un complejo del receptor NEPOR protector de célula que expresa el tejido, en donde la célula se transforma con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un gen indicador ligado funcionalmente al elemento regulador asociado con la actividad de (N); identificar un compuesto de prueba que aumenta o reduce el nivel de expresión del gen indicador con relación al nivel de expresión del gen indicador medido en la ausencia del compuesto de prueba; y evaluar el compuesto de prueba identificado para una actividad protectora de tejido.

La presente descripción proporciona adicionalmente un método para identificar (I2) un compuesto que se une a (N), que comprende:

55 (a) poner en contacto (N) con un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido y/o ligando EPH-B4 y/o Efrina A1 unido a una primera etiqueta, y una cantidad equivalente de un compuesto de prueba unido a una

segunda etiqueta bajo condiciones que conducen una unión, retirar el material no unido de (N), y detectar el nivel de la primera y segunda etiquetas, donde si la segunda etiqueta que está presente en el compuesto se une a (N) y si el nivel de la primera etiqueta se reduce con relación al nivel de la primera etiqueta cuando el ligando etiquetado se pone en contacto con (N) bajo condiciones que conducen una unión en la ausencia de un compuesto de prueba después de la eliminación del material no unido, entonces se identifica un compuesto que se une a (N); o

(b) poner en contacto un compuesto de prueba con un fragmento del complejo NEPOR del receptor protector de tejido de unión a ligando que comprende por lo menos un receptor EPH-B4 o receptor Efrina A1, dominio extracelular fusionado a un fragmento Fc unido a un soporte sólido, retirar los compuestos de prueba no unidos del soporte sólido, e identificar el compuesto unido al fragmento de complejo receptor NEPOR protector de tejido, de tal manera que un compuesto unido al soporte sólido se identifica como un compuesto que se une a un complejo del receptor NEPOR protector de tejido; e identificar (I3) un compuesto que modula la unión de un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido a (N), o el compuesto que modula la interacción entre (N) y el ligando del complejo de receptor de citoquina protector de tejido, involucra (i) poner en contacto un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido con (N) en la presencia de uno o más compuestos de prueba bajo condiciones que conducen una unión, y medir la cantidad del ligando del complejo de receptor de citoquina protector de tejido unido a (N).

La presente descripción proporciona adicionalmente complejos del receptor NEPOR protector de tejido novedoso en particular EPHB4 y/o Efrina A1 que contiene los complejos que se pueden utilizar para proporcionar un ensayo de detección in vitro para terapias específicas NEPOR; al medir la unión de compuestos de prueba en el complejo del receptor NEPOR protector de tejido en comparación con los complejos de homodímero EPOR. El compuesto de prueba se etiqueta y la unión del compuesto de prueba etiquetado a los complejos receptores detallados en la Figura 9 se mide al detectar la etiqueta unida al compuesto de prueba. Alternativamente, se puede emplear un método de detección libre de etiqueta tal como resonancia de plasmón de superficie. Dicho método puede proporcionar terapias neuroprotectoras novedosas (es decir agonistas NEPOR) que carecen de actividad hematopoyética. Dicho método también puede proporcionar onco-terapias novedosas (es decir antagonistas NEPOR es decir por lo menos un agonista y/o EPH-B4 y/o Efrina A1) que no puede inhibir la hematopoyesis. La naturaleza de tales disposiciones de detección que implican construcciones del receptor recombinante se demuestra en la Figura 9 (en el caso ejemplificado como construcciones Fc).

#### Uso

(I1) es útil para identificar un compuesto que modula la actividad protectora de tejido de NEPOR. (I2) es útil para identificar un compuesto que se une a NEPOR. (I3) es útil para identificar un compuesto que modula la unión de un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido a (N), o el compuesto que modula la interacción entre (N) y el ligando del complejo de receptor de citoquina protector de tejido (reivindicado). Los compuestos identificados utilizando (I1)-(I3) son útiles para tratar diversas afecciones de los sistemas nervioso periférico y central (por ejemplo, hipoxia, y/o isquemia, epilepsia, trastorno de convulsiones crónicas, envenenamiento de neurotoxinas, choque séptico, choque anafiláctico), trastornos neurológicos (demencia senil, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, demencia, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Huntington), enfermedades inflamatorias (por ejemplo, bronquitis crónica, artritis reumatoide, glomerulonefritis, encefalitis, meningitis, polimiositis), enfermedades oftálmicas (por ejemplo, angiitis, isquemia retinal), enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, infarto del miocardio, miocarditis), enfermedades cardiopulmonares (por ejemplo, asma, trombosis pulmonar), enfermedades respiratorias, enfermedades reproductivas, de riñón y urinarias (por ejemplo, miastenia gravis, diabetes, enfermedades autoinmunes), enfermedades óseas (por ejemplo, osteopenia, enfermedad de Paget), enfermedades gastrointestinales y anomalías endocrinas y metabólicas.

Los compuestos identificados utilizando (I1)-(I3) también son útiles para tratar cáncer NEPOR positivos en particular y/o cánceres EPH-B4 y/o Efrina A1 positivos que incluyen, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de intestino delgado, leucemia, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer endometrial, cáncer de estómago, linfoma no Hodgkin, cáncer de riñón, carcinoma de célula renal (RCC), melanoma maligno, cáncer de vesícula, cáncer de vejiga, cáncer vulvar, Cáncer de pene, cáncer testicular, cáncer del timo, sarcoma de Kaposi, cáncer ocular, cáncer de glándula suprarrenal, cáncer cerebral, cáncer cervical, cáncer de apéndice, cáncer adenoides, cáncer de las vías biliares, cáncer uretral, cáncer espinal, familia de tumores de Ewing, cáncer de célula reproductora extragonadal, cáncer de las vías biliares extra hepático, cáncer del tubo falopiano, cánceres de tejido blando, cáncer óseo, linfoma de Hodgkin, cáncer anal, mesotelioma maligno, cáncer vaginal, cáncer de piel, cáncer del sistema nervioso central (craniofaringioma), blastoma pleuropulmonar, cáncer sinu paranasal y de cavidad nasal, cáncer de célula transicional de pelvis renal y uretra, cáncer de glándula pituitaria, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer cerebral, cáncer de vejiga, y cáncer de glándula salivar. Se prefiere particularmente que el cáncer se seleccione del grupo de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer cerebral y cáncer de vejiga.

NEPOR en terapia de oncología.

La hipótesis de la presente descripción es que la EPO resulta en resultados de supervivencia más pobres (por lo menos en algunos cánceres) debido a sus efectos en la actividad NEPOR es decir en particular actividad EPH-B4 y/o Efrina A1. Por lo tanto, se describe el tratamiento de estos pacientes NEPOR positivos con una terapia NEPOR por ser una ruta prudente para intervención de la enfermedad. Los métodos específicos para antagonizar las señales de supervivencia mediadas por NEPOR incluyen, por ejemplo:

a) anticuerpos antagonísticos específicos NEPOR. Dichos anticuerpos bloquean y antagonizan las regiones extracelulares de la molécula específicamente asociada con la mediación de actividad cito-protectora de NEPOR.

b) Moléculas pequeñas específicas de NEPOR. Dichas moléculas pequeñas bloquean y antagonizan las regiones extracelulares de la molécula específicamente asociada con la mediación de actividad citoprotectora NEPOR.

c) péptidos de alta afinidad que dirigen específicamente NEPOR para bloquear y antagonizar la mediación de la actividad citoprotectora de EPO.

d) Dominio de tirosina quinasa intracelular de EPH-B4 que dirige las moléculas pequeñas (por ejemplo Dasatinib), que incluye:

1: CID: 1095868, AKI-STT-00166305; ZINC00818264; BAS 09636496 IUPAC: N-[5-[(3-clorofenil)metil]-1,3-tiazol-2-il]-2-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)sulfanilacetamida. PM: 404.93678 FM: C18H17CIN4OS2. (PM es peso molecular y FM es fórmula molecular)

2: CID: 1465558, IUPAC: 2-[(3-clorobenzoil)amino]-4-metil-N-piridin-3-il-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 372.82872 FM: C17H13CIN4O2S.

3: CID: 1468201, IUPAC: N-[S-[(2-clorofenil)carbamoil]-4-metil-1,3-tiazol-2-il]piridina-4-carboxamida, PM: 372.82872 FM: C17H13CIN4O2S.

4: CID: 3062316, Dasatinib; Sprycel; BMS Dasatinib, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl) piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]junino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 488.00554 FM: C22H26- CIN7O2S.

5: CID: 3072360, 142287-40-9; Pirimido(4,5-d)pirimidin-4(1H)-ona, 7-metil-1-fenil-2-((3-(4-(2-tiazolil)-1-piperazinil)propil)tio)- IUPAC: 2-metil-8-fenil-7-[3-[4-(1,3-tiazol-2-il)piperazin-1-il]propilsulfanil]pirimido[6,5-d]pirimidin-5-ona, PM: 479.6209 | FM: C23H25N7OS2.

6: CID: 5041467, STK154706; ZINC04687922, IUPAC: [2-[(2-metilfenil)amino]-1,3-tiazol-4-il]-(4-pirimidin-2-il)piperazin-1-il)metanona, PM: 380.4667 | FM: C19H20N6OS.

7: CID: 9822929, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[(6-imidazol-1-ilpiridazin-3-il)amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 411.869 | FM: C18H14CIN7OS.

8: CID: 9927718, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-(ciclopropanocarbonilamino)-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 335.809 FM: C15H14CIN3O2S.

9: CID: 10006113, IUPAC: clorhidrato de N-[4-cloro-2-[(5-cloropiridin-2-il)carbamoil]fenil]-5-metil-6,7-dihidro-4H-[1,3]tiazolo[5,4-c]piridina-2-carboxamida, PM: 498.81322 | FM: C20H18C13N5O2S.

10: CID: 10006114, IUPAC: N-[4-cloro-2-[(5-cloropiridin-2-il)carbamoil]fenil]-5-metil-6,7-dihidro-4H-[1,3]tiazolo[5,4-c]piridina-2-carboxamida, PM: 462.35228 | FM: C20H17C12N5O2S.

11: CID: 10052635, IUPAC: 2-[[2-metil-5-[[6-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]piridin-2-il]amino]fenil]amino]-N-(2-metilfenil)-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 527.68362 | FM: C29H33N7OS.

12: CID: 10195898, IUPAC: N-[(4-clorofenil)metil]-2-[[[(2S)-2-hidroxi-2-pirimidin-2-iletil]-metilamino] metil]-4-metil-7-oxotieno[2,3-e]piridina-6-carboxamida, PM: 497.99706 | FM: C24H24CIN5O3S.

13: CID: 10206276, IUPAC: N-[4-[(5-cloropiridin-2-il)carbamoil]-2-fenil-1,3-tiazol-5-il]-1-propan-2-ilpiperidina-4-carboxamida, PM: 484.01354 FM: C24H26GIN5O2S.

14: CID: 10252208, IUPAC: 2-[4-(5-amino-1,3-tiazol-2-il)fenil]-3-(5-cloropiridin-2-il)quinazolin-4-ona, PM: 431.89746 | FM: C22H14CIN5OS.

- 15: CID: 10253695, IUPAC: 2-[4-[3-(5-cloropiridin-2-il)-4-oxoquinazolin-2-il]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 459.90756 FM: C23H14CIN5O2S.
- 16: CID: 10301604, IUPAC: N-[4-[(5-cloropiridin-2-il)carbamoil]-2-(3,4-difluorofenil)-1,3-tiazol-5-il]-1-propan-2-ilpiperidina-4-carboxamida, PM: 519.994466 | FM: C24H24CIF2N5O2S.
- 5 17: CID: 10344807, IUPAC: N-[2-[4-[3-(5-cloropiridin-2-il)-4-oxoquinazolin-2-il]fenil]-1,3-tiazol-4-il] acetamida, PM: 473.933414 | FM: C24H16CIN5O2S.
- 18: CID: 10368624, IUPAC: N-[(4-clorofenil)metil]-2-[[2-(2-hidroxi-2-pirimidin-2-iletel)-metilammo]metil]-7-metil-4-oxotieno[3,2-e]pindme-5-carboxamida, PM: 497.99706 | FM: C24H24CIN5O3S.
- 10 19: CID: 10370949, IUPAC: (3Z)-4-[[2S]-2-(3-clorofenil)-2-hidroxietyl]amino]-3-[6-metil-2-[4-(1,3-tiazol-2-ilmetil)piperazin-1-il]-7,9-dihidropurin-8-ilidene]piridin-2-ona, PM: 578.08832 | FM: C27H28CIN9-O2S.
- 20: CID: 10412586, IUPAC: N-[2-[4-[3-(5-cloropiridin-2-il)-4-oxoquinazolin-2-il]fenil]-1,3-tiazol-5-il]acetamida, PM: 473.93414 FM: C24H16CIN5O2S.
- 21: CID: 10413555, IUPAC: N-[(4-clorofenil)metil]-2-[[2-(2R)-2-hidroxi-2-pirimidin-2-iletel]-metilamino]metil]-7-metil-4-oxotieno[3,2-e]piridina-5-carboxamida, PM: 497.99706 FM: C24H24CIN5O3S.
- 15 22: CID: 10456156, IUPAC: 4-[(3-clorotiofen-2-il)metilamino]-2-[(4-morfolin-4-ilfenil)amino]pirimidina-5-carboxamida, PM: 444.93774 FM: C20H21CIN6O2S.
- 23: CID: 10458706, IUPAC: N-[5-[2-[(4-clorofenil)amino]pirimidin-4-il]-4-metil-1,3-tiazol-2-il]-3-(2-morfolin-4-iletilamino)propanamida, PM: 502.03212 | FM: C23H28CIN7O2S.
- 20 24: CID: 11153014, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[(2,6-dimetilpirimidin-4-il)amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 373.85984 FM: C17H16CIN5OS.
- 25: CID: 11167695, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[2-metil-6-(2-morfolin-4-iletilamino)pirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 488.00554 | FM: C22H26CIN7O2S.
- 26: CID: 11168231, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[(6-cloro-2-metilpirimidin-4-il)amino]-N-[(4-metoxifenil)metil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 514.42684 | FM: C24H21CI2N5O2S.
- 25 27: CID: 11200510, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(2-hidroxietylamino)piridin-2-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 403.88582 FM: C18H18CIN5O2S.
- 28: CID: 11247793, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(metil-(3-metilaminopropil)ammo)piridin-2-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 444.9808 | FM: C21H25CIN6OS.
- 30 29: CID: 11260009, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(hidroximetil)piperidin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 472.9909 | FM: C22H25CIN6O2S.
- 30: CID: 11269410, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[(6-cloro-2-metilpirimidin-4-il)amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 394.27832 FM: C16H13C12NSOS.
- 31: CID: 11282881, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(2-morfolin-4-iletilamino)pirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 473.97896 | FM: C21H24CIN7O2S.
- 35 32: CID: 11283174, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(3-morfolin-4-ilpropilamino)piridin-2-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 487.01748 | FM: C23H27CIN6O2S.
- 33: CID: 11328827, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(3-imidazol-1-ilpropilamino)piridin-2-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 467.97438 | FM: C22H22CIN7OS.
- 40 34: CID: 11407465, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(2-hidroxietylamino)-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 418.90046 | FM: C18H19CIN6O2S.
- 35: CID: 11466196, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[2-metil-6-(3-morfolin-4-ilpropilamino)pirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida. PM: 502.03212 | FM: C23H28CIN7O2S.

## ES 2 542 033 T3

- 36: CID: 11466607, IUPAC: clorhidrato de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 524.46648 FM: C22H27Cl2N7O2S.
- 37: CID: 11487256, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-morfolin-4-ilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 430.91116 FM: C19H19ClN6O2S.
- 5 38: CID: 11505502, IUPAC: 2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-4-il]pirimidin-4-il]amino]-N-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida. PM: 626.65257 | FM: C29H29F3N8O3S.
- 39: CID: 11512538, IUPAC: 2-[4-[6-[[5-[(2-cloro-6-metilfenil)carbamoil]-1,3-tiazol-2-il]amino]-2-metilpirimidin-4-il]piperazin-1-il]etil 2,2-dimetilpropanoato, PM: 572.12196 FM: C27H34ClN7O3S.
- 10 40: CID: 11539665, IUPAC: (3-cloro-2-fluorofenil)-[4-[[6-[(5-fluoro-1,3-tiazol-2-il)amino]piridin-2-il]metil] piperazin-1-il]metanona, PM: 449.904626 | FM: C20H18ClF2N5OS.
- 41: CID: 11540687, IUPAC: hidrato de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 506.02082 | FM: C22H28ClN7O3S.
- 42: CID: 11569328, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[3-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]-5-metilfenil] amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 486.02942 | FM: C24H28ClN5O2S.
- 15 43: CID: 11570976, IUPAC: 2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-N-[2-metil-5-[3-(trifluorometil)fenil] carbamoil]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 640.67915 FM: C30H31F3N8O3S.
- 44: CID: 11577776, IUPAC: 2-[[6-(2-hidroxietyl-amino)-2-metilpirimidin-4-il]amino]-N-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 571.57407 | FM: C26H24F3N7O3S.
- 20 45: CID: 11590089, IUPAC: (3-cloro-2-fluorofenil)-[4-[5-metil-6-(1,3-tiazol-2-ilamino)piridin-2-il]piperazin-1-il]metanona, PM: 431.914163 | FM: C20H19ClF2N5OS.
- 46: CID: 11606973, IUPAC: N-[5-[[3-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]-5-(trifluorometil)benzoil]amino]-2-metilfenil]-2-(piridin-2-ilamino)-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 625.664 | FM: C30H30F3N7O3S.
- 47: CID: 11650098, IUPAC: 2-[[6-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-4-il]amino]-N-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 596.62659 | FM: C28H27F3N8O2S.
- 25 48: CID: 11650132, IUPAC: N-[5-[(2-cloro-6-metilfenil)carbamoil]-1,3-tiazol-2-il]-N-[6-[4-(2-hidroxietyl) piperadin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]carbamoato pentilo, PM: 602.14794 FM: C28H36ClN7O4S.
- 49: CID: 11650511, IUPAC: N-[5-[[3-(4-etyl)piperazin-1-il]-5-(trifluorometil)benzoil] amino]-2-metilfenil]-2-[[6-(2-hidroxietyl-amino)-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 683.74695 | FM: C32H36F3N9O3S.
- 30 50: CID: 11664355, IUPAC: 2-[[6-(2-metil-6-morfolin-4-ilpirimidin-4-il)amino]-N-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 597.61135 | FM: C28H26F3N7O3S.
- 51: CID: 11664511, IUPAC: 2-[[4-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]piridin-2-il]amino]-N-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 625.66451 FM: C30H30F3N7O3S.
- 52: CID: 11669430, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[2-metil-6-piperazin-1-ilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 443.95298 | FM: C20H22ClN7OS.
- 35 53: CID: 11676373, IUPAC: (3-cloro-2-fluorofenil)-[4-[[6-(1,3-tiazol-2-ilamino)piridin-2-il]metil]piperazin-1-il]metanona, PM: 431.914163 FM: C20H19ClF2N5OS.
- 54: CID: 11684148, IUPAC: (3-cloro-2-fluorofenil)-[4-[[6-[(5-cloro-1,3-tiazol-2-il)amino]piridin-2-il]metil] piperazin-1-il]metanona, PM: 466.359223 | FM: C20H18Cl2FN5OS.
- 40 55: CID: 11700117, IUPAC: 2-[[6-(4-etyl)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-N-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 624.67975 | FM: C30H31F3N8O2S.
- 56: CID: 11707091, IUPAC: 2-[[2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-4-il]amino]-N-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 610.65317 [MF: C29H29F3N8O2S.

## ES 2 542 033 T3

- 57: CID: 11714286, IUPAC: 2-[[5-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]piridin-2-il]amino]-N-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 625.66451 | FM: C30H30F3N7O3S.
- 58: CID: 11714353, IUPAC: 2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-N-[2-metil-5- [[3-(trifluorometil)benzoil] amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 640.67915 | FM: C30H31F- 3N8O3S.
- 5 59: CID: 11752136, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[5-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin- 4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 488.00554 | FM: C22H26CIN7O2S.
- 60: CID: 11772766, IL1PAC: 4-[2-(3-clorofenil)etilamino]-2-piridin-4-il-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 358.8452 FM: C17H15CIN4OS.
- 10 61: CID: 11775143, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[2-metil-6-morfolin-4-ilpirimidin-4-il]amino]- 1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 444.93774 | FM: C20H21CIN6O2S.
- 62: CID: 11854012, IUPAC: ácido 2-[4-[6-[[5- [(2-cloro-6-metilfenil)carbamoil]-1,3-tiazol-2-il]amino]-2-metilpirimidin-4-il]piperazin-1-il]acético, PM: 501.98906 | FM: C22H24CIN7O3S.
- 63: CID: 11854269, IUPAC: hidrogen sulfato de 2-[4-[6-[[5-[(2-cloro-6-metilfenil)carbamoil]-1,3-tiazol-2-il]amino]-2-metilpirimidin- 4-il]pigerazin-1-il]etilo, PM: 568.06874 | FM: C22H26CIN7O5S2.
- 15 64: CID: 11854270, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[2-(2-hidroxietyl)etilamino]-2-metilpirimidin- 4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 461.96826 | FM: C20H24CIN7O2S
- 65: CID: 11854271, IUPAC: 2-[[6-(2-anfnoetilamino)-2-metilpirimidul-4-il]amino]-N-(2-cloro-6-metilfenil)- 1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 417.9157 | FM: C18H20CIN7OS.
- 20 66: CID: 11854272, IUPAC: ácido 2-[[2-[4-[6- [[5-[(2-cloro-6-metilfenil)carbamoil]-1,3-tiazol-2-il]amino]-2-metilpirimidin-4-il]piperazin-1-il]acetil] amino]etanosulfónico, PM: 609.12066 | FM: C24H29CIN8O5S2.
- 67: CID: 11854533, IUPAC: N-(2-cloro-4-hidroxi-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]-2- metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 504.00494 | FM: C22H26CIN7O3S.
- 68: CID: 11854534, IUPAC: N-[2-cloro-6-(hidroximetil)fenil]-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]-2- metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 504.00494 | FM: C22H26CIN7O3S.
- 25 69: CID: 11854535, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)-4-oxidopiperazin-4-ium-1- il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 504.00494 | FM: C22H26CIN7O3S.
- 70: CID: 11854536, IUPAC: ácido 2-[4-[6-[[5-[(2-cloro-6-metilfenil)carbamoil]-1,3-tiazol-2-il]amino]-2-metilpirimidin- 4-il]-1-oxidopiperazin-1-io-1-il]acético, PM: 517.98846 | FM: C22H24CIN7O4S.
- 30 71: CID: 11949914, IUPAC: 4-[[2-(5-cloro-2-fluorofenil)-5-dimetilaminopirimidin-4-il]amino]-N-[2-(2-hidroxietyl)amino]etil]piridina-3-carboxamida, PM: 473.931003 | FM: C22H25C1FN7O2.
- 72: CID: 11951866, IUPAC: 4-[[2-(5-cloro-2-fluorofenil)-5-pirrolidin-1-ilpirimidin-4-il]amino]-N-(2-hidroxietyl) piridina-3-carboxamida, PM: 456.900483 | FM: C22H22CIFN6O2.
- 73: CID: 11952045, IUPAC: 4-[[2-(5-cloro-2-fluorofenil)-5-pirrolidin-1-ilpirimidin-4-il]amino]-N-[(2S)-2-hidroxiopropil] piridina-3-carboxamida, PM: 470.927063 | FM: C23H24CIFN6O2.
- 35 74: CID: 15979866, IUPAC: 5-[2-[[4-(4-acetilpiperazin-1-il)piridin-2-il]amino]-1,3-tiazol-5-il]-N-metilpiridina- 3-carboxamida, PM: 437.51802 | FM: C21H23N7O2S.
- 75: CID: 15980109, IUPAC: N-(2-aminoetil)-5-[2-[[4-(4-morfolin-4-ilpiridin-2-il)amino]-1,3-tiazol-5-il]piridina- 3-carboxamida, PM: 425.50732 | FM: C20H23N7O2S
- 76: CID: 15980233, IUPAC: N-(2-hidroxietyl)-5-[2-[[4-(4-morfolin-4-ilpiridin-2-il)amino]-1,3-tiazol-5-il]piridina- 3-carboxamida, PM: 426.49208 | FM: C20H22N6O3S.
- 40 77: CID: 15980347, IUPAC: N-(2-metilaminoetil)-5-[2-[[4-(4-morfolin-4-ilpiridin-2-il)amino]-1,3-tiazol-5-il] piridina-3-carboxamida, PM: 439.5339 | FM: C21H25N7O2S.

- 78: CID: 15980351, IUPAC: 5-[2-[[4-[4-(2-hidroxiacetil)piperazin-1-il]piridin-2-il]amino]-1,3-tiazol-5-il]-N-(2,2,2-trifluoroetil)piridina-3-carboxamida, PM: 521.51539 | FM: C22H22F3N7O3S.
- 79: CID: 15982537, IUPAC: (3-cloro-2-fluorofenil)-[4-[6-[(5-fluoro-1,3-tiazol-2-il)amino]-5-metilpiridin-2-il]piperazin-2-il]metanona, PM: 449.904626 | FM: C20H18ClF2N5OS.
- 5 80: CID: 16034848, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido 2,3-dihidroxiбутanedioico, PM: 638.09238 | FM: C26HCIN7O8S.
- 81: CID: 16037977, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]-5-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 488.00554 | FM: C22H26CIN7O2S.
- 10 82: CID: 16061431, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]-2-metilpiridin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; 4-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-N-[4-metil-3-[(4-piridin-3-ilpirimidin-2-il)amino]fenil]benzamida, PM: 981.60828 | FM: C51H57CIN14O3S.
- 83: CID: 16223227, IUPAC: ácido but-2-enedioico; N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]-2-metilpiridin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 604.0777 | FM: C26H30CIN7O6S.
- 15 84: CID: 16223228, IUPAC: bromhidrato de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 568.91748 | FM: C22H27BrCIN7O2S.
- 85: CID: 16223229, IUPAC: ácido but-2-enedioico; N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 604.0777 | FM: C26H30CIN7O6S.
- 86: CID: 16223316, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido metanosulfónico, PM: 584.1112 | FM: C23H30CIN7O5S2.
- 20 87: CID: 16223317, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido fosfórico, PM: 586.000721 | FM: C22H29CIN7O6PS.
- 88: CID: 16223318, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido 2-hidroxibenzoico, PM: 626.12628 | FM: C29H32CIN7O5S.
- 25 89: CID: 16223319, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido sulfúrico, PM: 586.08402 | FM: C22H28CIN7O6S2.
- 90: CID: 16223320, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido 4-metilbencenosulfónico, PM: 660.20716 | FM: C29H34CIN7O5S2.
- 91: CID: 16584134, AKE-PB223730486, IUPAC: N-(4-clorofenil)-2-[(4,5-dimetil-1,3-tiazol-2-il)amino]-4-metilpirimidina-5-carboxamida, PM: 373.85984 | FM: C17H16CIN5OS.
- 30 92: CID: 16584137, AKE-PB223730492, IUPAC: N-(3-clorofenil)-2-[(4,5-dimetil-1,3-tiazol-2-il)amino]-4-metilpirimidina-5-carboxamida, PM: 373.85984 | FM: C17H16CIN5OS.
- 93: CID: 16584139, AKE-PB223730496, IUPAC: 2-[(4,5-dimetil-1,3-tiazol-2-il)amino]-4-metil-N-(2-metilfenil)pirimidina-5-carboxamida, PM: 353.44136 | FM: C18H19N5OS.
- 35 94: CID: 16655683, IUPAC: 2-[(6-cloro-2-metilpirimidin-4-il)amino]-N-(2,6-diclorofenil)-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 414.6968 | FM: C15H10Cl3N5OS.
- 95: CID: 16655839, IUPAC: N-(2,6-diclorofenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 508.42402 | FM: C21H23Cl2N7O2S.
- 96: CID: 16660745, IUPAC: N-(4-fluorofenil)-4-(2-hidroxiethylamino)-6-metilsulfanil-2-piridin-4-ilpirimidina-5-carboxamida, PM: 399.441923 | FM: C19H18FN5O2S.
- 40 97: CID: 16660747, IUPAC: N-(4-etilfenil)-4-(2-hidroxiethylamino)-6-metilsulfanil-2-piridin-4-ilpirimidina-5-carboxamida, PM: 409.50462 | FM: C21H23N5O2S.

98: CID: 16660907, IUPAC: 4-(2-hidroxiethylamino)-N-(4-metilfenil)-6-metilsulfanil-2-piridin-4-ilpirimidina-5-carboxamida, PM: 395.47804 | FM: C20H21NSO2S.

99: CID: 16661063, IUPAC: N-(4-clorofenil)-4-(2-hidroxiethylamino)-6-metilsulfanil-2-piridin-4-ilpirimidina-5-carboxamida, PM: 415.89652 | FM: C19H18ClN5O2S.

5 100: CID: 16661212, IUPAC: N-(2,4-dimetilfenil)-4-(2-hidroxiethylamino)-6-metilsulfanil-2-piridin-4-ilpirimidina-5-carboxamida, PM: 409.50462 | FM: C21H23N5O2S.

101: CID: 16661214, IUPAC: 4-(1-hidroxibutan-2-ilamino)-N-(4-metilfenil)-6-metilsulfanil-2-piridin-4-ilpirimidina-5-carboxamida, PM: 423.5312 | FM: C22H25N5O2S.

Aquí, el CID es el compuesto identificador como se define en Pubchem.

10 e) moléculas pequeñas objetivo y componentes en la dirección 3' antagonista de la ruta de señalización NEPOR, particularmente inhibidores tirosina quinasa EPH-B4.

f) Terapias de combinación que implican uno o más métodos a-e.

g) La presente descripción también describe una terapia de combinación. La co-administración de EPO

15 con un inhibidor intracelular de señalización NEPOR (por ejemplo Dasatinib) se propone para mantener la señalización EPO por medio de EPOR (y así promueve la hematopoyesis) mientras se inhibe la supervivencia de las células neoplásicas positivas NEPOR.

Productos terapéuticos con base en NEPOR para tratar lesiones neuronales

20 Sin estar limitado por la teoría, la presente descripción proporciona que la EPO es neuroprotector debido a sus efectos en la actividad NEPOR, es decir en particular y/o actividad EPH-B4 y/o Efrina A1. Por lo tanto, la presente descripción proporciona un método para tratar apoplejía isquémica, trauma, epilepsia, enfermedades neurodegenerativas, y disfunción cognitiva con una terapia dirigida NEPOR agonística. Los métodos específicos para mejorar positivamente señales de supervivencia mediadas por NEPOR incluye:

a) Anticuerpos específicos NEPOR. Dichos anticuerpos se une e inicia/mejora la mediación de actividad citoprotectora de NEPOR.

25 b) Moléculas pequeñas específicas NEPOR. Dichas moléculas pequeñas se unen e inician/mejoran la mediación de la actividad citoprotectora NEPOR.

30 c) los mutantes EPO dirigidos a NEPOR y sus versiones glucosiladas. Debido a los requerimientos conformacionales estrictos de EPOR para mediar la señalización en respuesta a EPO, los siguientes mutantes EPOR (SEQ ID NO. 17 - SEQ ID NO. 212.) favorecen la unión a NEPOR en oposición a EPOR y así actúa principalmente como tejido protector.

SEQ ID NO. 17

**APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITRVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSL  
TLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR**

SEQ ID NO. 18

**APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQALLVNSSQPWEPLQLHVD  
KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR**

35 SEQ ID NO. 19

**APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLT  
TLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR**

SEQ ID NO. 20

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHC SLNENITV PDKVNFYAWKRMEPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTL  
LRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR

SEQ ID NO. 21

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHC SLNENITV PPGVGQLFPAVGAPAAAACG

SEQ ID NO. 22

5 APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHC SLNENNH C

SEQ ID NO. 23

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT

SEQ ID NO. 24

APPR LICDSRV LEAYLLEAKEAENIT

10 SEQ ID NO. 25

APPR LICDSRV LEEYLLEAKEAENIT

SEQ ID NO. 26

APPR LICDSRV LERYL

SEQ ID NO. 27

15 APPR LI

SEQ ID NO. 28

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT MGCAEGPRLSENITV PDKVNFYAWKRMEKELMSPPDTTPPAPLRTLTVDT  
FCKLFRVYANFLRGKCLKLYTGEVCCRDR

Eliminaciones de los sitios de interacción EPOR hWT 4

SEQ ID NO. 29

20 APPR LICEAENIT TGCAEHC SLNENITV PDKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPL  
QLHVDKAVSGLRSLTTLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR

SEQ ID NO. 30

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHC SLNENITV PDFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALL  
VNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR

SEQ ID NO. 31

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHC SLNENITV PDKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDLTTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACR  
TGDR

25 SEQ ID NO. 32

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHC SLNENITV PDKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFGKCLKLYTGEACR  
TGDR

Las eliminaciones de terminal C empiezan en el último puente cisteína C161

SEQ ID NO. 33

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLF RVYSNFLRGKLK  
LYTGEA

SEQ ID NO. 34

5 APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLF RVYSNFLRGKLK  
LYTGE

SEQ ID NO. 35

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLF RVYSNFLRGKLK  
LYTG

SEQ ID NO. 36

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLF RVYSNFLRGKLK  
LYT

10 SEQ ID NO. 37

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLF RVYSNFLRGKLK  
LY

SEQ ID NO. 38

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLF RVYSNFLRGKLK  
L

SEQ ID NO. 39

15 APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLF RVYSNFLRGKLK

SEQ ID NO. 40

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLF RVYSNFLRGKLK

SEQ ID NO. 41

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLF RVYSNFLRGK

20 SEQ ID NO. 42

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLF RVYSNFLRGK

SEQ ID NO. 43

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLR

SEO ID NO. 44

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFL

SEQ ID NO. 45

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNF

5

SEQ ID NO. 46

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSN

SEQ ID NO. 47

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYS

10

SEQ ID NO. 48

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVY

SEQ ID NO. 49

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRV

SEQ ID NO. 50

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFR

15

SEQ ID NO. 51

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFR

SEQ ID NO. 52

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKL

20

SEQ ID NO. 53

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKL

SEQ ID NO. 54

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKL

SEQ ID NO. 55

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTF

SEQ ID NO. 56

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADT

5 SEQ ID NO. 57

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITAD

SEQ ID NO. 58

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITA

SEQ ID NO. 59

10 APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTIT

SEQ ID NO. 60

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTI

SEQ ID NO. 61

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRT

15 SEQ ID NO. 62

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPPDAASAAPLR

SEQ ID NO. 63

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPPDAASAAPL

SEQ ID NO. 64

20 APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPPDAASAAP

SEQ ID NO. 65

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPPDAASAA

SEQ ID NO. 66

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAISPPDAASA

SEQ ID NO. 67

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAISPPDAAS

SEQ ID NO. 68

5 APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAISPPDAA

SEQ ID NO. 69

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAISPPDA

SEQ ID NO. 70

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAISPPD

10 SEQ ID NO. 71

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAISPP

SEQ ID NO. 72

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAISPP

SEQ ID NO. 73

15 APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAIS

SEQ ID NO. 74

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAIS

SEQ ID NO. 75

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAIS

20 SEQ ID NO. 76

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAIS

SEQ ID NO. 77

APPLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAIS

SEO ID NO. 78

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLRSLT TLLRALGAQ

SEQ ID NO. 79

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLRSLT TLLRALGA

5 SEQ ID NO. 80

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLRSLT TLLRALG

SEQ ID NO. 81

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLRSLT TLLRAL

SEQ ID NO. 82

10 APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLRSLT TLLRA

SEQ ID NO. 83

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLRSLT TLLR

SEQ ID NO. 84

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLRSLT TLL

15 SEQ ID NO. 85

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLRSLT TL

SEQ ID NO. 86

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLRSLT T

SEQ ID NO. 87

20 APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLRSLT

SEQ ID NO. 88

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLRSL

SEQ ID NO. 89

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLRS

SEQ ID NO. 90

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA V SGLR

SEQ ID NO. 91

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA V SGL

5 SEQ ID NO. 92

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA V S G

SEQ ID NO. 93

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA V S

SEQ ID NO. 94

10 APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA V

SEQ ID NO. 95

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA

SEQ ID NO. 96

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV D K

15 SEQ ID NO. 97

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV D

SEQ ID NO. 98

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV

SEQ ID NO. 99

20 APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLH

SEQ ID NO. 100

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQL

SEQ ID NO. 101

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQ

SEQ ID NO. 102

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPL

SEQ ID NO. 103

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEP

5 SEQ ID NO. 104

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWE

SEQ ID NO. 105

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPW

SEQ ID NO. 106

10 APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQP

SEQ ID NO. 107

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQ

SEQ ID NO. 108

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSS

15 SEQ ID NO. 109

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNS

SEQ ID NO. 110

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVN

SEQ ID NO. 111

20 APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLV

SEQ ID NO. 112

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALL

SEQ ID NO. 113

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QAL

SEQ ID NO. 114

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QA

SEQ ID NO. 115

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
Q

5 SEQ ID NO.116

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG

SEQ ID NO.117

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR

SEQ ID NO.118

10 APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVL

SEQ ID NO.119

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAV

SEQ ID NO.120

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEA

15 SEQ ID NO.121

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSE

SEQ ID NO.122

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLS

SEQ ID NO.123

20 APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALL

SEQ ID NO.124

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLAL

SEQ ID NO.125

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLA

25 SEQ ID NO.126

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGL

SEQ ID NO.127

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQG

SEQ ID NO.128

ES 2 542 033 T3

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAVEVWQ

SEQ ID NO.129

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAVEVW

SEQ ID NO.130

5 APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAVEV

SEQ ID NO.131

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAVE

SEQ ID NO.132

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAV

10 SEQ ID NO.133

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQA

SEQ ID NO.134

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GDQ

SEQ ID NO.135

15 APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQ

SEQ ID NO.136

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV G

SEQ ID NO.137

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV

20 SEQ ID NO.138

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRME

SEQ ID NO.139

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRM

SEQ ID NO.140

25 APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKR

SEQ ID NO.141

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWK

SEQ ID NO.142

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAW

30 SEQ ID NO.143

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYA

SEQ ID NO.144

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNFY

SEQ ID NO.145

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNF

5 SEQ ID NO.146

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN

SEQ ID NO.147

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKV

SEQ ID NO.148

10 APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTK

SEQ ID NO.149

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDT

SEQ ID NO.150

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPD

15 SEQ ID NO.151

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVP

SEQ ID NO.152

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITV

SEQ ID NO.153

20 APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENIT

SEQ ID NO.154

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENI

SEQ ID NO.155

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNEN

25 SEQ ID NO.156

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNE

SEQ ID NO.157

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLN

SEQ ID NO.158

30 APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENITTGCAEHCSL

SEQ ID NO.159

APPRICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCS

SEQ ID NO.160

APPRICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC

SEQ ID NO.161

5 APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEH

SEQ ID NO.162

APPRICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAE

SEQ ID NO.163

APPRICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCA

10 SEQ ID NO.164

APPRICDSRVLERYLLEAKEAENITTGC

SEQ ID NO.165

APPRICDSRVLERYLLEAKEAENITTG

SEQ ID NO.166

15 APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITT

SEQ ID NO.167

APPRICDSRVLERYLLEAKEAENIT

SEQ ID NO.168

APPRICDSRVLERYLLEAKEAENI

20 SEQ ID NO.169

APPRICDSRVLERYLLEAKEAEN

SEQ ID NO.170

APPRICDSRVLERYLLEAKEAE

SEQ ID NO.171

25 APPRLICDSRVLERYLLEAKEA

SEQ ID NO.172

APPRICDSRVLERYLLEAKE

SEQ ID NO.173

APPRICDSRVLERYLLEAK

30 SEQ ID NO.174

APPRICDSRVLERYLLEA

SEQ ID NO.175

APPRLICDSRVLERYLLE

SEQ ID NO.176

APPRLICDSRVLERYLL

5 SEQ ID NO.177

APPRLICDSRVLERYL

SEQ ID NO.178

APPRLICDSRVLERY

SEQ ID NO.179

10 APPRLICDSRVLER

SEQ ID NO.180

APPRLICDSRVLE

SEQ ID NO.181

APPRLICDSRVL

15 SEQ ID NO.182

APPRLICDSRV

SEQ ID NO.183

APPRLICDSR

SEQ ID NO.184

20 APPRLICDS

SEQ ID NO.185

APPRLICD

SEQ ID NO.186

APPRLIC

25 Las mutaciones de aminoácido únicas (Ala / Conversiones) y todas las combinaciones/permutaciones de las mismas y todas las versiones glicosiladas de las mismas. Todas las posibles combinaciones/permutaciones de mutaciones contenidas en mutaciones únicas de la SEQ ID NOs. 187-208 y versiones glicosiladas de las mismas.

SEQ ID NO. 187

APPRLICASRVLERYLLEAKEAENITTTGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLF RVYSNFLRGKLK  
LYTGEACRTGDR

30 SEQ ID NO. 188

APPR LICSRVLER YLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGK LK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO. 189

APPR LICDSRVLEAYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGK LK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO. 190

5 APPR LICDSRVLEEY LLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGK LK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO. 191

APPR LICDSRVLER YLLEAAEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGK LK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO. 192

APPR LICDSRVLER YLLEAAEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGK LK  
LYTGEACRTGDR

10 SEQ ID NO. 193

APPR LICDSRVLER YLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDAKVN FYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGK LK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO. 194

APPR LICDSRVLER YLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTAVN FYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGK LK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO. 195

15 APPR LICDSRVLER YLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTEVN FYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGK LK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO. 196

APPR LICDSRVLER YLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKAN FYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGK LK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO. 197

APPR LICDSRVLER YLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVAFYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGK LK  
LYTGEACRTGDR

20 SEQ ID NO. 198

APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDAAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLF RVYSNFLRGKLK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO. 199

APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDEAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLF RVYSNFLRGKLK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO. 200

APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVAGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLF RVYSNFLRGKLK  
LYTGEACRTGDR

5

SEQ ID NO. 201

APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLASLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLF RVYSNFLRGKLK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO. 202

APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLSLESLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLF RVYSNFLRGKLK  
LYTGEACRTGDR

10

SEQ ID NO. 203

APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRALTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLF RVYSNFLRGKLK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO. 204

APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLF AVYSNFLRGKLK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO. 205

APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLF EVYSNFLRGKLK  
LYTGEACRTGDR

15

SEQ ID NO. 206

APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLF RVYSAFLRGKLK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO. 207

APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHC SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLF RVYSNFLAGKLK  
LYTGEACRTGDR

20

SEQ ID NO. 208

APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
 QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLGKLL  
 LYTGEACRTGDR

Regiones de interacción sobrelapantes de los péptidos EPO

SEQ ID NO. 209

APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENIT

5 SEQ ID NO. 210

NENITVPDTKVNIFYAWKRMEV

SEQ ID NO. 211

NSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLL

SEQ ID NO. 212

10 FRKLFRVYSNFLRGKLL

d) Quimeras EPO dirigidas a NEPOR. Dichos mutantes se unen e inician/mejoran la mediación de actividad citoprotectora NEPOR. Por ejemplo, en un escenario en donde el NEPOR constituye una molécula Efrina A1 (ya sea como un homodímero o en asociación heterodimérica con EPOR), luego las proteínas quiméricas implican fusiones de parte del dominio de unión de ligando a Efrina de EPH-B4 y parte de la molécula EPO se puede desarrollar como socios de unión optimizados. Esto implica fusionar una parte del terminal N de EPO (derivado de la SEQ ID NO. 213) a una parte del terminal C del dominio de unión de ligando Efrina de EPH-B4 (SEQ IDNO. 214), que da una secuencia similar a la SEQ ID NO. 215, o fusionar una parte de terminal N del dominio de unión del ligando Efrina de EPH-B4 (derivado de la SEQ ID NO. 214) a una parte de terminal C de EPO (SEQ ID NO. 213), que da una secuencia similar a la SEQ ID NO. 216.

15 e) péptidos de alta afinidad que unen específicamente NEPOR para iniciar/mejorar la mediación de la actividad citoprotectora de EPO.

f) moléculas pequeñas que dirigen y mejoran la actividad de los componentes en la dirección 3' de NEPOR.

g) Terapias de combinación que implican uno o más métodos a-f.

SEQ ID NO. 213

25 >P01588|EPO\_Eritropoytetina HUMANA - Homo sapiens (Humano).

MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC  
 SLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQL  
 HVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKL  
 KLYTGEACRTGDR

SEQ ID NO. 214

>EPH-B4\_efrina\_ligando\_unión\_dominio

EETLLNFKLETADLKWVTFPQVDGQWEELSGLDEEQHSVRTYEVCVQRAPGQAHWLRGTG  
 WVPRRGAVHVYATLRFMTLECLSLPRAGRSCKETFTVFYYESDADTATALTPAWMENFYI  
 KVDTVAAEHLTRKRPGAEATGKVNKTLRLGPLSKAGFYLAQDQGACMALLSLHLFYKK  
 C

30 SEQ ID NO. 215

>NtermEPO\_CtermEPHB4LBD

APPRLICDSRVLEARYLLEAKEAENITTCGAZHC SLNENITVPTDKVNFYAWKRMEVGGQA  
 VEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAIS  
 PPDAASALTPAWMENPYIKVDTVAAEHLTRKRPGAATGKVNKTLRLGPLSKAGFYLA  
 QDQGCAMALLSLHLFYKCC

SEQ ID NO. 216

>NtermEPHB4LBD\_CtermEPO

EETLLNLTLETADLKWVTFPQVDGQWEELSGLDDEEQHSVRTYEVCDVQRAPGQAHWLRGTG  
 WVPRGAVHVYATLRFPTMLECLSLPRAGRSCKETFTVFFYESDADTATALSEAVLRGQAL  
 LVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTPRK  
 LFRVYSNFLRGKLLKLYTGEACRTGDR

## 5 Compuestos en combinación con EPO

Dichos compuestos, en combinación con EPO, inhiben la actividad tirosina quinasa de EPH-B4 mientras permite la señalización/hematopoyesis mediada por EPOR. Los siguientes compuestos 101, ya sea solos o en combinación, inhiben la actividad tirosina quinasa de EPH-B4 que contiene los dímeros NEPOR. Por lo tanto, la presente descripción proporciona un agente terapéutico de combinación de un inhibidor tirosina quinasa en combinación con EPO para proporcionar las propiedades hematopoyéticas de EPO junto con la prevención de la señalización NEPOR con el fin de bloquear el efecto colateral potencialmente fatal de EPO para promover la supervivencia del tumor y la angiogénesis.

1: CID: 1095868, AKI-STT-00166305; ZINC00818264; BAS 09636496 IUPAC: N-[5-[(3-clorofenil)metil]-1,3-tiazol-2-il]-2-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)sulfanilacetamida. PM: 404.93678 | FM: C18H17CIN4OS2. (PM es peso molecular y FM es fórmula molecular).

2: CID: 1465558, IUPAC: 2-[(3-clorobenzoil)amino]-4-metil-Npiridin- 3-il-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 372.82872 | FM: C17H13CIN4O2S.

3: CID: 1468201, IUPAC: N-[5-[(2-clorofenil)carbamoil]-4-metil-1,3-tiazol-2-il]piridina-4-carboxamida, PM: 372.82872 | FM: C17H13CIN4O2S.

4: CID: 3062316, Dasatinib; Sprycel; BMS Dasatinib, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil] piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 488.00554 | FM: C22H26CIN7O2S.

5: CID: 3072360, 142287-40-9; Pirimido(4,5-d)pirimidin-4(1H)-ona, 7-metil-1-fenil-2-((3-(4-(2-tiazolil)-1-piperazinil)propil)tio)- IUPAC: 2-metil-8-fenil-7-[3-[4-(1,3-tiazol-2-il)piperazin-1-il]propilsulfanil]pirimido[6,5- d]pirimidin-5-ona, PM: 479.6209 | FM: C23H25N7OS2.

6: CID: 5041467, STK154706; ZINC04687922, IUPAC: [2-[(2-metilfenil)amino]-1,3-tiazol-4-il]-(4-pirimidin-2-il)piperazin-1-il)metanona, PM: 380.4667 | FM: C19H20N6OS.

7: CID: 9822929, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)- 2-[(6-imidazol-1-ilpiridazin-3-il)amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 411.869 | FM: C18H14CIN7OS.

8: CID: 9927718, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-(ciclopropanocarbonilamino)-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 335.809 | FM: C15H14CIN3O2S.

9: CID: 10006113, IUPAC: N-[4-cloro-2-[(5-cloropiridin-2-il)carbamoil]fenil]-5-metil-6,7-dihidro-4H-[1,3]tiazolo[ 5,4-c]piridina-2-carboxamida clorhidrato, PM: 498.81322 | FM: C20H18Cl3N5O2S.

10: CID: 10006114, IUPAC: N-[4-cloro-2-[(5-cloropiridin-2-il)carbamoil]fenil]-5-metil-6,7-dihidro-4H-[1,3] tiazolo[5,4-c]piridina-2-carboxamida, PM: 462.35228 | FM: C20H17Cl2N5O2S.

11: CID: 10052635, IUPAC: 2-[[2-metil-5-[[6-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]piridin-2-il]amino]fenil]amino]- N-(2-metilfenil)-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 527.68362 | FM: C29H33N7OS.

12: CID: 10195898, IUPAC: N-[(4-clorofenil)metil]-2-[[[(2S)-2-hidroxi-2-pirimidin-2-iletil]-metilamino]metil]- 4-metil-7-oxotienof[2,3-e]piridina-6-carboxamida, PM: 497.99706 | FM: C24H24CIN5O3S.

## ES 2 542 033 T3

- 13: CID: 10206276, IUPAC: N-[4-[(5-cloropiridin-2-il)carbamoil]-2-fenil-1,3-tiazol-5-il]-1-propan-2-ilpiperidina- 4-carboxamida, PM: 484.01354 | FM: C24H26CIN5O2S.
- 14: CID: 10252208, IUPAC: 2-[4-(5-amino-1,3-tiazol-2-il)fenil]-3-(5-cloropiridin-2-il)quinazolin-4-ona, PM: 431.89746 | FM: C22H14CIN5OS.
- 5 15: CID: 10253695, IUPAC: 2-[4-[3-(5-cloropiridin-2-il)-4-oxoquinazolin-2-il]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 459.90756 | FM: C23H14CIN5O2S.
- 16: CID: 10301604, IUPAC: N-[4-[(5-cloropiridin-2-il)carbamoil]-2-(3,4-difluorofenil)-1,3-tiazol-5-il]-1-propan- 2-ilpiperidina-4-carboxamida, PM: 519.994466 | FM: C24H24CIF2N5O2S.
- 10 17: CID: 10344807, IUPAC: N-[2-[4-[3-(5-cloropiridin-2-il)-4-oxoquinazolin-2-il]fenil]-1,3-tiazol-4-il]acetamida, PM: 473.93414 | FM: C24H16CIN5O2S.
- 18: CID: 10368624, IUPAC: N-[(4-clorofenil)metil]-2-[[2-(hidroxi-2-pirimidin-2-iletel)-metilamino]metil]- 7-metil-4-oxotienof[3,2-e]piridina-5-carboxamida, PM: 497.99706 FM: C24H24CIN5O3S.
- 19: CID: 10370949, IUPAC: (3Z)-4-[[2-(3-clorofenil)-2-hidroxietyl]amino]-3-[6-metil-2-[4-(1,3-tiazol-2-ilmetil)piperazin-1-il]-7,9-dihidropurin-8-ilidene]piridin-2-ona, PM: 578.08832 FM: C27H28CIN9O2S.
- 15 20: CID: 10412586, IUPAC: N-[2-[4-[3-(5-cloropiridin-2-il)-4-oxoquinazalin-2-il]fenil]-1,3-tiazol-5-il]acetamida, PM: 473.93414 FM: C24H16CIN5O2S.
- 21: CID: 10413555, IUPAC: N-[(4-clorofenil)metil]-2-[[2-(2-hidroxi-2-pirimidin-2-iletel)-metilamino]metil]- 7-metil-4-oxotienof[3,2-e]piridina-5-carboxamida, PM: 497.99706 | FM: C24H24CIN5O3S.
- 20 22: CID: 10456156, IUPAC: 4-[(3-clorotiofen-2-il)metilamino]-2-[(4-morfolin-4-ilfenil)amino]pirimidina- 5-carboxamida, PM: 444.93774 | FM: C20H21CIN6O2S.
- 23: CID: 10458706, IUPAC: N-[5-[2-[(4-clorofenil)amino]pirimidin-4-il]-4-metil-1,3-tiazol-2-il]-3-(2-morfolin- 4-iletilamino)propanamida, PM: 502.03212 | FM: C23H28CIN7O2S.
- 24: CID: 11153014, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[(2,6-dimetilpirimidin-4-il)amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 373.85984 | FM: C17H16CINSOS.
- 25 25: CID: 11167695, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[2-metil-6-(2-morfolin-4-iletilamino)pirimidin-4- il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 488.00554 | FM: C22H26CIN7O2S.
- 26: CID: 11168231, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[(6-cloro-2-metilpirimidin-4-il)amino]-N-[(4-metoxifenil) metil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 514.42684 | FM: C24H21 C12N5O2S.
- 30 27: CID: 11200510, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(2-hidroxietylamino)piridin-2-il]amino]-1,3-tiazol- 5-carboxamida, PM: 403.88582 | FM: C18H18CIN5O2S.
- 28: CID: 11247793, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(metil-(3-metilaminopropil)amino)piridin-2-il] amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 444.9808 | FM: C21H25CIN6OS.
- 29: CID: 11260009, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(hidroximetil)piperidin-1-il]-2-metilpirimidin- 4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 472.9909 | FM: C22H25C11N6O2S.
- 35 30: CID: 11269410, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[(6-cloro-2-metilpirimidin-4-il)amino]-1,3-tiazol- 5-carboxamida, PM: 394.27832 | FM: C16H13C12N5OS.
- 31: CID: 11282881, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(2-morfolin-4-iletilamino)pirimidin-4-il]amino]- 1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 473.97896 | FM: C21H24CIN7O2S.
- 40 32: CID: 11283174, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(3-morfolin-4-ilpropilamino)piridin-2-il]amino]- 1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 487.01748 | FM: C23H27CIN6O2S.
- 33: CID: 11328827, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(3-imidazol-1-ilpropilamino)piridin-2-il]amino]-1,3- tiazol-5-carboxamida, PM: 467.97438 | FM: C22H22CIN7OS.

## ES 2 542 033 T3

- 34: CID: 11407465, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(2-hidroxi-etilamino)-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 418.90046 | FM: C18H19ClN6O2S.
- 35: CID: 11466196, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[2-metil-6-(3-morfolin-4-ilpropilamino)pirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida. PM: 502.03212 | FM: C23H28ClN7O2S.
- 5 36: CID: 11466607, IUPAC: clorhidrato de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 524.46648 | FM: C22H27Cl2N7O2S.
- 37: CID: 11487256, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(3-morfolin-4-ilpirimidin-4-il)amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 430.91116 | FM: C19H19ClN6O2S.
- 10 38: CID: 11505502, IUPAC: 2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]pirimidin-4-il]amino]-N-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida. PM: 626.65257 | FM: C29H29F3N8O3S.
- 39: CID: 11512538, IUPAC: 2-[4-[6-[[5-(2-cloro-6-metilfenil)carbamoil]-1,3-tiazol-2-il]amino]-2-metilpirimidin-4-il]piperazin-1-il]etil 2,2-dimetilpropanoato, PM: 572.12196 | FM: C27H34ClN7O3S.
- 40: CID: 11539665, IUPAC: (3-cloro-2-fluorofenil)-[4-[[6-[[5-(1,3-tiazol-2-il)amino]piridin-2-il]metil]piperazin-1-il]metanona, PM: 449.904626 | FM: C20H18ClF2N5OS.
- 15 41: CID: 11540687, IUPAC: hidrato de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 506.02082 | FM: C22H28ClN7O3S.
- 42: CID: 11569328, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[3-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]-5-metilfenil]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 486.02942 | FM: C24H28ClN5O2S.
- 20 43: CID: 11570976, IUPAC: 2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-N-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)fenil]carbamoil]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 640.67915 | FM: C30H31F3N8O3S.
- 44: CID: 11577776, IUPAC: 2-[[6-(2-hidroxi-etilamino)-2-metilpirimidin-4-il]amino]-N-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 571.57407 | FM: C26H24F3N7O3S.
- 45: CID: 11590089, IUPAC: (3-cloro-2-fluorofenil)-[4-[5-metil-6-(1,3-tiazol-2-ilamino)piridin-2-il]piperazin-1-il]metanona, PM: 431.914163 | FM: C20H19ClF2N5OS.
- 25 46: CID: 11606973, IUPAC: N-[5-[[3-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]-5-(trifluorometil)benzoil]amino]-2-metilfenil]-2-(piridin-2-ilamino)-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 625.66451 | FM: C30H30F3N7O3S.
- 47: CID: 11650098, IUPAC: 2-[[6-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-4-il]amino]-N-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 596.62659 | FM: C28H27F3N8O2S.
- 30 48: CID: 11650132, IUPAC: N-[5-[[2-(2-cloro-6-metilfenil)carbamoil]-1,3-tiazol-2-il]-N-[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]carbamoil]de pentilo, PM: 602.14794 | FM: C28H36ClN7O4S.
- 49: CID: 11650511, IUPAC: N-[5-[[3-(4-etilpiperazin-1-il)-5-(trifluorometil)benzoil]amino]-2-metilfenil]-2-[[6-(2-hidroxi-etilamino)-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 683.74695 | FM: C32H36F3N9O3S.
- 50: CID: 11664355, IUPAC: 2-[[2-(2-metil-6-morfolin-4-ilpirimidin-4-il)amino]-N-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 597.61135 | FM: C28H26F3N7O3S.
- 35 51: CID: 11664511, IUPAC: 2-[[4-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]piridin-2-il]amino]-N-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 625.66451 | FM: C30H30F3N7O3S.
- 52: CID: 11669430, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[2-metil-6-piperazin-1-ilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 443.95298 | FM: C20H22ClN7OS.
- 53: CID: 11676373, IUPAC: (3-cloro-2-fluorofenil)-[4-[[6-(1,3-tiazol-2-ilamino)piridin-2-il]metil]piperazin-1-il]metanona, PM: 431.914163 | FM: C20H19ClF2N5OS.
- 40 54: CID: 11684148, IUPAC: (3-cloro-2-fluorofenil)-[4-[[6-[[5-(1,3-tiazol-2-il)amino]piridin-2-il]metil]piperazin-1-il]metanona, PM: 466.359223 | FM: C20H18Cl2FN5OS.

- 55: CID: 11700117, IUPAC: 2-[[6-(4-etilpiperazin-1-il)-2-metilpirimidin-4-il]amino]-N-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 624.67975 | FM: C30H31F3N8O2S.
- 56: CID: 11707091, IUPAC: 2-[[2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-4-il]amino]-N-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 610.65317 | FM: C29H29F3N8O2S.
- 5 57: CID: 11714286, IUPAC: 2-[[5-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]piridin-2-il]amino]-N-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 625.66451 | FM: C30H30F3N7O3S.
- 58: CID: 11714353, IUPAC: 2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-N-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 640.67915 | FM: C30H31F3N8O3S.
- 10 59: CID: 11752136, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[5-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 488.00554 | FM: C22H26ClN7O2S.
- 60: CID: 11772766, IUPAC: 4-[2-(3-clorofenil)etilamino]-2-piridin-4-il-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 358.8452 | FM: C17H15ClN4O5S.
- 61: CID: 11775143, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[(2-metil-6-morfolin-4-il)pirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 444.93774 | FM: C20H21ClN6O2S.
- 15 62: CID: 11854012, IUPAC: ácido 2-[4-[6-[[5-[(2-cloro-6-metilfenil)carbamoil]-1,3-tiazol-2-il]amino]-2-metilpirimidin-4-il]piperazin-1-il]acético, PM: 501.98906 | FM: C22H24ClN7O3S.
- 63: CID: 11854269, IUPAC: hidrogen sulfato de 2-[4-[6-[[5-[(2-cloro-6-metilfenil)carbamoil]-1,3-tiazol-2-il]amino]-2-metilpirimidin-4-il]piperazin-1-il]etilato, PM: 568.06874 | FM: C22H26ClN7O5S2.
- 64: CID: 11854270, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[2-(2-hidroxi-etilamino)etilamino]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 461.96826 | FM: C20H24ClN7O2S
- 20 65: CID: 11854271, IUPAC: 2-[[6-(2-aminoetilamino)-2-metilpirimidin-4-il]amino]-N-(2-cloro-6-metilfenil)-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 417.9757 | FM: C18H20ClN7O5S.
- 66: CID: 11854272, IUPAC: ácido 2-[[2-[4-[6-[[5-[(2-cloro-6-metilfenil)carbamoil]-1,3-tiazol-2-il]amino]-2-metilpirimidin-4-il]piperazin-1-il]acetil]amino] etanosulfónico, PM: 609.12066 | FM: C24H29ClN8O5S2.
- 25 67: CID: 11854533, IUPAC: N-(2-cloro-4-hidroxi-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 504.00494 | FM: C22H26ClN7O3S.
- 68: CID: 11854534, IUPAC: N-[2-cloro-6-(hidroximetil)fenil]-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 504.00494 | FM: C22H26ClN7O3S.
- 30 69: CID: 11854535, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-4-oxidopiperazin-4-ium-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 504.00494 | FM: C22H26ClN7O3S.
- 70: CID: 11854536, IUPAC: ácido 2-[4-[6-[[5-[(2-cloro-6-metilfenil)carbamoil]-1,3-tiazol-2-il]amino]-2-metilpirimidin-4-il]-1-oxidopiperazin-1-il]acético, PM: 517.98846 | FM: C22H24ClN7O4S.
- 71: CID: 11949914, IUPAC: 4-[[2-(5-cloro-2-fluorofenil)-5-dimetilaminopirimidin-4-il]amino]-N-[2-(2-hidroxi-etilamino)etil]piridina-3-carboxamida, PM: 473.931003 | FM: C22H25ClF2N7O2.
- 35 72: CID: 11951866, IUPAC: 4-[[2-(5-cloro-2-fluorofenil)-5-pirrolidin-1-il]pirimidin-4-il]amino]-N-(2-hidroxi-etil)piridina-3-carboxamida, PM: 456.900483 | FM: C22H22ClF2N6O2.
- 73: CID: 11952045, IUPAC: 4-[[2-(5-cloro-2-fluorofenil)-5-pirrolidin-1-il]pirimidin-4-il]amino]-N-[(2S)-2-hidroxi-propil]piridina-3-carboxamida, PM: 470.927063 | FM: C23H24ClF2N6O2.
- 74: CID: 15979866, IUPAC: 5-[2-[[4-(4-acetilpiperazin-1-il)piridin-2-il]amino]-1,3-tiazol-5-il]-N-metilpiridina-3-carboxamida, PM: 437.51802 | FM: C21H23N7O2S.
- 40 75: CID: 15980109, IUPAC: N-(2-aminoetil)-5-[2-[(4-morfolin-4-il)piridin-2-il]amino]-1,3-tiazol-5-il]piridina-3-carboxamida, PM: 425.50732 | FM: C20H23N7O2S

- 76: CID: 15980233, IUPAC: N-(2-hidroxietyl)-5-[2-[(4-morfolin-4-ilpiridin-2-il)amino]-1,3-tiazol-5-il]piridina-3-carboxamida, PM: 426.49208 | FM: C20H22N6O3S.
- 77: CID: 15980347, IUPAC: N-(2-metilaminoetyl)-5-[2-[(4-morfolin-4-ilpiridin-2-il)amino]-1,3-tiazol-5-il]piridina-3-carboxamida, PM: 439.5339 | FM: C21H25N7O2S.
- 5 78: CID: 15980351, IUPAC: 5-[2-[[4-[4-(2-hidroxiacetyl)piperazin-1-il]piridin-2-il]amino]-1,3-tiazol-5-il]-N-(2,2,2-trifluoroetyl)piridina-3-carboxamida, PM: 521.51539 | FM: C22H22F3N7O3S.
- 79: CID: 15982537, IUPAC: (3-cloro-2-fluorofenil)-[4-[6-[(5-fluoro-1,3-tiazol-2-il)amino]-5-metilpiridin-2-il] piperazin-1-il]metanona, PM: 449.904626 | FM: C20H18ClF2N5OS.
- 10 80: CID: 16034848, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido 2,3-dihidroxiбутanedioico, PM: 638.09238 | FM: C26H32ClN7O8S.
- 81: CID: 16037977, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]-5-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 488.00554 | FM: C22H26ClN7O2S.
- 15 82: CID: 16061431, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; 4-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-N-[4-metil-3-[(4-piridin-3-ilpirimidin-2-il)amino]fenil]benzamida, PM: 981.60828 | FM: C51H57ClN14O3S.
- 83: CID: 16223227, IUPAC: ácido but-2-enedioico; N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 604.0777 | FM: C26H30ClN7O6S.
- 84: CID: 16223228, IUPAC: bromhidrato de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 568.91748 | FM: C22H27BrClN7O2S.
- 20 85: CID: 16223229, IUPAC: ácido but-2-enedioico; N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 604.0777 | FM: C26H30ClN7O6S.
- 86: CID: 16223316, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido metanosulfónico, PM: 584.1112 | FM: C23H30ClN7O5S2.
- 25 87: CID: 16223317, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido fosfórico, PM: 586.000721 | FM: C22H29ClN7O6PS.
- 88: CID: 16223318, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido 2-hidroxibenzoico, PM: 626.12628 | FM: C29H32ClN7O5S.
- 89: CID: 16223319, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido sulfúrico, PM: 586.08402 | FM: C22H28ClN7O6S2.
- 30 90: CID: 16223320, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido 4-metilbencenosulfónico, PM: 660.20716 | FM: C29H34ClN7O5S2.
- 91: CID: 16584134, AKE-PB223730486, IUPAC: N-(4-clorofenil)-2-[(4,5-dimetil-1,3-tiazol-2-il)amino]-4-metilpirimidina-5-carboxamida, PM: 373.85984 | FM: C17H16ClN5OS.
- 35 92: CID: 16584137, AKE-PB223730492, IUPAC: N-(3-clorofenil)-2-[(4,5-dimetil-1,3-tiazol-2-il)amino]-4-metilpirimidina-5-carboxamida, PM: 373.85984 | FM: C17H16ClN5OS.
- 93: CID: 16584139, AKE-PB223730496, IUPAC: 2-[(4,5-dimetil-1,3-tiazol-2-il)amino]-4-metil-N-(2-metilfenil)pirimidina-5-carboxamida, PM: 353.44136 | FM: C18H19N5OS.
- 94: CID: 16655683, IUPAC: 2-[(6-cloro-2-metilpirimidin-4-il)amino]-N-(2,6-diclorofenil)-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 414.6968 | FM: C15H10Cl3N5OS.
- 40 95: CID: 16655839, IUPAC: N-(2,6-diclorofenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, PM: 508.42402 | FM: C21H23Cl2N7O2S.

96: CID: 16660745, IUPAC: N-(4-fluorofenil)-4-(2-hidroxiethylamino)-6-metilsulfanil-2-piridin-4-ilpirimidina-5-carboxamida, PM: 399.441923 | FM: C19H18FN5O2S.

97: CID: 16660747, IUPAC: N-(4-etilfenil)-4-(2-hidroxiethylamino)-6-metilsulfanil-2-piridin-4-ilpirimidina-5-carboxamida, PM: 409.50462 | FM: C21H23N5O2S.

5 98: CID: 16660907, IUPAC: 4-(2-hidroxiethylamino)-N-(4-metilfenil)-6-metilsulfanil-2-piridin-4-ilpirimidina-5-carboxamida, PM: 395.47804 | FM: C20H21N5O2S.

99: CID: 16661063, IUPAC: N-(4-clorofenil)-4-(2-hidroxiethylamino)-6-metilsulfanil-2-piridin-4-ilpirimidina-5-carboxamida, PM: 415.89652 | FM: C19H18ClN5O2S.

10 100: CID: 16661212, IUPAC: N-(2,4-dimetilfenil)-4-(2-hidroxiethylamino)-6-metilsulfanil-2-piridin-4-ilpirimidina-5-carboxamida, PM: 409.50462 | FM: C21H23N5O2S.

101: CID: 16661214, IUPAC: 4-(1-hidroxi-2-butanolamino)-N-(4-metilfenil)-6-metilsulfanil-2-piridin-4-ilpirimidina-5-carboxamida, PM: 423.5312 | FM: C22H25N5O2S.

NEPOR: Pronóstico Combinado y Valor Terapéutico en Tratamiento contra el cáncer.

15 Sin estar limitado por la teoría, la observación que los pacientes tratados con EPO tienen frecuentemente resultados de supervivencia más pobres (por lo menos en algunos cánceres) significa que el tratamiento de estos pacientes con una terapia objetivo NEPOR proporciona un método farmacogenético para el tratamiento contra el cáncer dirigido que proporciona tejido neoplásico se puede evaluar para la expresión de NEPOR. Dicha perspectiva terapéutica cambia el balance en favor de realizar biopsias bajo todas las circunstancias adecuadas – lo que significa para cánceres en donde se expresan normalmente EPOR, EPH-B4 y/o EfrinaA1.

20 La presente descripción proporciona adicionalmente un método para formar la imagen del tejido de tumor que es susceptible para mejorar la supervivencia en respuesta al tratamiento de EPO, que comprende administrar un anticuerpo anti-NEPOR o péptido de unión NEPOR ligado a un radio-ligando o otro agente formador de imágenes, y medir la distribución y ubicación del tejido del radio-ligando u otro agente formador de imágenes.

25 Si un tumor es NEPOR positivo, entonces EPO se contraindica y se administra una terapia dirigida a NEPOR. Si NEPOR no está presente, entonces es seguro para administrar EPO. Ambos resultados parecen beneficiar el resultado del paciente, independiente de si un paciente es NEPOR positivo o negativo. De nuevo, esto cambia el balance en favor de realizar biopsias de rutina.

En una realización la descripción se relaciona con una molécula de siARN específica a EPH-B4 y/o Efrina A1 para uso en el tratamiento de un paciente de cáncer que recibe o recibirá EPO.

30 siARN EPH-B4 y oligodesoxinucleótidos anticodificantes

Diversos oligodesoxinucleótidos modificados con fosforotioato anti-codificante específicos a EphB4 (ODNs) y siARN se puede sintetizar a partir de (por ejemplo por Qiagen. Se selecciona el ODN antisentido más activo y siARN que atenúa la expresión EphB4 en la estirpe celular 293T transfectada transitoriamente. El ODN antisentido que se puede utilizar es AS-10 que se extiende por los nucleótidos 1980 a 1999 con una secuencia 5'-ATG GAG GCC TCG CTC AGA AA-3' (SEQ ID NO. 217). Para eliminar las respuestas de citoquina, la citosina en el sitio CpG se puede metilar (AS-10M) sin ninguna pérdida en la eficiencia que atenúa EphB4 (datos no mostrados). Los ODN codificados que contienen secuencia de nucleótidos aleatoria y un sitio CpG, 5'-TAC CTG AAG GTC AGG CGA AC-3' (SEQ ID NO. 218), se puede utilizar como control. El siARN 465 que corresponde a las secuencias 5'-GGU GAA UGU CAA GAC GCU GUU-3' (SEQ ID NO. 219) y 3'-UUC CAC UUA CAG UUC UGC GAC-5' (SEQ ID NO. 220) se puede utilizar para interferencia de ADN. El siARN de control se puede generar al hacer mutar tres bases en esta secuencia para abrogar efectivamente el EphB4 atenuado. Este siARN mutado (siARN $\Delta$ ) tiene las secuencias 5'-AGU UAA UAU CAA GAC GCU GUU-3' (SEQ ID NO. 221) y 3'-UUU CAA UUA UAG UUC UGC GAC-5' (SEQ ID NO. 222). Adicionalmente, el siARN dirigido contra la proteína fluorescente verde con las secuencias 5'-CGC UGA CCC UGA AGU UCA TUU-3' (SEQ ID NO. 223) y 3'-UUG CGA CUG GGA CUU CAA GUA-5' (SEQ ID NO. 224) se puede utilizar como un control negativo.

Se puede obtener el siARN de numerosas compañías en particular Sigma Aldrich: El siARN del catálogo de sigma predice utilizar el algoritmo de diseño de siARN Rosetta

EFRINA A1

## ES 2 542 033 T3

siRNA_ID	entrezgene_ID	approx_start_nucleotide
SASI_Hs01_00211016	NM_004428	247
SASI_Hs01_00211017	NM_004428	223
SASI_Hs01_00211018	NM_004428	248
SASI_Hs01_00211019	NM_004428	1071
SASI_Hs01_00211020	NM_004428	256
SASI_Hs01_00211021	NM_004428	208
SASI_Hs01_00211022	NM_004428	829
SASI_Hs01_00211023	NM_004428	1015
SASI_Hs01_00211024	NM_004428	846
SASI_Hs01_00211025	NM_004428	225
SASI_Hs01_00071683	NM_182685	248
SASI_Hs01_00071684	NM_182685	214
SASI_Hs01_00071685	NM_182685	242
SASI_Hs01_00071686	NM_182685	1000
SASI_Hs01_00071687	NM_182685	263
SASI_Hs01_00071688	NM_182685	203
SASI_Hs01_00071689	NM_182685	769
SASI_Hs01_00071690	NM_182685	948
SASI_Hs01_00071691	NM_182685	778
SASI_Hs01_00071692	NM_182685	227

### EPHB4

siRNA_ID	entrezgene_ID	approx_start_nucleotide
SASI_Hs01_00039855	NM_004444	1756
SASI_Hs01_00039856	NM_004444	577
SASI_Hs01_00039857	NM_004444	1373
SASI_Hs01_00039858	NM_004444	2290
SASI_Hs01_00039859	NM_004444	2318
SASI_Hs01_00039860	NM_004444	2353
SASI_Hs01_00039861	NM_004444	2898
SASI_Hs01_00039862	NM_004444	2245
SASI_Hs01_00039863	NM_004444	1679
SASI_Hs01_00039864	NM_004444	1416

### Anticuerpos para NEPOR

- 5 La presente descripción incluye diversos anticuerpos que se unen a los componentes NEPOR. La siguiente Tabla 6 proporciona una lista de tales anticuerpos y su disponibilidad.

Tabla 6

Compañía	Ítem EPOR	Antígeno	Número de catálogo	Aplicaciones	Tipo
Abcam	Anticuerpo Policlonal del Receptor Anti-EPO de cabra, no conjugado	EPOR	ab10653	ELISA, WB	Policlonal
Afinidad ABR BioReagents	Anticuerpo Monoclonal del receptor EPOR Anti-humano de Ratón Conjugado Clon 3D10, no conjugado	EPOR	MA1-51823	WB, ELISA	Monoclonal

ES 2 542 033 T3

Compañía	Ítem EPOR	Antígeno	Número de catálogo	Aplicaciones	Tipo
Abnova Corporation	Anticuerpo Monoclonal EPOR Anti-humano de Ratón, Clon 3D10 no conjugado,	EPOR	H00002057- M01	WB, Captura ELISA	Monoclonal
Abcam	Anticuerpo policlonal del receptor EPOR Anti-humano de cabra, No conjugado	EPOR	ab27497	ELISA, WB	Policlonal
Abcam	Anticuerpo Monoclonal del Receptor EPO Anti-humano de Ratón, Clon MM- 0031-6G7 no conjugado	EPOR	ab56310	WB	Monoclonal
ABR-Affinity BioReagents	Anticuerpo Policlonal EPOR Anti-humano de Ratón, No conjugado	EPOR	PA1-51822	WB	Policlonal
IMGENEX	Anticuerpo Policlonal EPOR Anti-humano de Cabra, No conjugado	EPOR	IMG-3771	WB, ELISA	Policlonal
Lifespan Biosciences	Receptor de Eritropoyetina Anti-humano de Conejo Anticuerpo Policlonal (EPOR), No conjugado	EPOR	LS-C6720	ELISA	Policlonal
GeneTex	Anticuerpo Monoclonal EPOR Anti-humano de Ratón, No conjugado, Clon 3D10	EPOR	GTX91710	ELISA, WB	Monoclonal
Lifespan Biosciences	Anticuerpo Policlonal (EPOR) del receptor de eritropoyetina de Anti-humano de Conejo, no conjugado	EPOR	LS-C6719-100	ELISA	Policlonal
Novus Biologicals	Anticuerpo Policlonal EPOR Anti-humano de Ratón, No conjugado	EPOR	H00002057- A01		Policlonal

ES 2 542 033 T3

Compañía	Ítem EPOR	Antígeno	Número de catálogo	Aplicaciones	Tipo
Novus Biologicals	Anticuerpo Monoclonal EPOR Anti-humano de Ratón, No conjugado, Clon 3D10	EPOR	H00002057- M01	ELISA, WB	Monoclonal
Lifespan Biosciences	Receptor de Eritropoyetina Anti-humano de Oveja Anticuerpo Policlonal (EPOR), No conjugado	EPOR	LS-C6718	ELISA, WB	Policlonal
Lifespan Biosciences	Receptor de Eritropoyetina Anti-humano de Oveja Anticuerpo Policlonal (EPOR), No conjugado	EPOR	LS-C6716		Policlonal
Lifespan Biosciences	Anticuerpo Policlonal EPOR Anti-humano de Oveja, No conjugado	EPOR	LS-C6717-50	ELISA	Policlonal
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Anticuerpo Policlonal EpoR Anti-humano de Conejo (C- 20), No conjugado	EpoR (C- 20)	sc-695	WB, IP, IF, ICH.	Policlonal
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Anticuerpo Policlonal Anti-EpoR (M-20) de Conejo, No conjugado	EpoR (M- 20)	sc-697	WB, IP, IF, ICH.	Policlonal
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Anticuerpo Policlonal Anti-EpoR de Conejo, No conjugado	EpoR	sc-5624	WB, IP, IF, ICH.	Policlonal
EPH-B4					
Abgent	Anticuerpo Policlonal RB1659-1660 de terminal C Anti-EPHB4 de Conejo, No conjugado	EPH-B4 Terminal C	AP7625a	ELISA; IHC.	Policlonal
ABR Affinity BioReagents	Anticuerpo Policlonal EPH-B4 Anti-humano de Conejo, No conjugado	EPH-B4	PA1-24241	WB	Policlonal

ES 2 542 033 T3

EPH-B4						
ABR Affinity BioReagents	Anticuerpo Monoclonal EPH-B4 Anti-Humano de Ratón, No conjugado, Clon 1D1	EPH-B4	MA1-51815	ELISA		Monoclonal
AbD Serotec	Anticuerpo Monoclonal EPH-B4 Anti-Humano de Humano, No conjugado, Clon 1327	EPH-B4	HCA001	IHC, WB, ELISA		Monoclonal
AbD Serotec	Anticuerpo Monoclonal EPH-B4 Anti-Humano de Humano, No conjugado, Clon 3934	EPH-B4	HCA025	IHC, WB, ELISA		Monoclonal
Invitrogen	Anticuerpo Monoclonal del Receptor Anti-EPH-B4, No conjugado, Clon 3D7F8	EPH-B4	35-2900	WB, ELISA		Monoclonal
GeneTex	Anticuerpo Policlonal Anti-EPHB4 de Conejo, No conjugado	EPH-B4	GTX77656	WB		Policlonal
Invitrogen	Anticuerpo Monoclonal del Receptor Anti-EPH-B4 de Ratón, Clon 3D7G8	EPH-B4	182394	IHC(FFPE)		Monoclonal
Invitrogen	Anticuerpo de Paquete Muestreador del Receptor Anti-Eph,	EPH-B4	901100			
GeneTex	Anticuerpo Monoclonal EPH-B4 Anti-Humano de Ratón, No conjugado, Clon 1D1	EPH-B4	GTX91629	ELISA		Monoclonal
Invitrogen	Anticuerpo Monoclonal del Receptor EPH-B4 Anti-Humano de Ratón, Clon 3D7G8	EPH-B4	371800	WB ELISA IHC	IP,	Monoclonal

ES 2 542 033 T3

EPH-B4					
Novus Biologicals	Anticuerpo Monoclonal EPH-B4 Anti-Humano de Ratón, No conjugado, Clon 1D1	EPH-B4	H00002050-M01		Monoclonal
R&D Systems	Anticuerpo Policlonal EPH-B4 Anti-Humano de Cabra, No conjugado	EPH-B4	AF3038	FC, IHC, WB	Policlonal
Raybiotech, Inc.	Anticuerpo Monoclonal EPH-B4 Anti-Humano de Humano, (empacado con Anticuerpo Secundario Conjugado con HRP);, No conjugado	EPH-B4	DS-MB-01224		Monoclonal
R&D Systems	Anticuerpo Monoclonal EPH-B4 Anti-Humano de Rata, No conjugado, Clon 395810	EPH-B4	MAB3038	FC, IHC, WB	Monoclonal
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Anticuerpo Policlonal Anti-EPHB4 de Cabra, No conjugado	EPH-B4	sc-7284	WB, IF	Policlonal
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Anticuerpo Policlonal Anti-EPHB4 de Conejo, No conjugado	EPH-B4	sc-5536	WB, IF	Policlonal
Raybiotech, Inc.	Anticuerpo Monoclonal EPH-B4 Anti-Humano de Humano, (empacado con el Anticuerpo Secundario Conjugado con HRP);, No conjugado	EPH-B4	DS-MB-01225		Monoclonal
EFNA1					
Invitrogen	Anticuerpo Policlonal Anti-Efrina A1, No conjugado, Clon ZMD.39	EFNA1	34-3300		Policlonal

EFNA1

Novus Biologicals	Anticuerpo Monoclonal EFNA1 Anti-Humano de Ratón, No conjugado, Clon 3C6	EFNA1	H00001942-M01		Monoclonal
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Anticuerpo Policlonal Antiefrina- A1 (V-18) de Conejo, No conjugado	EFNA1 (V-18)	sc-911	WB, IF	Policlonal
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Anticuerpo Policlonal Anti-Efrina A1 de Conejo, No conjugado	EFNA1	sc-20719	WB, IP, IF	Policlonal
Abcam	Anticuerpo Policlonal del Receptor de Efrina A1 Anti-Humano de Conejo, No conjugado	EFNA1	ab37857	ELISA, IHC, WB	Policlonal
GeneTex	Anticuerpo Monoclonal EFNA1 Anti-Humano de Ratón, No conjugado, Clon 3C7	EFNA1	GTX91614		Monoclonal

EFNB2

Novus Biologicals	Anticuerpo Policlonal EFNB2 Anti-Humano de Ratón, No conjugado	EFNB2	H00001948-A01		Policlonal
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Anticuerpo Policlonal Antiefrina- B2 (P-20) de Conejo, No conjugado	EFNB2 (P-20)	sc-1010	WB, IF	Policlonal
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Anticuerpo Policlonal Anti-efrina- B2 de Cabra, No conjugado	EFNB2	sc-19227	WB, IF, IP	Policlonal
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Anticuerpo Policlonal Antiefrina- B2 de Conejo, No conjugado	EFNB2	sc-15397	WB, IF, IP	Policlonal

**EJEMPLOS**

**Ejemplo 1**

5 Se lleva a cabo una variedad de métodos de análisis de secuencia, que incluyen la búsqueda de homólogos del dominio de unión EPO de EPOR, un método con base en análisis de dominio combinado con extracción de información oculta y predecible, y análisis de homología EPO seguido por extracción de información oculta y predecible de éxitos resultantes. Solo se investiga esta parte del proteoma humano expuesto al ambiente extracelular. Esto permite un foco en las homología que son significativas, aunque es posible que pase por alto dentro del contexto de un análisis de proteoma completo. Esto forma la base de datos XtraCell. La base de datos

10 XtraCell desarrolla un péptido de señal y predicción de transmembrana para el proteoma humano completo. Todas las proteínas poseen por lo menos una de las características que se almacenan en una primera versión de la base de datos extracelular. Dado que no todas las proteínas extracelulares poseen actualmente ninguna de estas

características, se extrae una lista de dominios de proteína específicos para el ambiente extracelular de un SMART (Herramienta de Búsqueda de la Arquitectura Modular Simple - SMART es una base de datos de dominio de proteína bien conocida con un sesgo fuerte hacia los dominios contenidos en las proteínas de señalización.) Estas luego se detectan contra el proteoma humano utilizando el algoritmo HMMER. El HMMER es una implementación libremente distribuible del perfil del software HMM para el análisis de secuencia de proteínas – se pueden utilizar modelos Markov de perfil oculto (perfil HMM) para hacer búsqueda de la base de datos sensible utilizando descripciones estadísticas de una secuencia de consensus de familia. Todos los éxitos se agregan a la base de datos XtraCel y el conjunto de datos hecho no redundante. Se establece una versión final de la base de datos XtraCell para el propósito de estos análisis específicos EPO (Figura 3).

## Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra un método con base en dominio acoplado con una extracción de información oculta y predecible y análisis amplio de genoma. La teoría de operación que es cualquier receptor EPO novedoso implicado en mediar el efecto neuroprotector de EPO también debe poseer los dos dominios de fibronectina 3 próximos de membrana (FN3) (como se encuentra en EPOR), mientras que al mismo tiempo es inducible por hipoxia. Dicha arquitectura del dominio conservado es compatible con un complejo heterodimérico que contiene EPOR y/o un receptor homodimérico inducible por hipoxia independiente. Todas las proteínas que contienen dos dominios FN3 próximos de membrana del proteoma humano (84 en todas) se extraen y se pregunta si existe alguna evidencia de su función en respuesta a condiciones de oxígeno bajo/ isquemia. El último análisis se realiza utilizando un método de extracción de información oculta y predecible que abarca en uso de sinónimos de proteína integrales, y conceptos tales como hipoxia e isquemia. De las 84 proteínas que contienen la composición del dominio 2FN3-TM, solo cuatro muestran evidencia para mediar la respuesta a condiciones de oxígeno bajo: EPHB4, IL6RB, TIE1 y GM-CSF. Aparte de EPH-B4, se ha estudiado la función celular de cada una de estas proteínas y una función importante en respuesta a la hipoxia establecida.

El examen directo del locus EPH-B4 revela que yuxtapone directamente el locus EPO, a pesar de su hebra opuesta. Esta asociación genómica cerrada se conserva en todos los genomas vertebrados examinados. Se observa la necesidad de la respuesta inmediata de células a condiciones de bajo oxígeno y así la necesidad de co-transcribir/-traducir las moléculas efectoras clave. Más aún, tal co-localización genómica de las moléculas funcionalmente asociadas se observa para otros patrones de receptor:ligando (por ejemplo MST1 y su receptor MST1R: véase [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/contigview?gene=OTTHUMG00000136237:db=vega](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/contigview?gene=OTTHUMG00000136237:db=vega)); (también ver Figura 4).

Para examinar esta posibilidad en más detalle, analizamos el promotor, las regiones 5' UTR y 3' UTR de EPO, EPHB4 y EPOR en la búsqueda de los sitios de unión del factor inducible de hipoxia. Aquí utilizamos el algoritmo 'Match' de Genomatix, que busca la conservación estricta de los residuos del sitio de unión de núcleo y por lo menos 90 % de conservación de residuos no núcleo. Encontramos que el locus EPO y EPH-B4 posee numerosos sitios de unión del factor de transcripción inducible por hipoxia. En contraste, se encuentra que las regiones reguladoras del gen EPOR evitan completamente dichos sitios de unión HIF-1, haciendo alusión de nuevo a una función posible para EPHB4 como un receptor EPO inducible por hipoxia (ver Figura 4).

## Ejemplo 3

Este ejemplo muestra el método con base en homología utilizando la base de datos extra-celular humana. Aquí buscamos identificar directamente las regiones de la actividad de unión EPO en otras proteínas, mediante comparación directa con el dominio de unión EPO de EPOR. La región de EPOR responsable de la unión EPO así se extrae y se utiliza para identificar homología con proteínas del XtraCellIDB. Esta base de datos especialmente desarrollada mantiene ventajas distintas en todas las homologías identificadas que son proteínas extracelulares humanas, evitando así la necesidad de evaluar homología falsas con especies intracelulares irrelevantes. El análisis de los homólogos resultantes revela una homología sorprendente con la proteína Efrina A1, dentro de la parte superior de cuatro éxitos. Dado que hemos aprendido acerca de la función posible de EPH-B4 en la señalización EPO decidimos evaluar esta homología en más detalle utilizando el paquete de estructura de proteína modelo Swiss. Aquí empleamos la información derivada de la estructura de cocrystal de Efrina A5 en asociación con EphB2 y la compara con la información de co-cristal EPO:EPOR. La conservación de los residuos clave en posiciones estructuralmente alineadas mostradas concluye una base estructural firme para asociación entre Efrina A1 y EPO. Más aún, la realización que Efrina A1 y EPHB4 poseen una afinidad putativa para EPO, sugiere un contexto funcional más excitante para biología de efrina que se reconoce por lo tanto (Ver Figura 6).

## Ejemplo 4

Este ejemplo proporciona datos in vivo o de laboratorio que validan el análisis bioinformático proporcionado en los Ejemplos 1-3 aquí. La validación in vivo de la función de EPH-B4 en la señalización de EPO se ha enfocado en el aspecto neuroprotector de la función de EPO, con un sesgo hacia la hipótesis que EPH-B4 y EPOR son compañeros

heterodiméricos. La siguiente tabla enumera los experimentos de validación para los que están disponibles los datos (ver Tabla 7).

Experimentos de validación LAB-BASED

Método	Objetivo	Resultado
Inmuno-histoquímica	Evaluar la expresión de la proteína EPHB4 en el cerebro y cómo se relaciona con la expresión EPOR.	Teñidos de precipitación en el cerebro de roedores adultos que muestra que el EPHB4 se expresa en neuronas adultas en el mismo patrón como el receptor EPO. Teñido en el hipocampo que muestra la coexpresión de EPOR y EPHB4 (ver figura 6). Sorprendentemente, el teñido se restringe a células particulares dentro del campo del tejido.
Co-IP	Expresión exógena de EPOR/EPHB4 en células COS. Co-ip con anticuerpos EpoRand EphB4 => WB análisis.	Positivo. Uso del anticuerpo EPOR exitosamente de la proteína EPHB4 de Co-IP.

5 Inmunohistoquímica. Para inmunofluorescencia, se desparafinizan las secciones de tejidos de cerebro de rata embebido con parafina (2 µm) y se someten a microondas (regulador de citrato a 600 W durante 15 min). Después de esto, las secciones se incuban simultáneamente con el antisuero EpoR (1:200; sc-697, Santa Cruz Biotechnology) y el anticuerpo EphB4 (1:100; AF446, R&D Systems) a 4° C durante la noche. Después de agregar un anticuerpo secundario anti-cabra biotinilado (1:200; Dianova), se incuban las secciones con Alexa Fluor 555 acoplado con Estreptavidina (1:200; Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y un anticuerpo secundario anticonejo acoplado a FITC (1:200; Dianova). Los núcleos se contratiñeron con Hoechst 33342 (1:10,000; Molecular Probes).  
10 Los controles para los teñidos incluyen la omisión de anticuerpos primarios, intercambio de fluoróforos, y teñidos de fluorescencia única. Se obtienen imágenes con un microscopio Olympus IX-81 con excitación de monocromador de banda ancha-angosta (Polichrome IV, Till Photonics, Gräfelfing, Alemania) y filtros apropiados.

15 El EPHB4 y EPOR exhiben una co-localización sorprendente cuando se evalúa en secciones de tejido de cerebro de rata. Sin estar limitado por la teoría, esta co-expresión sugiere el acoplamiento funcional de ambos receptores.

20 Co-inmunoprecipitación. El principio de una inmunoprecipitación es un anticuerpo (monoclonal o policlonal) contra un antígeno objetivo específico permite formar un complejo inmune con este objetivo en una muestra, tal como un lisado celular. El complejo inmune luego se captura sobre un soporte sólido en el que se ha inmovilizado la Proteína A o Proteína G (la Proteína A o G se une al anticuerpo, que se une a su antígeno). El proceso de capturar este complejo de la solución se denomina como precipitación. Se lavan cualesquier proteínas no "precipitadas" mediante el soporte inmovilizado de la Proteína A o G. Finalmente, los componentes del complejo inmune unido (antígeno y anticuerpo) se eluyen del soporte y se analizan por SDS-PAGE (electroforesis en gel), seguido frecuentemente por detección de transferencia Western para verificar la identidad del antígeno.

La inmunoprecipitación tradicional implica las siguientes etapas:

- 25 1. Se forma el complejo de antígeno-anticuerpo (complejo inmune) al incubar el anticuerpo específico con la muestra que contiene antígeno durante 1 hora a varias horas.
2. Se captura el complejo inmune en un soporte de gel de agarosa de Proteína A o Proteína G inmovilizado mediante incubación durante 0.5-2 horas.
- 30 3. Se retira cualquier proteína no unida (componentes de la muestra de complejo no inmune) del complejo precipitado mediante el soporte de gel de lavado con regulador de muestra adicional.
4. Se hierve el soporte de gel en la reducción del regulador de carga de la muestra de SDS-PAGE.
5. Se recupera la muestra eludida en el regulador de carga del soporte de gel y se analiza mediante SDS-PAGE.
6. Se realiza análisis Western blot, sondeando con anticuerpo específico de antígeno.

35 En una co-inmunoprecipitación el antígeno objetivo precipitado por el anticuerpo "co-precipita" un compañero de unión/complejo de proteína de un lisado, es decir, la proteína que interactúa se une al antígeno objetivo, que se llega

a unir por el anticuerpo que se llega a capturar en el soporte de gel de proteínas Proteína A o G. La presunción que se hace usualmente cuando las proteínas asociadas se coprecipitan es que estas proteínas se relacionan con la función del antígeno objetivo en el nivel celular.

5 La evaluación de una asociación EPHB4:EPOR putativa utilizando la co-inmunoprecipitación muestra que ambas proteínas se asocian físicamente. Aquí, e EPOR etiquetado FLAG se co-expresa con EPH-B4 en células COS y luego inmunoprecipita utilizando un anticuerpo a-FLAG. Como se puede ver de la Figura 8, se muestra que el EPHB4 co-inmunoprecipita en estos experimentos.

10 Construcciones del anticuerpo Fc humano. El método del conjugado Fc es más apropiado cuando trata con los receptores de superficie celular dimerica. Aquí la parte extracelular de EPHB4/EPOR se fusiona a un fragmento Fc. Este método tiene ventajas debido a su viabilidad in vivo (terapéutica) y el hecho que imita óptimamente el estado del receptor dimerizado. La Figura 9 destaca las construcciones humanas que se utilizan para mostrar la afinidad de EPHB4/EfrinaA1 para EPO.

Una de las dos alternativas puede evaluar la interacción de las construcciones Fc con EPO, que incluye, por ejemplo, un método de disposición de proteína o un análisis de resonancia de plasmón de superficie.

### 15 **Ejemplo 5**

Validación adicional in vitro e in vivo de la función de NEPOR en la mediación de la función EPO.

En estos experimentos buscamos determinar la respuesta al tratamiento de eritropoyetina (EPO) en un panel de estirpes de células neoplásicas de ovario. Esto se mediaría por la expresión del receptor de eritropoyetina (EPO así como también dos receptores que pueden ser capaces potencialmente de activar las rutas de señalización en respuesta a la unión de EPO, EPH-B4 y Efrina A1. Primero es necesario caracterizar la expresión de estos receptores en un panel de estirpes de células neoplásicas de ovario. Primero recolectamos ARN de cada estirpe celular y los transcribe inversos en cADN. Utilizando cebadores específicos para cada receptor analizamos su expresión de ARN. Como es evidente en las figuras la expresión de ARN de EPOR y EPH-B4 es diferente en diferentes estirpes celulares que sugieren cambios en la regulación transcripcional durante tumorigenia sin cambios significativos que se observan en la Efrina A1. Es necesario determinar la expresión de la proteína de estos receptores en el panel. De nuevo observamos diferencias significativas en la expresión de los receptores EPOR y EPHB4 aunque estos no coinciden con la expresión de ARN lo que sugiere que existen cambios en la regulación post transcripcional de estos receptores en estirpes celulares. Luego categorizamos estos cambios de expresión particularmente con respecto a EPOR y EPH-B4 para analizar entonces la respuesta al tratamiento EPO. Analizamos su respuesta a la quimioterapia en conjunto con EPO. Encontramos que particularmente en la estirpe celular de cáncer de ovario HeyA8 que la EPO es capaz de abrogar la apoptosis inducida por docetaxel. Luego es necesario analizar la activación de las rutas de señalización conocidas por ser activadas por estos receptores en respuesta a tratamiento EPO. Se sacrifican por inanición tres estirpes celulares durante dos horas para aislar su respuesta a EPO. Las estirpes celulares con mayor expresión (HeyA8 y HeyA8 MDR) del EPOR demuestra la activación de la ruta MAPK/ERK mientras que las estirpes celulares que expresan EPH-B4 mayor (SKOV3ip1) demuestran la activación aumentada de las rutas de señalización AKT y STAT5b. Buscamos determinar una dosis EPO que optimiza su efecto promotor de tumor in vivo. Se inyectan ratones sin pelo hembra i.p. con HeyA8 MDR (positivo para EPOR y EPH-B4). En el día ocho los ratones se tratan con dosis aumentadas de EPO (10, 50, 100 U) cada dos días. El tratamiento continúa hasta que los tumores llegan a ser evidentes, los ratones luego se sacrifican y se determina el peso del tumor. Observamos un aumento en el peso del tumor cuando se compara con el control en los ratones tratados con 10 y 50 U EPO. La expresión diferencial de EphB4 en estirpes celulares así como también las rutas de señalización de activación de particular sugieren que también se mediaría tumor el efecto promotor in vivo. Para determinar esto de nuevo inyectamos ratones con estirpes celulares HeyA8 MDR i.p. En el día ocho empezamos tratamiento con EPO (50 U 3x semana) en conjunto con siARN específico a EPH-B4. Como se describió previamente el siARN de EphB4 es capaz de reducir solo el crecimiento del tumor. Más aún, el siARN EPH-B4 también abroga completamente el crecimiento del tumor inducido por EPO.

Las siguientes son realizaciones específicas de esta descripción:

1. Un método para evaluar tejido de tumor para expresión de EPH-B4 y/o Efrina A1, que comprende:

(a) aislar una muestra de tejido de un individuo que está recibiendo o recibirá eritropoyetina,

50 (b) determinar el nivel de expresión del EPH-B4 y/o Efrina A1

(c) correlacionar la presencia de estos productos de expresión génica componentes a una respuesta fisiológica negativa al tratamiento con eritropoyetina.

2. El método de acuerdo con 1, en donde el nivel de expresión de los genes componentes (mARN) se determina mediante una técnica biológica molecular seleccionada del grupo que consiste de PCR, QPCR, R-PCR, análisis de microdisposición de expresión de gen, análisis de transferencia northern, transcripción inversa y amplificación, zimografía, reacción de cadena ligasa, NASBA, De Protección de RNasa (RPA), electrofóresis capilar con fluorescencia inducida por láser (CE-LIF).
3. El método de acuerdo con 1 o 2, en donde el individuo es un paciente con cáncer que va a ser tratado con eritropoyetina o que está siendo tratado con eritropoyetina.
4. El método de acuerdo con uno cualquiera de 1 a 3, en donde la presencia de productos de expresión génica de EPH-B4 y/o Efrina A1 es indicadora de control de tumor loco- regional pobre y más pobre supervivencia del paciente luego de tratamiento con eritropoyetina.
5. El método de acuerdo con uno cualquiera de 1 a 3, en donde la presencia de un alto nivel de productos de expresión génica de EPH-B4 y/o Efrina A1 es indicadora de control de tumor loco- regional pobre y más pobre supervivencia del paciente luego de tratamiento con eritropoyetina.
6. El método de acuerdo con uno cualquiera de 1 o 3 a 5, en donde el medio para evaluar la presencia de los productos de expresión son una disposición de proteína o unión a un instrumento de microbalance de masa.
7. El método de acuerdo con uno cualquiera de 1 o 3 a 5, en donde la determinación de la presencia de los productos génicos de EPH-B4 y/o Efrina A1 se hace al detectar las proteínas respectivas con un procedimiento de inmunoensayo, donde el procedimiento de inmunoensayo se selecciona del grupo de inmunoprecipitación, inmunoensayo de enzima (EIA), radioinmunoensayo (RIA) o inmunoensayo fluorescente, un ensayo quimioluminiscente, un ensayo de aglutinación, ensayo nefelométrico, ensayo turbidimétrico, una transferencia Western, un inmunoensayo competitivo, un inmunoensayo no competitivo, un inmunoensayo homogéneo un inmunoensayo heterogéneo, un bioensayo y un ensayo indicador.
8. El método de acuerdo con 7, en donde el inmunoensayo es un ELISA.
9. El método de acuerdo con uno cualquiera de 1 a 8, en donde la muestra de tejido se puede seleccionar del tejido canceroso o células circulantes derivadas del mismo o de un grupo de tejidos biológicos y fluidos tales como sangre, linfa, orina, fluido cerebral.
10. Un método de pronóstico para estratificar pacientes que tienen un tumor que es adecuado (EPH-B4 y/o Efrina A1) o no adecuado (EPH-B4 y/o Efrina A1) para tratamiento con EPO, que comprende:
- (a) aislar una muestra de tejido de un individuo que está recibiendo o recibirá eritropoyetina;
- (b) determinar el nivel de expresión del componente(s) génico de EPH-B4 y/o Efrina A1, un EPH-B4 y/o Efrina A1 del tejido aislado; y
- (c) correlacionar la presencia de productos de expresión génica componentes de EPH-B4 y/o Efrina A1 a una respuesta fisiológica negativa al tratamiento con eritropoyetina.
11. El método de pronóstico de acuerdo con 10, en donde el nivel de expresión de los genes componentes de EPH-B4 y/o Efrina A1 se determina mediante una técnica biológica molecular seleccionada del grupo que consiste de PCR, QPCR, R-PCR, análisis de microdisposición de expresión de gen, análisis de transferencia northern, transcripción inversa y amplificación, zimografía, reacción de cadena ligasa, NASBA, De Protección de RNasa (RPA), electrofóresis capilar con fluorescencia inducida por láser (CE-LIF).
12. El método de pronóstico de acuerdo con 10, en donde la determinación de la presencia de los productos génicos de EPH-B4 y/o Efrina A1 se hace al detectar la proteína respectiva con un procedimiento de inmunoensayo, donde el procedimiento de inmunoensayo se selecciona del grupo de ELISA, inmunoprecipitación, inmunoensayo de enzima (EIA), radioinmunoensayo (RIA) o inmunoensayo fluorescente, un ensayo quimioluminiscente, un ensayo de aglutinación, ensayo nefelométrico, ensayo turbidimétrico, una transferencia Western, un inmunoensayo competitivo, un inmunoensayo no competitivo, un inmunoensayo homogéneo un inmunoensayo heterogéneo, un bioensayo y un ensayo indicador tal como un ensayo de luciferasa.
13. El método de pronóstico de acuerdo con uno cualquiera de 10 a 12, en donde la muestra de tejido se selecciona del tejido canceroso o células circulantes derivadas del mismo, o de un grupo de tejidos biológicos y fluidos tales como sangre, linfa, orina, fluido cerebral.

14. Un método para formación de imagen de tejido de tumor que es susceptible a supervivencia mejorada en respuesta al tratamiento EPO, que comprende administrar un anticuerpo anti-EPH-B4 y/o anti-Efrina A1 o péptido de unión de EPH-B4 y/o Efrina A1 ligado a un radio u otro agente formador de imágenes, y medir la distribución de tejido y ubicación del radio-ligando u otro agente formador de imágenes.

5 15. El método de acuerdo con 14, en donde el anticuerpo anti-EPH-B4 y/o anti-Efrina A1 es un anticuerpo monoclonal o policlonal seleccionado del grupo de anticuerpos mencionados en la Tabla 6.

16. Un método para diseñar un compuesto que interfiere con actividad que promueve la supervivencia de NEPOR, que comprende:

10 (a) proporcionar la composición molecular de las especies NEPOR y proporcionar las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos del componente NEPOR;

(b) utilizar el software compuesto por el ordenador digital para diseñar una construcción de compuesto químico/proteína que se predice se une a NEPOR; y

(c) opcionalmente diseñar las construcciones de proteína que imitan NEPOR en su estado dimerizado/multimerizado (por ejemplo construcciones Fc).

15 17. Un método para identificar compuestos que modulan la actividad de señalización protectora de tejido de NEPOR, que comprende (a) poner en contacto un compuesto de prueba con el complejo de receptor NEPOR; (b) medir el nivel de actividad protectora de tejido iniciada por activación de NEPOR; (c) identificar un compuesto de prueba que aumenta o reduce el nivel de actividad del complejo NEPOR protector de tejido; (d) evaluar los productos terapéuticos identificados para actividad protectora de tejido mediada por NEPOR; y (e) evaluar los productos terapéuticos identificados para actividad inhibidora de NEPOR.

20 18. El método de 17 en donde se mide la actividad del complejo del receptor NEPOR protector de tejido al medir la unión del compuesto de prueba al complejo de receptor NEPOR.

25 19. El método de 18, en donde el compuesto de prueba se etiqueta y la unión del compuesto de prueba etiquetado con el complejo del receptor NEPOR protector de tejido se mide al detectar la etiqueta unida al compuesto de prueba.

20. El método de 18 en donde se mide la actividad del complejo del receptor NEPOR protector de tejido al medir la unión del compuesto de prueba al complejo del receptor NEPOR protector de tejido.

21. Un método para identificar compuestos que modulan actividad de señalización protectora de tejido de NEPOR, que comprende

30 (a) poner en contacto un compuesto de prueba con la célula que expresa el complejo de receptor NEPOR;

(b) medir el nivel de actividad protectora de tejido iniciada por activación de NEPOR en la célula;

(c) identificar un compuesto de prueba que aumenta o reduce el nivel de actividad del complejo NEPOR protector de tejido en una célula;

(d) evaluar los compuestos identificados para actividad protectora de tejido mediada por NEPOR; y

35 (e) evaluar los productos terapéuticos identificados para actividad inhibidora de NEPOR.

22. El método de 21, en donde el ensayo en la etapa (d) es una actividad del complejo del receptor NEPOR protector de tejido que se mide mediante un ensayo de proliferación/ diferenciación celular.

23. El método de 22, en donde las células en el ensayo de proliferación/ diferenciación celular se diseñan de forma recombinante con ingeniería para expresar EPH-B4, y/o EPOR, y/o Efrina A1.

40 24. El método de 23, en donde las células expresan de forma endógena un receptor EPO y se transforman con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que

(i) se liga de forma operable a un promotor, y

(ii) codifica ya sea EPH-B4 y/o Efrina A1.

25. El método de 23, en donde las células expresan de forma endógena EPH-B4 y/o Efrina A1 y se transforman con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que (i) se liga de forma operable a un promotor, y (ii) codifica un polipéptido del receptor EPO.

5 26. Un método para identificar un compuesto que modula la interacción entre un complejo del receptor NEPOR protector de tejido y un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido, que comprende:

(a) poner en contacto un complejo del receptor NEPOR protector de tejido con uno o más compuestos de prueba; y

10 (b) medir la actividad del complejo del receptor NEPOR protector de tejido, por lo cual si la actividad medida en (b) difiere de la actividad del complejo del receptor NEPOR protector de tejido en la ausencia de uno o más compuestos de prueba, entonces se identifica un compuesto que modula la interacción entre el complejo del receptor NEPOR protector de tejido y el ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido.

27. El método de 17, 21 o 26, en donde la actividad del complejo del receptor NEPOR protector de tejido se mide por proliferación celular o diferenciación celular.

15 28. El método de 17, 21 o 26, en donde la actividad del complejo del receptor NEPOR protector de tejido medido tiene la capacidad del complejo del receptor NEPOR protector de tejido para interactuar con un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido.

29. El método de 17, 21 o 26, en donde la etapa de evaluar el compuesto identificado para actividad protectora de tejido comprende detectar la presencia de nucleolina en la célula.

20 30. El método de 17, 21 o 26, en donde la etapa de evaluar el compuesto identificado para actividad protectora de tejido comprende detectar o medir un nivel aumentado de actividad de neuroglobina o citoglobina en una célula.

31. El método de 17, 21 o 26 en donde el complejo del receptor NEPOR protector de tejido está en solución.

32. El método de las reivindicaciones 17, 21 o 26, en donde el complejo del receptor NEPOR protector de tejido está en una célula.

25 33. El método de 17, 21 o 26, en donde el compuesto inhibe la unión de un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido a un complejo del receptor NEPOR protector de tejido.

34. El método de 17, 21 o 26, en donde el compuesto mejora la unión de un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido a un complejo del receptor NEPOR protector de tejido.

35. El método de 17, 21 o 26, en donde el complejo del receptor NEPOR protector de tejido puesto en contacto en la etapa (a) está sobre una superficie celular.

30 36. El método de 17, 21 o 26, en donde el complejo del receptor NEPOR protector de tejido está sobre una membrana celular aislada.

37. El método de 17, 21 o 26, en donde la actividad del complejo del receptor NEPOR protector de tejido se compara con la activación del receptor se compara con la activación del receptor de EPOR para identificar compuestos específicos de NEPOR.

35 38. El método de 17, 21 o 26, en donde el complejo del receptor NEPOR protector de tejido se inmoviliza a una superficie sólida.

39. El método de 38, en donde la superficie sólida es una placa de microtitulación.

40. El método de 38, en donde la superficie sólida es un chip.

40 41. Un método para identificar un compuesto que une un complejo del receptor NEPOR protector de tejido, que comprende:

(a) poner en contacto un compuesto de prueba con un fragmento del complejo del receptor NEPOR protector de tejido que se une a ligando que comprende por lo menos un dominio extracelular del receptor EPO o receptor EPH-

B4 o receptor de Efrina A1 y por lo menos un receptor EPO o receptor EPH-B4 o receptor de Efrina A1, dominio extracelular fusionado a un fragmento Fc unido a un soporte sólido; y

(b) poner en contacto un compuesto de prueba con un fragmento del complejo del receptor de EPOR que se une a un ligando que comprende por lo menos dos dominios extracelulares del receptor EPO fusionados a un fragmento Fc unido a un soporte sólido

(c) retirar compuestos de prueba no unidos de los soportes sólidos;

(d) identificar el compuesto adjunto al fragmento del complejo del receptor NEPOR protector de tejido, pero no el complejo del receptor EPOR (y viceversa), por lo cual un compuesto unido al soporte sólido se identifica como un compuesto que se une específicamente a un complejo del receptor NEPOR protector de tejido o un compuesto que se une específicamente a un complejo del receptor EPOR.

42. Un método para identificar un compuesto que une un complejo del receptor NEPOR protector de tejido, que comprende:

(a) poner en contacto un compuesto de prueba con un fragmento del complejo del receptor NEPOR protector de tejido que se une a un ligando que comprende por lo menos un receptor EPO o receptor EPH-B4 o receptor de Efrina A1, dominio extracelular fusionado a un fragmento Fc unido a un soporte sólido;

(b) retirar los compuestos no unidos de prueba de los soportes sólidos;

(c) identificar el compuesto unido al fragmento del complejo del receptor NEPOR protector de tejido, por lo cual un compuesto unido al soporte sólido se identifica como un compuesto que se une específicamente a un complejo del receptor NEPOR protector de tejido.

43. Un método para identificar un compuesto que se une a un complejo del receptor NEPOR protector de tejido, que comprende:

(a) poner en contacto un fragmento del complejo del receptor NEPOR protector de tejido que comprende por lo menos un dominio extracelular del receptor EPO o receptor EPH-B4 o receptor de Efrina A1 y por lo menos un receptor EPO o receptor EPH-B4 o receptor de Efrina A1, dominio extracelular fusionado a un fragmento Fc unido a un soporte sólido con

(i) un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido unido a una primera etiqueta y

(ii) una cantidad equivalente de un compuesto de prueba unido a una segunda etiqueta bajo condiciones conductoras a unión;

(b) retirar el material no unido desde el complejo del receptor NEPOR protector de tejido; y

(c) detectar el nivel de la primera y segunda etiquetas en donde si la segunda etiqueta está presente el compuesto une el complejo y si el nivel de la primera etiqueta se reduce con relación al nivel de la primera etiqueta donde el ligando etiquetado se pone en contacto con un complejo del receptor NEPOR protector de tejido bajo condiciones conductoras para unión en la ausencia de un compuesto de prueba después del retiro del material no unido, entonces se identifica un compuesto que se une a un complejo del receptor NEPOR protector de tejido.

44. Un método para identificar un compuesto que modula la unión de un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido a un complejo del receptor NEPOR protector de tejido, que comprende:

(a) poner en contacto un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido con un fragmento del complejo del receptor NEPOR protector de tejido que comprende por lo menos un dominio extracelular del receptor EPO o receptor EPH-B4 o receptor de Efrina A1 y por lo menos un receptor EPO o receptor EPH-B4 o receptor de Efrina A1, dominio extracelular fusionado a un fragmento Fc unido a un soporte sólido; en la presencia de uno o más compuestos de prueba bajo condiciones conductoras a unión; y

(b) medir la cantidad de complejo del receptor NEPOR protector de tejido ligado unido al complejo del receptor NEPOR protector de tejido; por lo cual si la cantidad de ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido medido unido en (b) difiere de la cantidad de ligando unido del complejo del receptor NEPOR protector de tejido medido en la ausencia del uno o más compuestos de prueba, entonces se identifica un compuesto que modula la unión de un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido al complejo del receptor NEPOR protector de tejido.

45. El método de - 26 o 44, en donde la cantidad de ligando unido del complejo del receptor NEPOR protector de tejido se mide utilizando un anticuerpo específico a ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido.
46. El método de 26 o 44 en donde el ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido se etiqueta y la unión del ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido al complejo del receptor NEPOR protector de tejido se mide al detectar la etiqueta unida al ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido.
47. El método de 26 o 44 en donde el ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido se etiqueta y la unión del ligando etiquetado al complejo del receptor NEPOR protector de tejido se mide al detectar la etiqueta unida al ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido.
48. El método de 46, en donde la etiqueta es fluorescente.
49. El método de 16, 17, 21, 26, o 41 a 46 en donde el compuesto de prueba es un anticuerpo específico para el complejo del receptor NEPOR protector de tejido.
50. El método de 16, 17, 21, 26, o 41 a 46 en donde el compuesto de prueba es una molécula pequeña.
51. El método de 16, 17, 21, 26, o 41 a 46 en donde el compuesto de prueba es un péptido.
52. El método de 16, 17, 21, 26, o 41 a 46 en donde el compuesto de prueba es un elemento de una colección.
53. El método de 26 o 44, en donde el ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido es EPO, o derivado del mismo.
54. El método de 16, 17, 21, 41, 42, o 43 en donde el compuesto une el complejo del receptor NEPOR protector de tejido.
55. El método de 26 o 44, en donde el compuesto une el ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido.
56. El método de 16, 17, 21, 26, o 41 a 46 en donde la actividad del complejo del receptor NEPOR protector de tejido se compara con la activación del receptor de EPOR para identificar compuestos específicos de NEPOR.
57. Un método para identificar un compuesto que modula una actividad protectora de tejido en un mamífero, que comprende:
- (a) administrar el compuesto a un primer animal inmediatamente luego de provocar una lesión, en donde el primer animal expresa de forma endógena un complejo del receptor NEPOR protector de tejido; y
- (b) administrar el compuesto a un segundo animal inmediatamente luego de provocar la misma lesión que en la etapa (a), en donde el segundo animal es deficiente en expresión de un complejo del receptor NEPOR protector de tejido o componentes de mismo; de tal manera que si la recuperación de la lesión difiere en el animal de la etapa (a) en comparación con el animal de la etapa (b), se identifica un compuesto que modula a actividad protectora de tejido.
58. Un método para tratar los resultados negativos del paciente asociados con la función NEPOR estimulada por, que implica la co-administración de EPO con un inhibidor de actividad NEPOR.
59. El método para tratar supervivencia de células neoplásicas inducidas por EPO en tejido de tumor positivo a NEPOR de 58, que comprende administrar una cantidad efectiva de anticuerpo anti-NEPORL 1 de la reivindicación 1, en combinación con EPO, por lo cual dichas combinaciones permiten señalización hematopoyética mientras que sin cambio la señalización de NEPOR y de esta manera el EPO media las señales de supervivencia celular sobre células neoplásicas.
60. El método para tratar supervivencia de células neoplásicas inducidas por EPO en tejido de tumor positivo a NEPOR de 58, que comprende adicionalmente administrar una cantidad efectiva del inhibidor de quinasa tirosina de EPHB4 en combinación con EPO, por lo cual dichas combinaciones permiten la señalización hematopoyética mientras que dejan sin cambio la señalización de NEPOR y de esta manera el EPO media las señales de supervivencia celular sobre células tumorales.
61. El método para tratar supervivencia de células neoplásicas inducidas por EPO en tejido de tumor positivo a NEPOR de 58, comprende adicionalmente administrar una cantidad efectiva de siARN anti-NEPOR, en combinación

con EPO, por lo cual dichas combinaciones permiten la señalización hematopoyética mientras que dejan sin cambio la señalización de NEPOR y de esta manera el EPO media las señales de supervivencia celular sobre células tumorales.

- 5 62. Un método para reducir la supervivencia de tejidos o células neoplásicas en tejidos en un humano que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que modula la actividad de un complejo del receptor NEPOR protector de tejido a un humano en necesidad del mismo, en donde dicha supervivencia reducida de las células/tejidos neoplásicos resulta en la reducción del crecimiento de tumor y/o un aumento en la supervivencia del paciente, con la condición que el compuesto sea un derivado de EPO y no un EPO tipo natural.
- 10 63. El método de 58, 59, 60, 61, 62 en donde el compuesto se identifica por el método de uno cualquiera de las reivindicaciones 16, 17, 21, 26, o 41 a 46.
64. Un método para modular la supervivencia celular en tejido positivo a NEPOR que comprende administrar mutantes y péptidos de EPO seleccionados del grupo que consiste de péptidos de cada una de las SEQ ID NO. 17 a SEQ ID NO. 212.
- 15 65. Un método para modular supervivencia celular e un tejido positivo a NEPOR que comprende administrar una cantidad efectiva de una quimera de EPO, que comprende un dominio de unión de ligando del receptor de efrina seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO.215, y SEQ ID NO.216.
66. El método de 58, 59, 60, 61, 62 en donde el compuesto es un anticuerpo específico para el complejo del receptor NEPOR protector de tejido.
- 20 67. El método de 58, 59, 60, 61, 62 en donde el compuesto es un anticuerpo específico para un ligando del complejo del receptor NEPOR protector de tejido.
68. El método de 58, 59, 60, 61, 62 en donde el compuesto es una molécula pequeña, péptido, o un elemento de una colección.
69. El método de 58, 59, 60, 61, 62 en donde el compuesto une al complejo del receptor NEPOR protector de tejido.
- 25 70. El método de 58, 59, 60, 61, 62 en donde el compuesto reduce la actividad del complejo del receptor NEPOR protector de tejido.
71. El método de 58, 59, 60, 61, 62 en donde el compuesto se administra en conjunto con un EPO.
- 30 72. El método de 58, 59, 60, 61, 62 en donde la enfermedad o trastorno es un cáncer que incluye, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de intestino delgado, leucemia, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer endometrial, cáncer de estómago, linfoma no Hodgkin, cáncer de riñón, carcinoma de células renales (RCC), melanoma maligno, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vejiga, cáncer vulvar, cáncer de pene, cáncer testicular, cáncer de timo, sarcoma de Kaposi, cáncer de ojo, cáncer de la glándula suprarrenal, cáncer de cerebro, cáncer de cuello uterino, cáncer de apéndice, cáncer de pólipos, cáncer hepático, cáncer de uretra, cáncer de la médula, familia de tumores de Ewing, cáncer de células germinales extragonales, cáncer del conducto biliar extra hepático, cáncer de trompa de Falopio, cánceres de tejidos blandos, cáncer de hueso, linfoma de Hodgkin, cáncer anal, mesotelioma maligno, cáncer de piel, cáncer vaginal, cáncer del sistema nervioso central (craneofaringioma), blastoma pleuropulmonar, cáncer sinu paranasal y de cavidad nasal, cáncer de célula transicional de pelvis renal y uretra, cáncer de glándula pituitaria, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer cerebral, cáncer de vejiga, y cáncer de glándula salivar.
- 35 73. El método de 58, 59, 60, 61, 62 en donde el cáncer comprende células neoplásicas que expresan el complejo del receptor NEPOR protector de tejido.
74. El método de 58, 59, 60, 61, 62, en donde el cáncer es cáncer metastático.
75. El método de 58, 59, 60, 61, 62 en donde el cáncer es un cáncer dependiente de angiogénesis.
- 45 76. Un método para tratar un paciente que sufre de una enfermedad asociada a la angiogénesis, que comprende administrar al paciente un compuesto identificado por el método de uno cualquiera de 16, 17, 21, 26, o 41 a 46.

77. El siARN que es específico para EPH-B4 para uso en el tratamiento de un paciente con cáncer y/o tumor que está recibiendo o recibirá Eritropoyetina.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de determinar si un paciente con cáncer es adecuado para terapia con eritropoyetina (EPO), que comprende

(A) determinar el nivel de expresión de EPH-B4 en una muestra de tejido aislada de dicho paciente; y

5 (B) correlacionar una presencia de expresión de EPH-B4 con una respuesta fisiológica negativa a terapia con EPO.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el nivel de expresión se determina mediante una técnica seleccionada del grupo que consiste de inmunoensayo, ensayo quimioluminiscente, ensayo nefelométrico, ensayo turbidimétrico, bioensayo y ensayo indicador.

10 3. El método de la reivindicación 1, en donde el nivel de expresión se determina mediante un inmunoensayo seleccionado del grupo que consiste del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), inmunoprecipitación, inmunoensayo de enzima (EIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo fluorescente, transferencia Western, inmunoensayo competitivo, inmunoensayo no competitivo, inmunoensayo homogéneo y inmunoensayo heterogéneo.

4. El método de la reivindicación 1, en donde el nivel de expresión se determina mediante ELISA.

15 5. El método de la reivindicación 1, en donde dicho nivel de expresión se determina mediante inmunohistoquímica.

20 6. El método de la reivindicación 1, en donde el nivel de expresión se determina mediante medir la cantidad de EPH-B4 mRNA en dicha muestra, en particular en donde el nivel de expresión se determina mediante una técnica seleccionada del grupo que consiste de PCR, QPCR, R-PCR, análisis de microdisposición de expresión de gen, análisis de transferencia northern, transcripción inversa y amplificación, zimografía, reacción de cadena ligasa, NASBA, De Protección de RNasa (RPA), electrofóresis capilar con fluorescencia inducida por láser (CE-LIF), y RT-PCR.

7. El método de la reivindicación 6, en donde el nivel de expresión se determina mediante transcripción inversa y amplificación.

25 8. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra de tejido se selecciona de tejido canceroso o células circulantes derivadas del mismo, o en donde la muestra de tejido se selecciona de sangre, linfa, orina o fluido cerebral.

9. El método de la reivindicación 1, comprende adicionalmente determinar el nivel de expresión en dicha muestra de por lo menos uno de Efrina A1 o EPOR.

30 10. El método de la reivindicación 1, en donde dicha respuesta fisiológica negativa incluye evolución de tumor en aumento, más pobre supervivencia del paciente o supervivencia celular de tumor mejorada.

Fig. 1

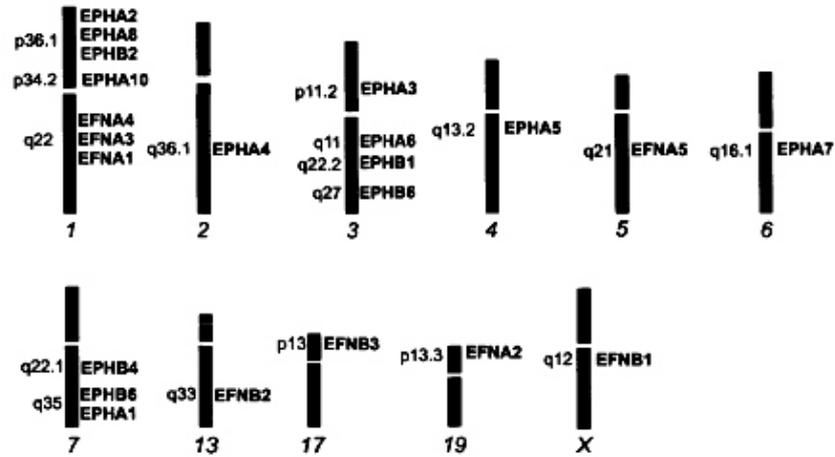


Fig. 2

ARQUITECTURA DEL DOMINIO DEL RECEPTOR EPH

ARQUITECTURA DEL DOMINIO DE EFRINA

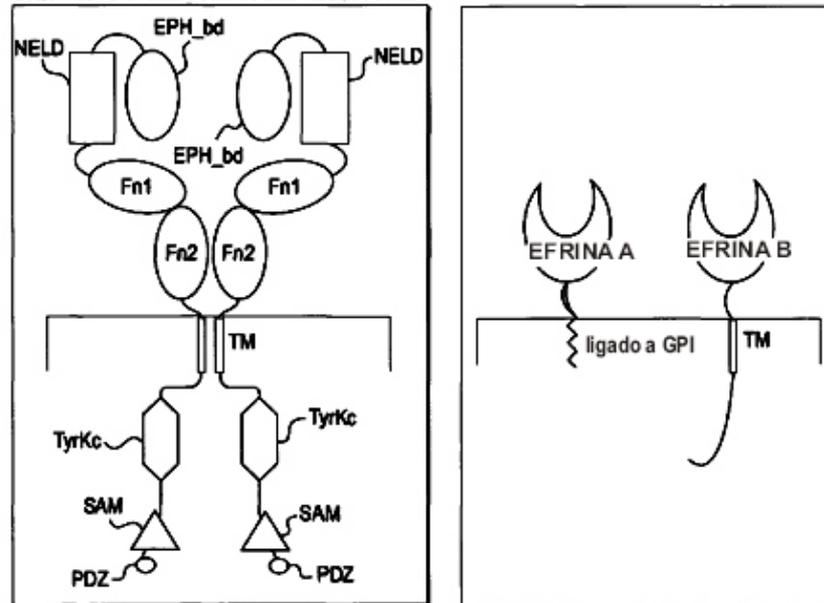


Fig. 3

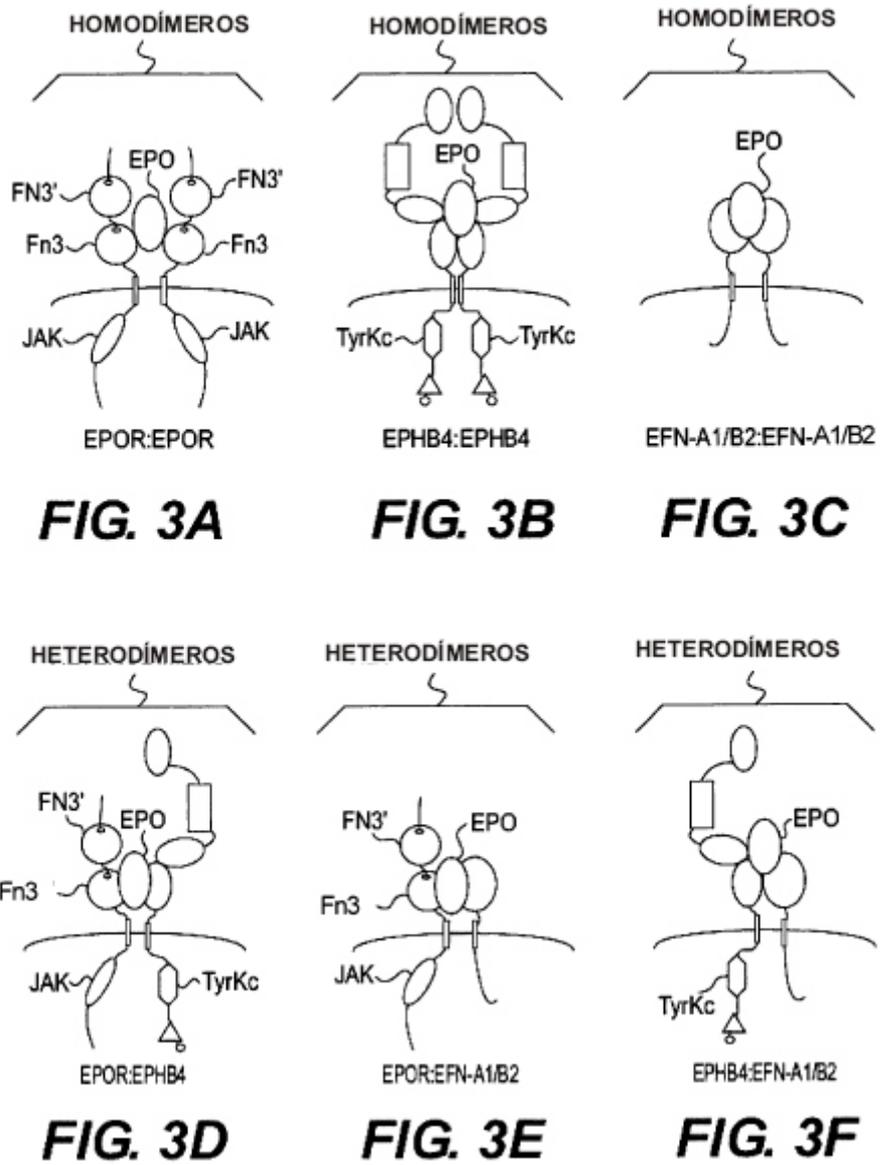


Fig. 4

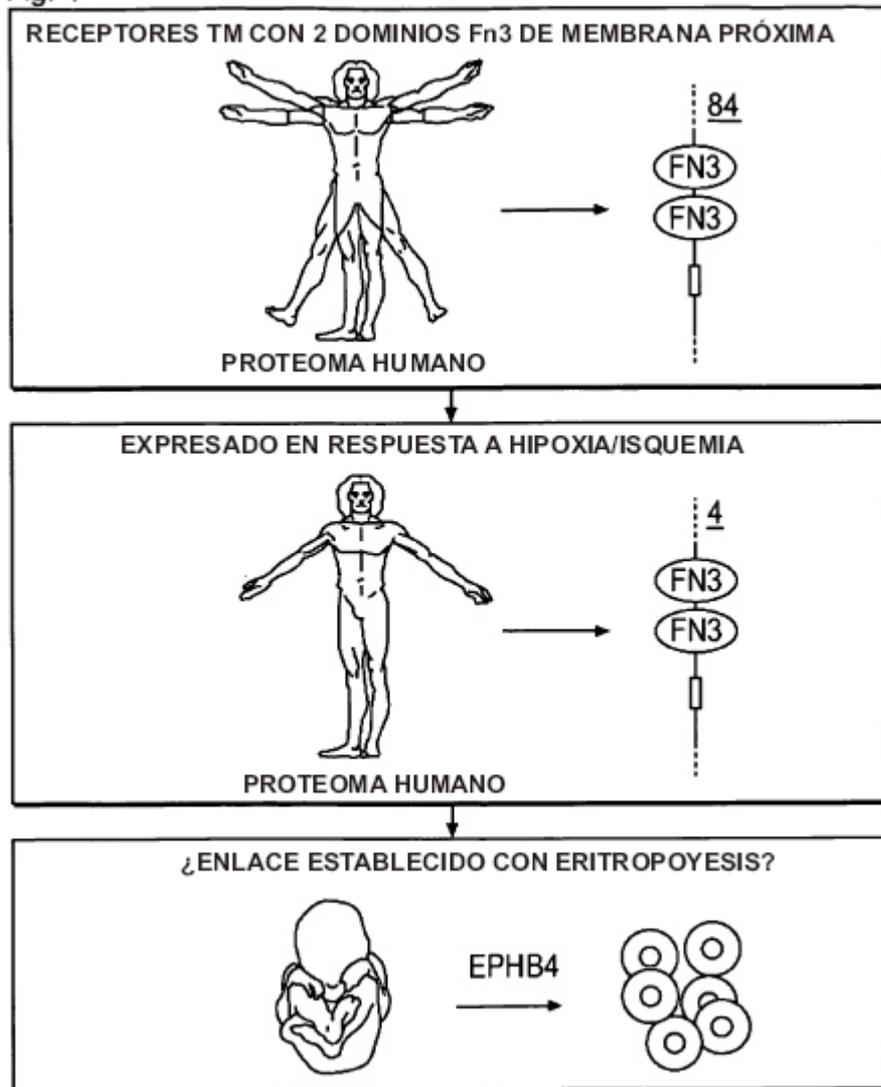






FIG. 6

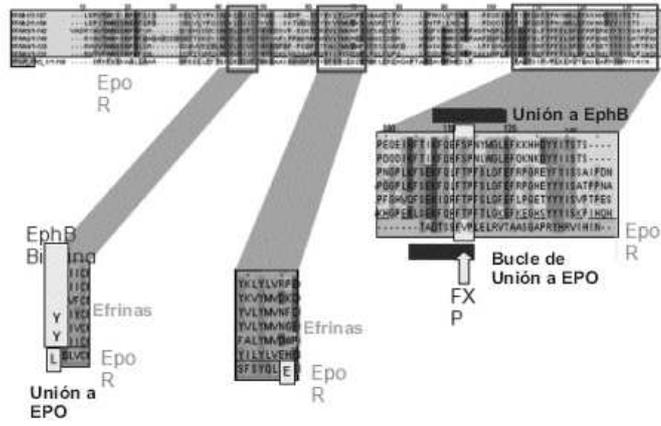


FIG. 6

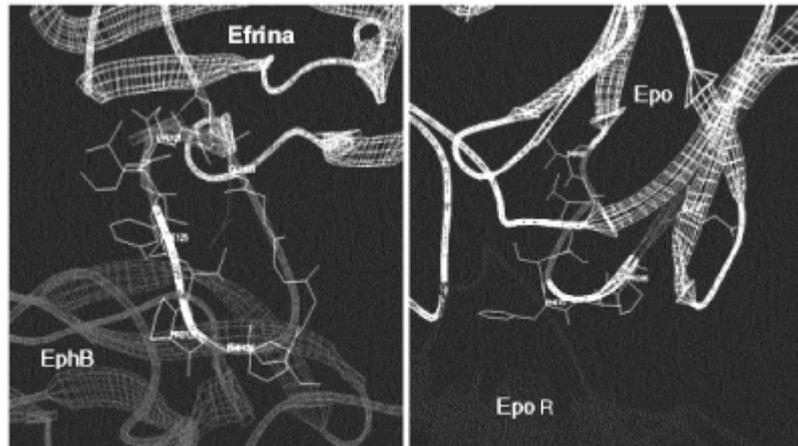


FIG. 7

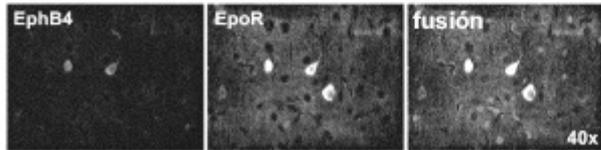
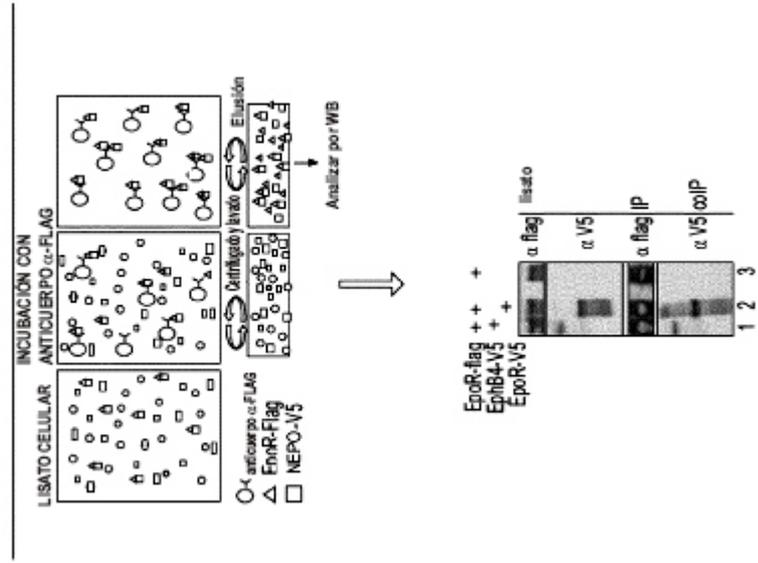


Fig. 8



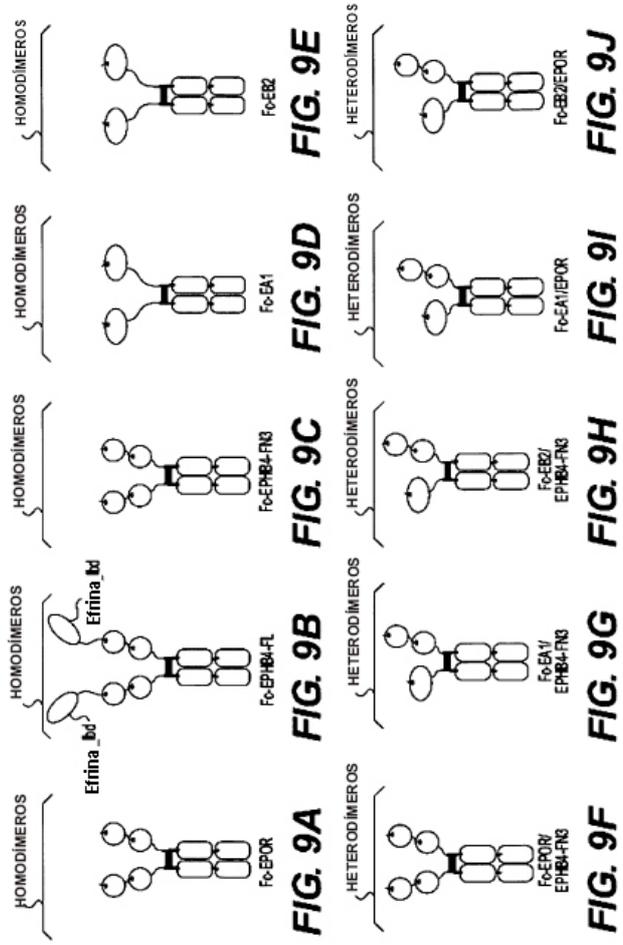




Fig. 11

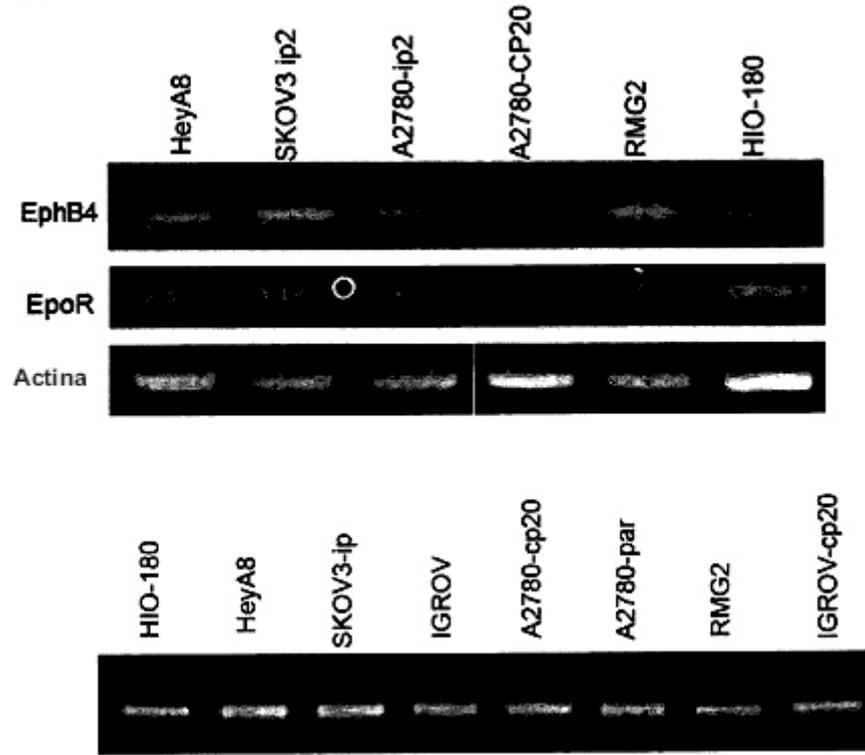


Fig. 12

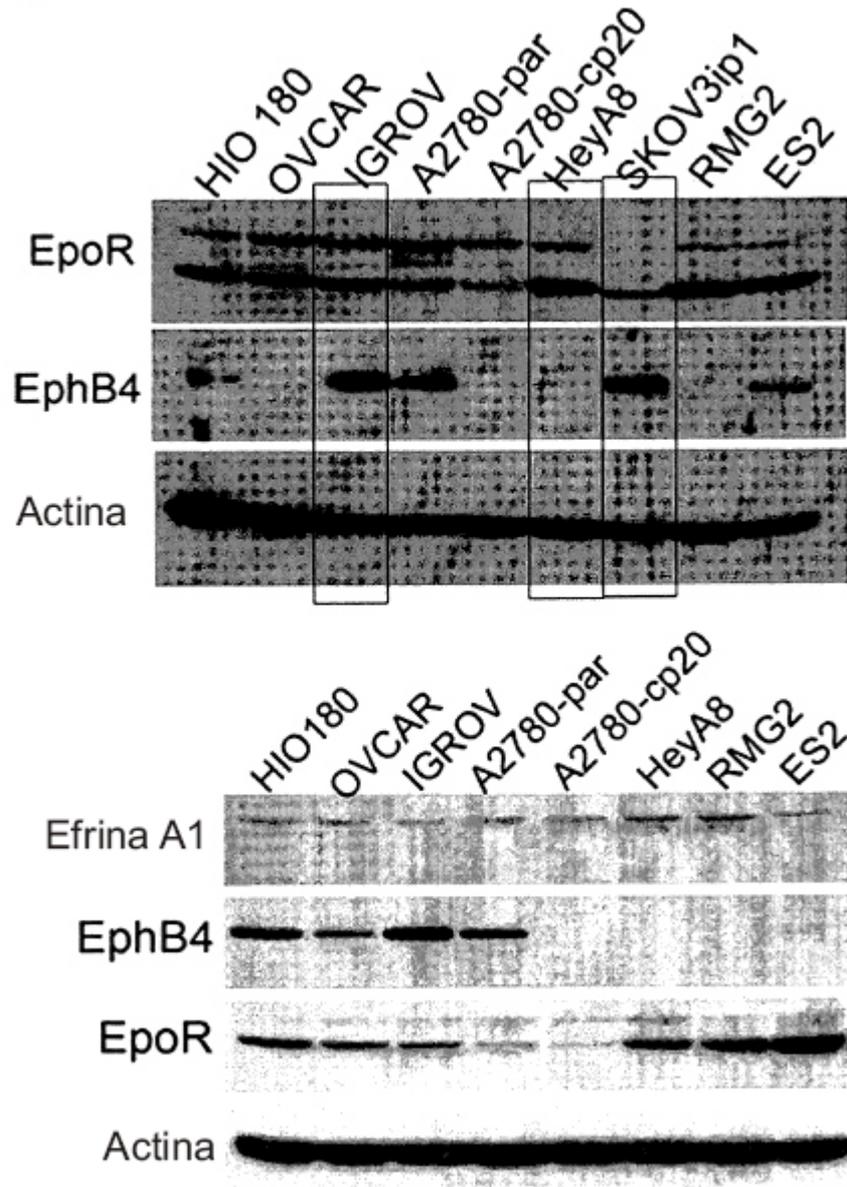


Fig. 13

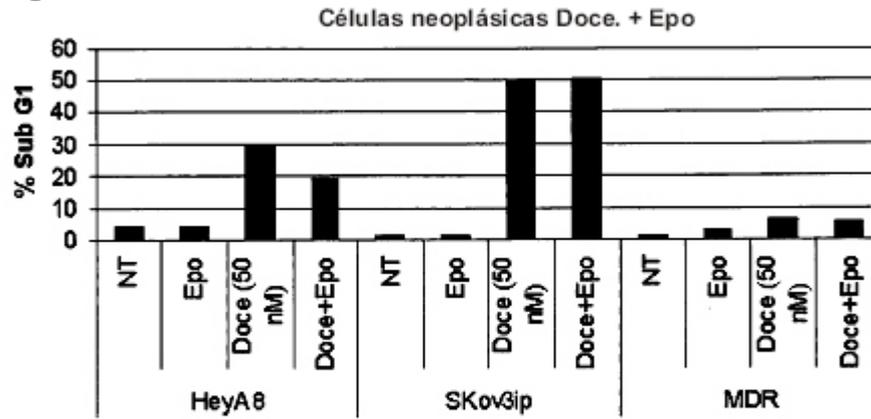
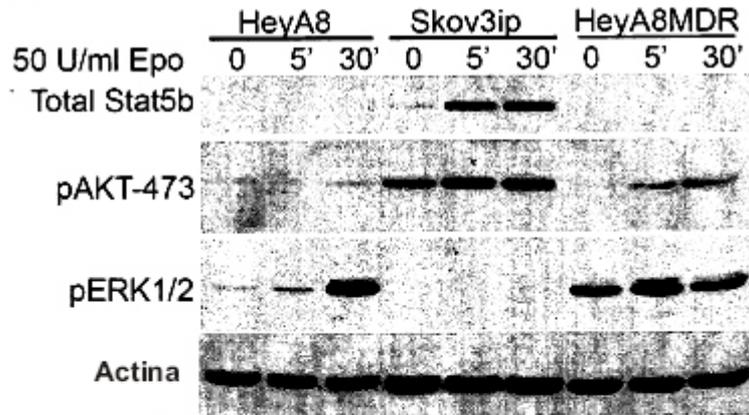
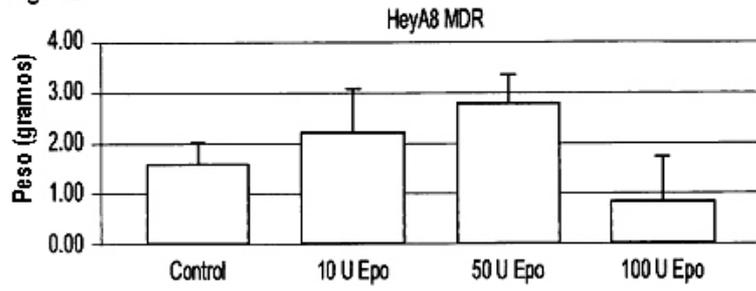


Fig. 14



Estirpe Celular	EpoR	EphB4
Igrov	+	++
Skov3ip	0	++
HeyA8	++	0
HeyA8MDR	+++	+

Fig. 15



Muestras de tumor de ratón HeyA8 MDR

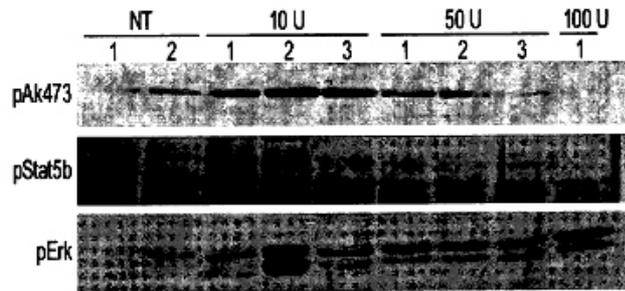
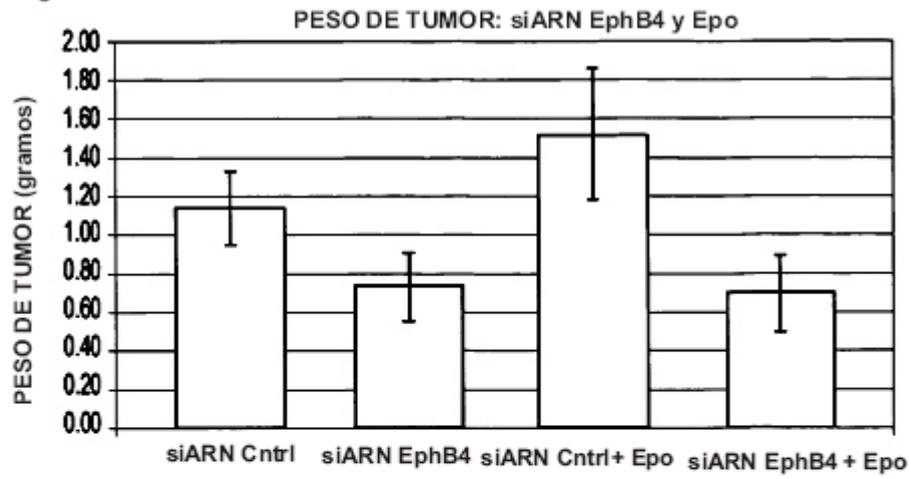


Fig. 16



PORCENTAJE DE REDUCCIÓN		PRUEBA T
0.360976	1 v 2	0.065056
-0.33573	1 v 3	0.024901
-1.09027	2 v 3	0.024901
-0.19542	2 v 4	0.284385
0.428102	3 v 4	0.055284
0.236098	1 v 4	0.155481

Fig. 17

