

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0608769-8 A2**

(22) Data de Depósito: 15/05/2006
(43) Data da Publicação: 26/01/2010
(RPI 2038)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/435 (2010.01)

(54) Título: **VARIANTES DE ERITROPOIETINA**

(30) Prioridade Unionista: 13/05/2005 EP 05 010473.6

(73) Titular(es): CHARITÉ-UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN

(72) Inventor(es): Andreas Meisel, Christel Bonnas, Josef Priller, Ulrich Dirnagl

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006004564 de 15/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/120030 de 16/11/2006

(57) Resumo: VARIANTES DE ERITROPOIETINA. A presente invenção refere-se a novas variantes endógenas de eritropoietina (EPO) e seu uso para o tratamento ou prevenção de uma condição associada com o dano tecidual causado pela morte celular (apoptose, necrose) e inflamação, particularmente para neuroproteção, por exemplo, tratamento de doença aguda (por exemplo, apoplexia) e crônica (por exemplo, ALS) do sistema nervoso.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "VARIANTES DE ERITROPOIETINA".

Campo da invenção

A presente invenção refere-se a novas variantes endógenas de eritropoietina (EPO) e seus usos para o tratamento ou prevenção de uma condição associada com o dano tecidual devido à morte celular (apoptose, necrose) e inflamação, particularmente para neuroproteção, por exemplo, tratamento de doença aguda (por exemplo, apoplexia) e crônica (por exemplo, ALS) do sistema nervoso.

10 Antecedentes da invenção

Apoplexia é uma doença debilitante a qual afeta mais de 400.000 pessoas por ano nos Estados Unidos e é a terceira causa mais comum de morte nos Estados Unidos. Além disso, metade dos pacientes internados tem problemas relacionados com apoplexia. Nas tendências atuais, 15 essa quantidade é projetada para pular para um milhão por ano por volta do ano 2050. Quando os custos diretos (cuidado e tratamento) e os custos indiretos (perda de produtividade) das apoplexias são considerados juntos, apoplexias colocam um encargo de \$ 43,3 bilhões por ano somente na sociedade americana. Cerca de 1/3 dos pacientes morrem nos primeiros três meses, 20 1/3 permanece com incapacidade severa, e 1/3 se recupera com um resultado aceitável. Em 1990, doenças cerebrovasculares foram a segunda causa principal de morte no mundo, matando mais de 4,3 milhões de pessoas por todo o mundo. Dessa forma, de uma perspectiva de saúde pública, apoplexia é uma das doenças mais relevantes.

25 Apoplexia é caracterizado pela perda repentina de circulação a uma área do cérebro, resultando em uma perda correspondente de função neurológica. Também chamado de acidente neurovascular ou síndrome do apoplexia, apoplexia é um termo não-específico englobando um grupo heterogêneo de causas patofisiológicas, incluindo trombose, embolismo e hemorragia. Apoplexias são atualmente classificados ou como hemorrágicos ou 30 como isquêmicos. Apoplexia isquêmico agudo refere-se aos apoplexias causados por trombose ou embolismo e respondem por 80% de todos os apo-

plexias.

Apoplexias isquêmicos resultam do bloqueio das artérias que suprem o cérebro, mais comumente nas ramificações das artérias carótidas internas. O bloqueio geralmente resulta quando um pedaço de um coágulo 5 sangüíneo (trombo) ou de um depósito de gordura (ateroma) devido ao rompimento de aterosclerose (se tornando um êmbolo) viaja pela corrente sanguínea e se aloja em uma artéria que supre o cérebro. Os coágulos sangüíneos podem se formar quando um depósito de gordura se deposita na parede de uma ruptura de artéria. A ruptura de tal depósito de gordura também 10 pode se formar quando um grande depósito de gordura reduz o fluxo sanguíneo, reduzindo ele até um gotejamento. Sangue que flui lentamente é mais provável de coagular. Dessa forma, o risco de formação de um coágulo e de bloqueio em uma artéria estreita é alto. Coágulos sangüíneos também 15 podem se formar em outras áreas, tais como no coração ou em uma válvula cardíaca. Apoplexias devido a tais coágulos sangüíneos são mais comuns entre pessoas as quais tiveram recentemente cirurgia do coração e pessoas que têm um distúrbio de válvula cardíaca ou um ritmo cardíaco anormal (arritmia), especialmente fibrilação atrial. Também, em certos distúrbios tais 20 como excesso de hemácias (policitemia), o risco de coágulos sangüíneos é aumentado porque o sangue é espesso.

Um apoplexia isquêmico também pode resultar, se o fluxo sanguíneo para o cérebro for reduzido, como pode ocorrer quando uma pessoa perde muito sangue ou tem uma pressão sanguínea muito baixa. Ocasionalmente, um apoplexia isquêmico ocorre quando o fluxo sanguíneo para o 25 cérebro é normal, mas o sangue não contém oxigênio suficiente. Distúrbios que reduzem o conteúdo de oxigênio do sangue incluem anemia severa (uma deficiência das hemácias), sufocação e envenenamento por monóxido de carbono. Geralmente, o dano cerebral em tais casos é muito difundido (difuso) e resulta em coma. Um apoplexia isquêmico pode ocorrer se inflamação ou infecção estreitar os vasos sanguíneos que alimentam o cérebro. 30 Similarmente, drogas tais como cocaína e anfetaminas podem causar espasmo das artérias, o que pode levar a um estreitamento das artérias que

alimentam o cérebro até uma extensão tal que cause um apoplexia.

O cérebro necessita de glicose e oxigênio para manter o metabolismo e a função neuronal. A distribuição inadequada de oxigênio para o cérebro leva a uma hipóxia e a isquemia resulta do fluxo sanguíneo cerebral insuficiente. As consequências da isquemia cerebral dependem do grau e da duração do fluxo sanguíneo cerebral reduzido. Os neurônios podem tolerar isquemia por 30 – 60 minutos. Se o fluxo não for restabelecido para a área isquêmica, isso resulta em uma série de processos metabólicos. Os neurônios ficam esgotados de ATP e mudam para a glicólise anaeróbica, uma via muito menos eficiente. Lactato se acumula e o pH intracelular diminui. Sem um fornecimento adequado de ATP, as bombas de íons na membrana plasmática falham. O influxo resultante de sódio, água e cálcio na célula causa o rápido inchaço dos neurônios e das células da glia. A despolarização da membrana também estimula a liberação massiva dos aminoácidos glutamato e aspartato, ambos os quais agem como neurotransmissores excitatórios no cérebro. Glutamato ativa ainda os canais de íons sódio e cálcio na membrana celular neuronal, a saber, o canal de cálcio N-metil-D-aspartato (NMDA) bem-characterizado. Influxo de cálcio excessivo causa a ativação desordenada de uma ampla faixa de sistemas enzimáticos (proteases, lipases e nucleases). Essas enzimas e seus produtos metabólicos, tais como radicais livres de oxigênio, danificam as membranas celulares, o material genético e as proteínas estruturais nos neurônios, levando como resultado à morte celular dos neurônios (Dirnagl, U. et al. (1999) *Trends Neurosci.* 22: 391-397).

Apoplexias se iniciam repentinamente, se desenvolvem rapidamente e causam a morte do tecido cerebral de minutos até dias. No cérebro isquêmico, comumente distingui-se dois volumes de tecido – o núcleo do enfarte e a zona circundante, conhecida como peem umbra isquêmica – a margem subperfundida e metabolicamente comprometida ao redor do núcleo irrevogavelmente danificado. O núcleo e a peem umbra são caracterizados por dois diferentes tipos de morte celular: necrose e apoptose (a qual é também chamada de morte celular programada ou morte celular neuronal retardada). O déficit de perfusão severa no núcleo causa uma quebra dos pro-

cessos metabólicos, do fornecimento de energia celular e da homeostase iônica, o que causa a perda da integridade celular em minutos. Dessa forma, a necrose aguda da célula e do tecido prevalece no núcleo. Na penumbra, alguma reperfusão residual é mantida pelos vasos colaterais, os quais podem ser incapazes de manter o metabolismo funcional completo, mas previne a desintegração estrutural imediata. Entretanto, no decorrer do tempo (de horas até vários dias), a alteração da homeostase celular faz com que mais e mais células morram, e o volume do enfarte aumenta. A penumbra, dessa forma, tem que ser considerada como tecido em risco durante a maturação do enfarte. Nessa região, apoptose e cascatas de sinalização inflamatória desempenham um importante papel. Ela pode inicialmente constituir 50% do volume que irá terminar como enfarte. Os mecanismos que levam à morte celular retardada proporcionam alvos para uma terapia neuroprotetora específica nas regiões cerebrais desafiadas pela isquemia, mas as quais 15 ainda são viáveis.

Opções terapêuticas até aqui são altamente frustrantes: Trombólise com rtPA, a única terapia com eficácia comprovada em um teste clínico maior (NINDS), somente é eficaz em uma janela de tempo de três horas, limitando sua aplicação para somente uma pequena porcentagem de pacientes com apoplexia isquêmico. Em outras palavras, além da terapia aprobativa básica, atualmente mais de 95% das apoplexias não podem ser tratadas especificamente. Isso está em contraste pronunciado com o conhecimento envolvendo a patofisiologia básica dessa doença, a qual se desenvolveu na última década. Particularmente, conhecimento extensivo tem se acumulado 20 nos mecanismos do dano cerebral parenquimal e da neuroproteção endógena, assim como na reorganização funcional e estrutural.

Recentemente, atenção tem se focado nos papéis terapêuticos potenciais para as proteínas cerebrais endógenas que possuem propriedades neuroprotetoras. EPO, um hormônio de glicoproteína produzido primariamente pelas células do endotélio capilar peritubular do rim, o qual é um membro do hormônio do crescimento/família de citocina prolactona (Zhu Y. e 30 D'Andrea A.D: (1994) *Curr. Opin. Hematol.* 1: 113-118) é um candidato pro-

missor. Embora EPO fosse primeiramente caracterizada e é agora amplamente conhecida por seu papel como um hormônio hematopoiético, a detecção de EPO e seu receptor (EPOR) no tecido cerebral de roedor e ser humano, assim como em neurônios e astrócitos cultivados expandiu a busca 5 por outros papéis biológicos do EPO.

No cérebro, um sistema EPO parácrino/(Epo-R)₂ existe independentemente do sistema endócrino da eritropoiese adulta; neurônios expressam (Epo-R)₂ e astrócitos produzem EPO (Ruscher et al. (2002) *J. Neurosci.* 22, 10291-301; Prass et al. (2003) *Stroke* 34, 1981-1986). Foi demonstrado *in* 10 *vitro* e *in vivo* que EPO é um potente inibidor da apoptose neuronal induzida por isquemia e hipóxia (Ruscher et al. (2002) *J. Neurosci.* 22, 10291-301; Bernaudin, M., et al. (1999) *J Cereb Blood Flow Metab.* 19: 643-51; Morishita, E., et al. (1997) *Neuroscience*. 76: 105-16). Foi reportado por vários grupos que a adição de EPO em culturas neuronais protege contra a toxicidade 15 do ácido glutâmico e hipóxica (Henn F. A. e Braus D.F. (1999) *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 249: 48-56, Vogeley K. et al. (2000) *Am. J. Psychiatry* 157: 34-39) e reduz a disfunção neurológica em modelos de roedores de isca (Brines M. L. et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 10526-10531 e Bernaudin et al. (1999) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 10: 643-651). 20 Os resultados promissores desses experimentos confirmaram em estudos humanos em que foi demonstrado que a terapia com EPO para apoplexia agudo é segura e deve ser benéfica (Ehrenreich H. et al. (2002) *Mol. Medicine* 8: 495-505) e WO 00/35475 A2. Essas células e propriedades neuroprotetoras mais particulares do EPO levaram a pesquisas adicionais nessa área 25 para substanciar essas descobertas em um teste mais amplo e o uso de EPO é agora proposto em outra indicação assim como incluindo, por exemplo, esquizofrenia (Ehrenreich H et al. (2004) *Molecular Psychiatry* 9: 42-54 e WO 02/20031 A2).

Para a aplicação do EPO prevenir o dano tecidual, a atividade 30 hematopoiética não é geralmente requerida e deve ser prejudicial se grandes quantidades de EPO forem administradas para tratar ou melhorar os efeitos de hipóxia ou de dano tecidual induzido por isquemia. Conseqüente-

mente, têm sido feitas tentativas para criar variantes de EPO, as quais sómente exibam a propriedade protetora celular, porém não as propriedades hematopoiéticas. US 2003/0130197 descreve peptidomiméticos de EPO para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos, os quais não apresentam 5 homologia de seqüência com EPO de ocorrência natural ou fragmentos seus. US 6.531.121 descreve uma asialoeritropoietina a qual é gerada por desialilação completa do EPO recombinante mostrou uma capacidade aumentada de cruzar a barreira da célula endotelial e tinha uma atividade hematopoiética diminuída. Eritropoietina carbamilada (CEPO) também foi demonstrada por exibir um efeito protetor tecidual, porém nenhum efeito eritropoietico (Leist et al. (2004) *Science* 305: 239-242 e WO 2005/025606 A1.

Finalmente, foi demonstrado que um peptídeo de 17-mer de EPO inibiu a morte celular de duas linhagens celulares neuronais, SK-N-MC e NS20Y (Campana W. M. et al (1998) *Int. J. Mol. Medicine* 1: 235-241), enquanto ao mesmo tempo não teve atividade hematopoiética. Entretanto, 1 ng/mL do peptídeo EPO foi necessário para eliciar o mesmo efeito antiapoptótico que 100 pg/mL de EPO recombinante (rhEPO) em células NS20Y e que 400 pg/mL de rhEPO em células SK-N-MC. Dado o peso molecular aparente do rhEPO de cerca de 66.000 g/mol (o peso molecular calculado é de 15 cerca de 33.000 g/mol, mas não inclui o peso dos resíduos de oligossacárido compreendidos no rhEPO) e de cerca de 1.900 g/mol do peptídeo EPO em uma concentração de 1,52 pmol/L e 6,06 pmol/L, respectivamente, de 20 rhEPO e 1 nmol/L do peptídeo EPO eliciaram o mesmo nível de um efeito protetor celular. Conseqüentemente, o peptídeo EPO está entre 650 vezes e 25 165 vezes menos ativo do que o do rhEPO na prevenção da morte celular. É evidente a partir desses dados que a região do EPO compreendida no 17-mer não desempenha um papel principal na função protetora celular do EPO. Conseqüentemente, todas as variantes de EPO, as quais têm uma atividade hematopoiética diminuída conhecida na técnica anterior, sofrem da 30 desvantagem de que elas não são de ocorrência natural, uma vez que elas ou perderam sua glicosilação natural ou elas são mutilações artificiais e/ou elas diminuíram vastamente a atividade protetora celular, em comparação

com o rhEPO. Conseqüentemente, existe uma necessidade na técnica anterior de proporcionar um derivado de EPO, o qual é próximo ao EPO de ocorrência natural e o qual tem uma atividade protetora tecidual igual ou melhor que o rhEPO, mas com menos ou sem hematopoiética, particularmente sem 5 atividade eritropoiética.

Esse problema é solucionado pela provisão de novas variantes EPO, as quais foram descobertas como ocorrendo naturalmente no tecido humano e de camundongo (cérebro, rim) e as quais exibem uma atividade protetora celular semelhante ou melhor ao rhEPO, mas as quais não exibem 10 qualquer atividade hematopoiética significativa.

Sumário da invenção

Em um aspecto, a presente invenção diz respeito com uma variante de EPO que codifica o polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:

- 15 (a) polinucleotídeos codificando pelo menos a forma madura dos polipeptídeos nomeados como hs3, h1-4, h1-5, hs4, h1-1, h2-l, mS, mG3, mG5, m301 e mK3 com a seqüência de aminoácidos deduzida conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22, respectivamente;
- 20 (b) polinucleotídeos com a seqüência codificadora, conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 codificando pelo menos a forma madura do polipeptídeo;
- 25 (c) polinucleotídeo codificando uma versão humanizada dos polipeptídeos mS, mG3, mG5, m301 e mK3 com a seqüência de aminoácidos deduzida conforme mostrado na SEQ ID NOs: 14, 16, 18, 20 e 22,
- 30 (d) polinucleotídeos codificando um polipeptídeo compreendendo uma fusão de uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo de seqüências de aminoácidos conforme mostrado na SEQ ID NO: 24, 26, 28 e 30, no N-terminal de uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo de seqüências de aminoácidos conforme mostrado na SEQ ID NO: 32, 34, 36 e 38;
- (e) polinucleotídeos compreendendo uma fusão de seqüências

de polinucleotídeo selecionados do grupo de seqüências de polinucleotídeo conforme mostrado na SEQ ID NO: 23, 25, 27 e 29, 5' de uma seqüência de polinucleotídeo selecionada do grupo de seqüências de polinucleotídeo conforme mostrado na SEQ ID NO: 31, 33, 35 e 37;

5 (f) polinucleotídeos codificando um derivado de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a) até (e), em que no referido derivado entre 1 e 10 resíduos de aminoácidos são conservativamente substituídos em comparação com o referido polipeptídeo, e o referido derivado tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, 10 mas essencialmente não tem atividade hematopoiética;

15 (g) polinucleotídeos que codificam um fragmento de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a) até (f), em que no referido fragmento entre 1 e 10 resíduos de aminoácidos são N- e/ou C-terminalmente anulados e/ou entre 1 e 10 aminoácidos são anulados N- e/ou C-terminalmente da junção em comparação com o referido polipeptídeo, e o referido fragmento tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;

20 (h) polinucleotídeos os quais são pelo menos 50% idênticos a um polinucleotídeo, conforme definido em qualquer um de (a) a (g) e os quais codificam para um polipeptídeo com atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética; e

25 (i) polinucleotídeos, o filamento complementar dos quais hibridizam sob condições estringentes com um polinucleotídeo conforme definido em qualquer um de (a) até (h), e os quais codificam para um polipeptídeo com atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;

Ou o filamento complementar de tal polinucleotídeo.

Outro aspecto da presente invenção é um homólogo de um polinucleotídeo que codifica uma variante de eritropoietina (EPO) de outra espécie eucariótica superior.

Outro aspecto da presente invenção é uma variante EPO que

codifica um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:

(a) polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo variante E-PO, os quais compreendem a parte N-terminal do EPO de comprimento total incluindo a hélice A, e os quais não têm pelo menos um dos seguintes:

5 (i) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos, preferivelmente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 aminoácidos entre a hélice A e a hélice B;

10 (ii) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos, preferivelmente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 aminoácidos da hélice B;

15 (iii) um fragmento de pelo menos 2 aminoácidos, preferivelmente 3, 4, 5 ou 6 aminoácidos entre a hélice B e a hélice C;

(iv) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos, preferivelmente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 ou 23 aminoácidos da hélice C;

20 (v) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos, preferivelmente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 ou 27 aminoácidos entre as hélices C e D; e/ou

(vi) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos, preferivelmente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22 da hélice D;

25 em que o referido variante tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética.

(b) polinucleotídeos que codificam um derivado de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a), em que no referido derivado entre 1 e 10 resíduos de aminoácidos são conservativamente substituídos em comparação com o referido polipeptídeo, e o referido derivado tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;

30 (c) polinucleotídeos, o filamento complementar dos quais hibridiza sob condições estringentes para um polinucleotídeo conforme definido em qualquer um de (a) até (b) e o qual codifica para um polipeptídeo com atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencial-

almente sem atividade hematopoiética;

ou o filamento complementar de tal polinucleotídeo.

Em um aspecto preferido, o polinucleotídeo da presente invenção o qual é DNA, DNA genômico ou RNA.

5 Em outro aspecto, a presente invenção diz respeito a um vetor contendo o polinucleotídeo da presente invenção. É preferível que o polinucleotídeo contido no vetor esteja operativamente ligado às seqüências de controle de expressão que permitem a expressão nas células hospedeiras procarióticas e/ou eucarióticas.

10 Outro aspecto da invenção é uma célula hospedeira geneticamente projetada com o polinucleotídeo da presente invenção ou com o vetor da presente invenção.

15 Outro aspecto da invenção é um animal não-humano transgênico contendo um polinucleotídeo da presente invenção, um vetor da presente invenção e/ou uma célula hospedeira da presente invenção.

Outro aspecto da invenção é um processo para produzir um polipeptídeo variante de EPO codificado pelo polinucleotídeo da presente invenção compreendendo: o cultivo da célula hospedeira da presente invenção e a recuperação do polipeptídeo codificado pelo referido polinucleotídeo.

20 Em uma modalidade preferida, o processo da presente invenção, compreende ainda a etapa de modificar a referida variante de EPO, em que a modificação é selecionada do grupo consistindo em oxidação, sulfatação, fosforilação, adição de oligossacarídeos ou combinações destes.

25 Outro aspecto da invenção é um processo para produzir células capazes de expressar pelo menos uma das variantes EPO compreendendo células geneticamente projetadas *in vitro* com o vetor da invenção, em que a(s) referida(s) variante(s) de EPO é/são codificadas por um polinucleotídeo da invenção.

Outro aspecto da invenção é um polipeptídeo com a seqüência de aminoácidos codificada por um polinucleotídeo da presente invenção ou obtidível pelo processo da presente invenção.

Outro aspecto da invenção é um anticorpo que se liga especificamente

camamente ao polipeptídeo da presente invenção.

Outro aspecto da invenção é uma composição farmacêutica compreendendo um polinucleotídeo da presente invenção, um vetor da presente invenção, uma célula hospedeira da presente invenção, um polipeptídeo da presente invenção e/ou um anticorpo da presente invenção e um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis.

Outro aspecto da invenção é o uso de um polinucleotídeo da presente invenção, um vetor da presente invenção, uma célula hospedeira da presente invenção, um polipeptídeo da presente invenção para a produção de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma condição associada com o dano tecidual devido à morte celular, por exemplo, apoptose e necrose, assim como por inflamação.

Em um uso preferido da presente invenção, a morte celular é induzida por isquemia, hipóxia, infecção bacteriana, infecção viral, induzida auto-imunológica, traumática ou quimicamente (por exemplo, metabólica, toxicamente), ou induzida por radiação.

Em um uso preferido da presente invenção, a condição é um distúrbio neurodegenerativo/neuroinflamatório agudo ou um distúrbio neurodegenerativo/neuroinflamatório crônico, é um distúrbio agudo ou crônico do coração (por exemplo, enfarte do miocárdio), pulmão (por exemplo, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, rim (glomerulonefrite), fígado (por exemplo, falência hepática crônica) ou pâncreas (por exemplo, pancreatite) ou a referida condição está associada com um órgão (por exemplo, rim ou fígado) ou transplante de célula (por exemplo, célula tronco).

Preferivelmente, o distúrbio neurodegenerativo e/ou neuroinflamatório agudo é selecionado do grupo consistindo em enfarte ou isquemia cerebral incluindo oclusão embólica e oclusão trombótica, reperfusão seguido de isquemia aguda, injúria hipóxica-isquêmica perinatal, parada cardíaca, hemorragia intracranial, hemorragia subaracnóide e lesões intracranianas (por exemplo, trauma do SNC), lesões da medula espinal lesões intravertebrais, síndrome de criança sacudida ("whiplash shaken infant syndrome"), encefalite infecciosa (por exemplo, encefalite por herpes), meningite (por

exemplo, bacteriana)dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca).

Preferivelmente, o distúrbio neurodegenerativo/neuroinflamatório crônico é selecionado do grupo consistindo em demências (por exemplo, doença de Alzheimer, demências vasculares), doença de Pick, doença do corpo de Lewy difuso, paralisia supranuclear progressiva (síndrome de Steele-Richardson), esclerose múltipla, atrofia sistêmica múltipla (incluindo a síndrome de Shy-Drager), condições epilépticas crônicas associadas com neurodegeneração, doenças neuronais motoras, ataxias degenerativas, degeneração basal cortical, complexo de Guam-Parkinson-demência-SLA, panencefalite esclerosante subaguda, doença de Huntington, doença de Parkinson, sinucleinopatias, afasia progressiva primária, degeneração estriatonigral, doença de Machado/Joseph/ataxia espinocerebelar tipo 3 e degenerações olivopontocerebelares, doença de Gilles de La Tourette, paralisia bulbar e pseudobulbar, atrofia muscular espinal e espinobulbar (doença de Kennedy), esclerose lateral primária, paraplegia espástica familiar, doença de Werdnig-Hoffman, doença de Kugelberg-Welander, doença de Tay-Sach, doença de Sandhoff, doença espástica familiar, paraparesse espástica, leucoencefalopatia multifocal progressiva, disautonomia familiar (síndrome de Riley-Day), polineuropatias (por exemplo, diabética, álcool-tóxica, síndrome Guillain-Barré, polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica), doenças de príon, vício, distúrbios afetivos (por exemplo, depressão), distúrbios esquizofrênicos, síndrome da fadiga crônica, dor crônica (por exemplo, dor nas costas inferiores).

Em um uso preferido da presente invenção, a condição é o envelhecimento.

Em um uso preferido da presente invenção, o medicamento é administrado antes de ou depois do início da referida condição.

Descrição detalhada da invenção

A não ser que seja definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado que os comumente entendidos por uma pessoa versada na técnica para a qual essa invenção pertence. Em caso de conflito, o presente documento, incluindo definições,

irá controlar. Métodos e materiais preferidos são descritos abaixo, embora métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui podem ser usados na prática ou testagem da presente invenção. Todas as publicações, pedidos de patente, patentes e outras referências aqui mencionadas 5 são incorporadas por referência na sua totalidade. Os materiais, métodos e exemplos aqui descritos são somente ilustrativos e não pretendem ser limitantes.

A presente invenção é baseada na surpreendente observação de que variantes de EPO são expressas no tecido neuronal e na determinação 10 de que as variantes protegeram os neurônios de danos induzidos por oxigênio e privação de glicose, mas não apresentaram atividade hematopoiética. Esse comportamento os tornam adequados para uso como terapêuticos em situações onde a função hematopoiética do EPO não é requerida ou prejudicial. De acordo com um primeiro aspecto da presente invenção está 15 uma variante de EPO que codifica polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:

(a) polinucleotídeos que codificam pelo menos a forma madura dos polipeptídeos nomeados hs3, h1-4, h1-5, hs4, h1-1, h2-1, mS, mG3, 20 mG5, m301 e mK3 com a seqüência de aminoácidos deduzida conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22, respectivamente;

(b) polinucleotídeos com a seqüência codificante, conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21, codificando pelo menos a forma madura do polipeptídeo;

25 (c) polinucleotídeo que codifica uma versão humanizada dos polipeptídeos mS, mG3, mG5, m301 e mK3 com a seqüência de aminoácidos deduzida conforme mostrado nas SEQ ID Nos: 14, 16, 18, 20 e 22,

(d) polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo compreendendo uma fusão de uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo 30 de seqüências de aminoácidos conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 24, 26, 28 e 30, no N-terminal, preferivelmente diretamente, isto é, sem quaisquer aminoácidos intervenientes, de uma seqüência de aminoácidos selecionada

do grupo de seqüências de aminoácidos conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 32, 34, 36 e 38;

5 (e) polinucleotídeos compreendendo uma fusão de seqüências de polinucleotídeo selecionadas do grupo de seqüências de polinucleotídeo conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 23, 25, 27 e 29, 5', preferivelmente diretamente 5', isto é, sem quaisquer polinucleotídeos intervenientes, de uma seqüência de polinucleotídeo selecionada do grupo de seqüências de polinucleotídeo conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 31, 33, 35 e 37;

10 (f) polinucleotídeos que codificam um derivado de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a) a (e), em que no referido derivado entre 1 e 10 resíduos de aminoácidos são conservativamente substituídos em comparação com o referido polipeptídeo, e o referido derivado tem atividade celular protetora e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;

15 (g) polinucleotídeos que codificam um fragmento de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a) até (f), em que no referido fragmento entre 1 e 10 resíduos de aminoácidos são N- e/ou C-terminalmente anulados e/ou entre 1 e 10 aminoácidos são anulados N- e/ou C-terminalmente da junção em comparação com o referido polipeptídeo, e o referido fragmento tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente não tem atividade hematopoiética;

20 (h) polinucleotídeos os quais são pelo menos 50% idênticos a um polinucleotídeo conforme definido em qualquer um de (a) até (g) e os quais codificam para um polipeptídeo com atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética; e

25 (i) polinucleotídeos, o filamento complementar dos quais hibridiza sob condições estringentes em um polinucleotídeo conforme definido em qualquer um de (a) até (h) e o qual codifica para um polipeptídeo com atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;

30 ou o filamento complementar de tal polinucleotídeo.

A invenção refere-se ainda a um peptídeo de uma variante EPO que codifica um polipeptídeo selecionado do grupo consistindo em:

- (a) polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos nomeados seqüências ha, hAma, hAme, ha-20 e ha- de transporte, com a seqüência de 5 aminoácido deduzida conforme mostrado nas SEQ ID NOS: 50, 51, 52, 53 e 60, respectivamente;
- (b) polinucleotídeos com a seqüência codificadora, conforme mostrado nas SEQ ID NOS: 55, 56, 57 58 e 61 codificam pelo menos a forma madura do polipeptídeo;
- 10 (c) polinucleotídeos que codificam um derivado de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a) a (b), em que no referido derivado entre 1 e 10 resíduos de aminoácidos são conservativamente substituídos em comparação com o referido polipeptídeo, e o referido derivado tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;
- 15 (d) polinucleotídeos codificando um fragmento de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a) a (b), em que no referido fragmento entre 1 e 10 resíduos de aminoácidos são N- e/ou C-terminalmente anulados e/ou entre 1 e 10 aminoácidos são anulados N- e/ou C-terminalmente da junção em comparação com o referido polipeptídeo, e o fragmento derivado tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;
- 20 (e) polinucleotídeos, os quais são pelo menos 50% idênticos a um polinucleotídeo conforme definido em qualquer um de (a) a (b), e os quais codificam para um polipeptídeo com atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética; e
- 25 (f) polinucleotídeos, o filamento complementar do qual hibridiza sob condições estringentes para um nucleotídeo conforme definido em qualquer um de (a) a (h), e os quais codificam para um polipeptídeo com atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;

ou o filamento complementar de tal polinucleotídeo.

Em um outro aspecto, os polinucleotídeos da presente invenção compreendem homólogos das variantes EPO da presente invenção derivados de outra espécie eucariótica superior, particularmente de mamíferos, 5 mais preferivelmente de primatas não-humanos; de roedores, por exemplo, rato ou porquinho-da-índia; ruminante, por exemplo, vaca; ou ovelha; cavalo; porco; coelho; cachorro; ou gato, os quais têm atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoietica. Nesse contexto, o termo homólogo refere-se a um polinucleotídeo 10 codificando uma variante EPO derivada de outra espécie, a qual compreende essencialmente a mesma anulação que os polinucleotídeos de acordo com as SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 55, 56, 57, 58 ou 61. Uma anulação de um polinucleotídeo é considerada como sendo essencialmente a mesma, se ela envolver a anulação de polinucleotídeos codificando um polipeptídeo, o qual seja homólogo aos polipeptídeos respectivamente anulados nos polipeptídeos da variante EPO de acordo com as SEQ 15 ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 50, 51, 52, 53 ou 60. Os critérios para determinar a homologia entre duas seqüências de peptídeos são bem-estabelecidos. Para esse propósito, programas como BLASTP podem 20 ser usados. Uma anulação é ainda considerada como sendo essencialmente a mesma se ela envolver 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 55, 56, 57, 58 ou 61 mais ou menos nucleotídeos que a respectiva anulação nas SEQ ID Nos: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, ou 21, as quais também são representadas na 25 figura 1 e 2.

Outro aspecto da presente invenção é uma variante EPO que codifica um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:

- (a) polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo variante de EPO, o qual compreende a parte N-terminal do comprimento total do EPO, 30 incluindo a hélice A a qual não tem pelo menos um dos seguintes:
 - (i) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos, preferivelmente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 aminoácidos entre a hélice A e a hé-

lice B;

(ii) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos, preferivelmente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 aminoácidos da hélice B;

5 (iii) um fragmento de pelo menos 2 aminoácidos, preferivelmente 3, 4, 5 ou 6 aminoácidos entre a hélice B e a hélice C;

(iv) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos, preferivelmente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 ou 23 aminoácidos de hélice C;

10 (v) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos, preferivelmente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 ou 27 aminoácidos entre as hélices C e D; e/ou

(vi) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos, preferivelmente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, ou 22 de hélice D;

15 em que a referida variante tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética.

(b) polinucleotídeos codificando um derivado de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a), em que no referido derivado entre 1 e 10 resíduos de aminoácidos são conservativamente substituídos em comparação com o referido polipeptídeo, e o referido derivado tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;

20 (c) polinucleotídeos, o filamento complementar do qual hibridiza sob condições estringentes para um polinucleotídeo conforme definido em qualquer um de (a) a (b), e o qual codifica para um polipeptídeo com atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;

ou o filamento complementar de tal polinucleotídeo.

Nesse contexto, a hélice A, B, C e D do polipeptídeo EPO são regiões homólogas às respectivas regiões da hélice A, B, C e D do EPO de comprimento total de camundongo e humano conforme delineado na figura 4. É bem-conhecido na técnica como determinar homologias entre duas se-

qüências de polipeptídeos e alguém versado na técnica será capaz de alinhar uma dada seqüência de polipeptídeo EPO derivada, por exemplo, de outra espécie, e de determinar a respectiva posição da hélice A, B, C e D nesse polipeptídeo EPO. É preferível que o polinucleotídeo variante do EPO seja derivado de um eucarioto superior, particularmente de um mamífero ou pássaro. Mamíferos preferidos são seres humanos, primatas não-humanos; roedores, por exemplo, rato ou porquinho-da-índia; ruminante, por exemplo, vaca; ou ovelha; cavalo; porco; coelho; cachorro; ou gato. Um grande número de tais polinucleotídeos que codificam EPO de comprimento total de várias espécies é conhecido, incluindo sem limitação gato (Acesso Gene Bank L10606), porco (Acesso Gene Bank 10607), ovelha (Acesso Gene Bank 10610), cachorro (Acesso Gene Bank L13027), macaco (Acesso Gene Bank M18189), macaco resus (Acesso Gene Bank L10609), camundongo (Acesso Gene Bank 12930), rato (Acesso Gene Bank L10608), humano (Acesso Gene Bank M11319), Bos taurus (Acesso Gene Bank U44762) e Bos indicus (Acesso Gene Bank L41354).

Preferivelmente, os polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo variante de EPO não têm o seguinte: (i); (ii); (iii); (iv); (v); (vi); (i) e (ii); (i) e (iii); (i) e (iv); (i) e (v); (i) e (vi); (ii) e (iii); (ii) e (iv); (ii) e (v); (ii) e (vi); (iii) e (iv); (iii) e (v); (iii) e (vi); (iv) e (v); (iv) e (vi); (v) e (vi); (i), (ii) e (iii); (i), (ii) e (iv), (i), (ii) e (v), (i), (ii), (vi), (i), (iii) e (iv); (i), (iii) e (v); (i), (iii) e (vi); (i), (iv) e (v); (i), (iv) e (vi); (i), (v) e (vi); (ii), (iii) e (iv); (ii), (iii) e (v); (ii), (iii) e (vi); (ii), (iv) e (v); (ii), (iv) e (vi); (ii), (v) e (vi); (iii), (iv) e (v); (iii), (iv) e (vi); (iii), (v) e (vi); ou (iv), (v) e (vi).

Um polipeptídeo que exibe atividade protetora celular é um polipeptídeo que tem pelo menos 50% (por exemplo, pelo menos: 55%; 60%; 65%; 70%; 75%; 80%; 85%; 90%; 95%; 98%; 99%; 99,5%; ou 100% ou mesmo mais) da capacidade do respectivo variante de EPO de proteger os neurônios de danos por apoptose, em que a apoptose é induzida por oxigênio ou privação de glicose, por exposição química ou radioativa ou por infecção viral ou bacteriana. Ensaios para determinar danos em células, particularmente em células neuronais, são conhecidos na técnica. Um ensaio ade-

quando é o ensaio de privação de glicose oxigênio, conforme descrito aqui abaixo. No ensaio descrito, a leitura para exibição é a quantidade de atividade de lactato desidrogenase (LDH). Entretanto, uma variedade de outros métodos existem, os quais permitem a avaliação dos danos induzidos em 5 uma célula e, particularmente, a quantidade de morte celular (por exemplo, apoptose, necrose). Esses ensaios incluem, sem limitação, ensaios Tunnel, ensaio MTT, ensaio de vida/morte por manchamento (por exemplo, manchamento com brometo de etídio e laranja acridina), ensaio da caspase, microscopia de elétron, corrida de DNA, os quais são bem-conhecidos na técnica.

10 Um polipeptídeo variante do EPO que exibe não essencialmente atividade homeopática é um polipeptídeo, o qual elicia na técnica conhecida os ensaios de formação de colônia, um exemplo do qual é descrito abaixo, na mesma concentração molar que o rhEPO e o wt mEPO, respectivamente, menos do que 10% da CFU-E (unidade de eritroblasto formadora de colônia), preferivelmente menos do que 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, ou 15 1%. As quantidades da CFU-E respectivas são calculadas para um dado rhEPO, wt mEPO ou variante EPO pela subtração de cada valor da quantidade de CFU-E observada em uma reação de controle (sem wt ou variante EPO).

No contexto dos polipeptídeos da presente invenção, o termo 20 "junção" refere-se ao sítio em que dois aminoácidos seguem um ao outro, os quais não são consecutivos no rhEPO ou wt EPO de camundongo, e os quais são potencialmente o resultado de eventos de união ou outros rearranjos no RNAm de EPO. A respectiva junção das variantes EPO da presente invenção pode ser derivada da figura 4, por exemplo, é ENIT | RVGQ para 25 hS3, VGQQ | ALLV para h1-4, VNFY | ALLV para h1-5, KRME | PWEP para hS4, ITVP | GPVG para h1-1, LNEN | NHC para h2-I, KRME | KELM para mS, LLAN | FLRG para mG3, DTFC | RRGD para mG5, KVNF | LRGK para m301 ou LSEA | VHGR para mK3.

As moléculas de polinucleotídeo da invenção podem ser sintetizadas *in vitro* (por exemplo, por síntese baseada em fosforoamidita) ou podem ser obtidas de uma célula, tal como a célula de um mamífero.

As variantes de EPO nomeadas mS, mG3, mG5, m301 e mK3

com a seqüência de aminoácido deduzida conforme mostrado nas SEQ ID NOS: 14, 16, 18, 20 e 22, respectivamente, foram isoladas de camundongo. A seqüência de camundongo é altamente homóloga à seqüência humana. Um alinhamento das seqüências de aminoácido do EPO derivado de seres

5 humanos e camundongo é fornecido na figura 4. Conforme é aparente, a seqüência de camundongo é distinguida da seqüência humana pela falta de um resíduo de alanina na posição 8 e pelas seguintes 39 substituições (a enumeração é de acordo com a respectiva posição de aminoácido no EPO humano, o primeiro aminoácido indicado é o aminoácido humano naquela

10 posição e o segundo é aminoácido de camundongo correspondente): $^4\text{H} \rightarrow ^4\text{P}$, $^6\text{C} \rightarrow ^6\text{R}$, $^9\text{W} \rightarrow ^9\text{T}$; $^{11}\text{W} \rightarrow ^{11}\text{L}$, $^{18}\text{S} \rightarrow ^{18}\text{L}$; $^{19}\text{L} \rightarrow ^{19}\text{I}$; $^{27}\text{G} \rightarrow ^{27}\text{C}$; $^{43}\text{L} \rightarrow ^{43}\text{I}$; $^{52}\text{I} \rightarrow ^{52}\text{V}$; $^{54}\text{T} \rightarrow ^{54}\text{M}$; $^{60}\text{H} \rightarrow ^{60}\text{G}$; $^{61}\text{C} \rightarrow ^{61}\text{P}$, $^{62}\text{S} \rightarrow ^{62}\text{R}$; $^{64}\text{N} \rightarrow ^{64}\text{S}$; $^{84}\text{G} \rightarrow ^{84}\text{E}$; $^{85}\text{Q} \rightarrow ^{85}\text{E}$; $^{95}\text{A} \rightarrow ^{95}\text{S}$; $^{101}\text{V} \rightarrow ^{101}\text{I}$; $^{103}\text{R} \rightarrow ^{103}\text{Q}$; $^{104}\text{G} \rightarrow ^{104}\text{A}$; $^{109}\text{V} \rightarrow ^{109}\text{A}$; $^{115}\text{W} \rightarrow ^{115}\text{P}$; $^{117}\text{P} \rightarrow ^{117}\text{T}$; $^{122}\text{V} \rightarrow ^{122}\text{I}$; $^{126}\text{V} \rightarrow ^{126}\text{I}$; $^{134}\text{T} \rightarrow ^{134}\text{S}$; $^{138}\text{A} \rightarrow ^{138}\text{V}$;

15 $^{145}\text{A} \rightarrow ^{145}\text{L}$; $^{146}\text{I} \rightarrow ^{146}\text{M}$; $^{151}\text{A} \rightarrow ^{151}\text{T}$; $^{152}\text{A} \rightarrow ^{152}\text{T}$; $^{153}\text{S} \rightarrow ^{153}\text{P}$; $^{154}\text{A} \rightarrow ^{154}\text{P}$; $^{160}\text{I} \rightarrow ^{160}\text{L}$; $^{162}\text{A} \rightarrow ^{162}\text{V}$; $^{166}\text{R} \rightarrow ^{166}\text{C}$; $^{173}\text{S} \rightarrow ^{173}\text{A}$; $^{187}\text{A} \rightarrow ^{187}\text{V}$ e $^{190}\text{T} \rightarrow ^{190}\text{R}$.

Um mS, mG3, mG5, m301 ou mK3 humanizado carrega o resíduo de alanina adicional na posição 8 e/ou em um ou mais preferivelmente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 20 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 ou 37 posições da seqüência de aminoácidos humana ao invés da de camundongo. É particularmente preferido que mS, mG3, mG5, m301 e mK3 sejam completamente humanizados, isto é, que todo aminoácido nas posições de equilíbrio delineadas acima, até a extensão deles estarem presentes na respectiva variante, é de seqüência 25 humana ao invés de ser da seqüência de camundongo. É esperado que a humanização das variantes de camundongo vá diminuir quaisquer problemas imunológicos, os quais devem ser encontrados quando do uso no tratamento de seres humanos.

As moléculas de ácido nucléico variante do EPO da invenção 30 podem ser DNA, CDNA, DNA genômico, DNA sintético ou RNA, e podem ser de filamento duplo ou de filamento único, o filamento de sentido ou de anti-sentido. Essas moléculas podem ser produzidas, por exemplo, pela rea-

ção em cadeia da polimerase (PCR) ou geradas por tratamento com uma ou mais endonucleases de restrição. Uma molécula de ácido ribonucléico (RNA) pode ser produzida por transcrição *in vitro*.

As moléculas de polinucleotídeo da invenção podem conter seqüências de ocorrência natural, ou seqüências que diferem daquelas que ocorrem naturalmente mas, devido à degeneração do código genético, codificam o mesmo polipeptídeo, isto é, os polipeptídeos com as SEQ ID NOS: 2, 47, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22. Além disso, essas moléculas de ácido nucléico não estão limitadas às seqüências codificantes, por exemplo, elas podem incluir algumas ou todas as seqüências não-codificantes que se encontram a montante ou a jusante de uma seqüência codificadora.

Além disso, as moléculas de ácido nucléico isoladas da invenção podem englobar segmentos que não são encontrados como tais no estado natural. Dessa forma, a invenção engloba moléculas de ácido nucléico recombinantes incorporadas em um vetor (por exemplo, em um plasmídeo ou vetor viral), ou no genoma de uma célula homóloga (ou o genoma de uma célula homóloga, em uma posição diferente do local cromossomal natural). Moléculas de ácido nucléico recombinantes e seus usos são discutidos adicionalmente abaixo.

Em modalidades preferidas, os polinucleotídeos da presente invenção também compreendem moléculas de ácido nucléico as quais são pelo menos 50%, preferivelmente 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas a: (a) uma molécula de ácido nucléico que codifica o polipeptídeo das SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 50, 51, 52, 53 ou 60 e (b) a seqüência de nucleotídeos das SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 55, 56, 57, 58 ou 61, respectivamente, e os quais apresentam ao mesmo tempo atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética.

A determinação da identidade porcentual entre duas seqüências é conseguida usando o algoritmo matemático de Karlin e Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873- 5877. Tal algoritmo é incorporado nos

programas BLASTN e BLASTP de Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410. Buscas por nucleotídeo BLAST são efetuadas com o programa BLASTN, pontuação = 100, comprimento de palavra = 12, para obter seqüências de nucleotídeos homólogas ao polipeptídeo variante EPO que codifica ácidos nucléicos. Buscas de proteína BLAST são efetuadas com o programa BLASTP, pontuação = 50, comprimento de palavra = 3, para obter seqüências de aminoácidos homólogas ao polipeptídeo variante EPO, respectivamente. Para obter alinhamentos intervalados para propósitos comparativos, gapped BLAST é utilizado conforme descrito em Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402. Ao utilizar os programas BLAST e gapped BLAST, os parâmetros predefinidos dos respectivos programas são usados.

A hibridização também pode ser usada como uma medida de homologia entre duas seqüências de ácidos nucléicos. Uma seqüência de ácidos nucléicos codificando qualquer uma das variantes EPO aqui descritas, ou um derivado ou fragmento seu, pode ser usada como uma sonda de hibridização de acordo com técnicas de hibridização padrão. A hibridização de uma sonda de variante EPO em DNA ou RNA de uma fonte de teste (por exemplo, uma célula de mamífero) é uma indicação da presença do DNA ou RNA relevante do EPO na melhor fonte. As condições de hibridização são conhecidas pelas pessoas versadas na técnica e podem ser encontradas em *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y., 6.3.1-6.3.6, 1991. Condições estringentes são definidas como equivalentes à hibridização em cloreto de sódio/citrato de sódio 6X (SSC) a 45°C, seguido por uma lavagem em 0,2X SSC, SDS 0,1% a 65°C. Ao selecionar uma sonda específica para uma variante carregando uma anulação interna, é preferível que a sonda usada para detectar ácidos nucléicos homólogos sobreponha os limites da anulação, por exemplo, hs3, h1-4, h1-5, hS4, mS, mG3, mG5 ou m301. Em casos onde a união leva a um C-terminal alternado da proteína, por exemplo, h1-1, h2-1 ou mK3 é preferido que a sonda usada para detectar seqüências de DNA homólogas sobreponha os limites entre a seqüência EPO conhecida e o C-terminal alternado. Por exemplo, uma sonda poderia ser

projetada, a qual compreende 10 bases complementares 5' do sítio de união e 10 bases complementares 3' do sítio de união.

Um "DNA isolado" é ou (1) um DNA que contém seqüência não-
idêntica àquela de qualquer seqüência de ocorrência natural, ou (2), no con-
5 texto de um DNA com uma seqüência de ocorrência natural (por exemplo,
um CDNA ou um DNA genômico), um DNA livre de pelo menos um dos ge-
nes que flanqueiam o gene contendo o DNA de interesse no genoma do or-
ganismo no qual o gene contendo o DNA de interesse ocorre naturalmente.
O termo, dessa forma, inclui um DNA recombinante incorporado em um ve-
10 tor, em um plasmídeo autonomicamente replicante ou vírus, ou no DNA ge-
nômico de um procarioto ou eucarioto. O termo também inclui uma molécula
separada tal como um CDNA onde o DNA genômico correspondente tem
ítrons e, consequentemente, uma seqüência diferente; um fragmento ge-
nômico que não tem pelo menos um dos genes flanqueadores; um fragmen-
15 to de CDNA ou DNA genômico produzido pela reação em cadeia da polime-
rase (PCR) e que não tem pelo menos um dos genes flanqueadores; um
fragmento de restrição que não tem pelo menos um dos genes flanqueado-
res; um DNA que codifica uma proteína de ocorrência não-natural tal como
uma proteína d'efusão, muteína ou fragmento de uma dada proteína; e um
20 ácido nucléico o qual é uma variante degenerada de um CDNA ou de um
ácido nucléico de ocorrência natural. Além disso, ele inclui uma seqüência
de nucleotídeos recombinante que é parte de um gene híbrido, isto é, um
gene que codifica uma proteína de fusão de ocorrência não-natural. Será
aparente a partir do precedente que DNA isolado não significa um DNA pre-
25 sente dentre centenas a milhões de outras moléculas de DNA em, por e-
xemplo, bibliotecas de CDNA ou de DNA genômico ou de digestos de restri-
ção de DNA genômico em, por exemplo, uma mistura reacional de digesto
de restrição ou uma fatia de gel eletroforético.

Outro aspecto da presente invenção é um vetor contendo o(s)
30 polinucleotídeo(s) da presente invenção ou uma proteína codificada por um
polinucleotídeo da presente invenção. O termo "vetor" refere-se a uma prote-
ína ou polinucleotídeo ou uma mistura desses a qual é capaz de ser introdu-

zida ou de introduzir as proteínas e/ou ácidos nucléicos compreendidos na célula. É preferível que as proteínas codificadas pelo polinucleotídeo introduzido sejam expressas na célula na introdução do vetor.

Em uma modalidade preferida, o vetor da presente invenção

5 compreende plasmídeos, fagemídeos, fagos, cosmídeos, cromossomos de mamífero artificiais, constructos "knock-out" e "knock-in", vírus, particularmente adenovírus, vírus vaccinia, vírus vaccinia atenuados, vírus pox canário, lentivírus (Chang, L.J. e Gay, E.E. (20001) *Curr. Gene Therap.* 1:237-251), herpes vírus, particularmente vírus herpes simplex (HSV-1, Carlezon,

10 W. A. et al. (2000) *Crit. Rev. Neurobiol.*), baculovírus, retrovírus, vírus adenovírus associado (AAV, Carter, P.J. e Samulski, R.J. (2000) *J. Mol. Med.* 6:17-27), rinovírus, vírus da imunodeficiência humana (HIV), filovírus e versões projetadas suas (ver, por exemplo, Cobinger G. P. et al (2001) *Nat. Biotechnol.* 19:225-30), virossomas, lipossomas de DNA "nus" e partículas revestidas de

15 ácido nucléico, particularmente esferas de ouro. Particularmente preferidos são os vetores virais como vetores adenovirais ou vetores retrovirais (Lindemann et al. (1997) *Mol. Med.* 3:466-76 e Springer et al. (1998) *Mol. Cell.* 2:549-58). Lipossomas são geralmente pequenas vesículas unilamelares ou multilamelares feitas de lipídeos catiônicos, neutros e/ou aniônicos, por exemplo, por tratamento de ultra-som de suspensões lipossomais. O DNA pode, por exemplo, estar ligado ionicamente à superfície dos lipossomas ou internamente encerrado no lipossoma. Misturas de lipídeos adequadas são conhecidas na técnica e compreendem, por exemplo, DOTMA (brometo de 1,2-dioleiloxpropil-3-trimetilamônio) e DPOE (dioleoilfosfatidiletanolamina),

20 os quais ambos têm sido usados em uma variedade de linhagens celulares.

25

Partículas revestidas de ácido nucléico são outro instrumento para a introdução de ácidos nucléicos nas células usando as chamadas "armas de gene", as quais permitem a introdução mecânica de partículas nas células. Preferivelmente, as partículas por si só são inertes, e consequentemente, estão em uma modalidade preferida feita de esferas de ouro.

Em outro aspecto, o polinucleotídeo da presente invenção é operativamente ligado às seqüências de controle de expressão que permitem a

expressão em células hospedeiras procarióticas e/ou eucarióticas. Os elementos regulatórios transcricionais/traducionais referidos acima incluem, mas não estão limitados, a promotores, intensificadores, operadores, silenciadores, repressores e outros elementos induzíveis e não-induzíveis, constitutivos, regulados por ciclo celular e regulados metabolicamente que são conhecidos pelas pessoas versadas na técnica e que direcionam ou, de outra forma, regulam a expressão gênica. Tais elementos regulatórios incluem, mas não estão limitados, a elementos regulatórios que direcionam a expressão constitutiva como, por exemplo, promotores transcritos pela RNA polimerase do tipo III, por exemplo, promotores do gene RNAsn U6 ou RNAsc 7SK, o gene inicial imediato hCMV de citomegalovírus, os promotores inicial ou tardio do SV40 de adenovírus, promotor viral e as seqüências ativadoras derivadas de, por exemplo, NBV, HCV, HSV, HPV, EBV, HTLV, MMTV ou HIV; as quais permitem a expressão induzível como, por exemplo, o promotor CUP-1, o repressor tet, conforme empregado, por exemplo, nos sistemas tet-on e tet-off, o sistema lac, o sistema trp; elementos regulatórios direcionando a expressão tecido-específica, preferivelmente a expressão específica de célula nervosa, por exemplo, promotor (por exemplo, Thy-1.2, NSE, cadeia leve de miosina II, tirosina hidroxilase, promotor CaMKIIalfa, cadeia beta do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), dopamina beta hidroxilase, Tau, elementos regulatórios (por exemplo, NRSE/RE-1; elemento silenciador neurônio-restritivo/elemento repressor 1) direcionando a expressão específica do ciclo celular como, por exemplo, cdc2, cdc25C ou ciclina A; ou o sistema TAC, o sistema TRC, as principais regiões operadora e promotora do fago A, as regiões de controle da proteína revestida fd, o promotor da 3-fosfoglicerato quinase, os promotores da fosfatase ácida e os promotores dos fatores de emparelhamento α - ou α - de levedura.

Conforme aqui utilizado, "operativamente ligado" significa incorporado em um constructo genético de forma que as seqüências de controle de expressão eficaz controlam a expressão de uma seqüência codificadora de interesse.

Semelhantemente, os polinucleotídeos da presente invenção

podem formar parte de um gene híbrido que codifica seqüências de polipeptídeo adicionais, por exemplo, uma seqüência a qual codifica uma proteína que funciona como um marcador ou repórter. O gene híbrido pode levar a uma proteína de fusão ou as duas ou mais partes podem ser separadas por 5 sítios de entrada ribossomais internos (IRES), os quais levam à expressão de duas ou mais proteínas separadas. Exemplos de genes marcador e repórter incluem da β -lactamase, cloranfenicol acetiltransferase, (CAT), adenosa desaminase (ADA), aminoglicosídeo fosfotransferase (neo^r, G418^r), diidrofolato redutase (DHFR), higromicina-B-fosfotransferase (HPH), timidina 10 quinase (TK), lacZ (codificando a β -galactosidase), proteína fluorescente verde (GFP) e variantes suas e xantina guanina fosforibosiltransferase (XGPRT). Como com muitos dos procedimentos padrão associados com a prática da invenção, artesãos versados estarão informados dos reagentes úteis adicionais, por exemplo, seqüências adicionais que podem servir a função 15 de um marcador ou repórter. Se a expressão do gene híbrido leva a um polipeptídeo, o polipeptídeo híbrido irá geralmente incluir uma primeira porção e uma segunda porção; a primeira porção sendo um polipeptídeo variante EPO e a segunda porção sendo, por exemplo, o repórter descrito acima de uma região constante de Ig ou parte de uma região constante Ig, por exemplo, 20 os domínios CH2 e CH3 da cadeia pesada de IgG2. Outros híbridos poderiam incluir uma seqüência de peptídeo heteróloga para facilitar a purificação e/ou detecção, por exemplo, de um sinalizador antigênico como, por exemplo, um sinalizador myc, ou um sinalizador com ligação preferencial a uma região, por exemplo, taq de quitina ou sinalizador His. Moléculas de 25 ácido nucléico recombinantes também podem conter uma seqüência de polinucleotídeo codificando um polipeptídeo variante EPO operativamente ligado a uma seqüência de sinal heteróloga. Tais seqüências de sinal podem direcionar a proteína para diferentes compartimentos na célula e são bem-conhecidas por alguém versado na técnica. Uma seqüência de sinalização preferida é uma seqüência que facilita a secreção da proteína resultante. Preferivelmente, essas seqüências de sinalização e/ou taq são projetadas de 30 forma que elas possam ser clivadas da variante EPO depois da purificação

para proporcionar uma proteína essencialmente pura sem dois muitos aminoácidos , preferivelmente não mais do que 10 aminoácidos adicionais para o EPO final. Tais sítios de clivagem são bem-conhecidos na técnica e compreendem, por exemplo, sítios de clivagem de endopeptidase e sítios de clivagem de inteína.

Outro aspecto da presente invenção é uma célula hospedeira geneticamente projetada com o polinucleotídeo ou o vetor conforme delineado acima. As células hospedeiras que podem ser usadas para propósitos da invenção incluem, mas não estão limitadas, a células procarióticas tais como bactérias (por exemplo, *E. coli* e *B. subtilis*), as quais podem ser transformadas com, por exemplo, vetores de expressão de DNA de cosmídeo, DNA bacteriófago recombinante ou DNA de plasmídeo contendo as moléculas de polinucleotídeo da invenção; células eucarióticas simples como levedura (por exemplo, *Saccharomyces* e *Pichia*), as quais podem ser transformadas com, por exemplo, vetores de expressão de levedura recombinantes contendo a molécula de polinucleotídeo da invenção; sistemas de célula de inseto como, por exemplo, células Sf9 ou Hi5, as quais podem ser infectadas com, por exemplo, vetores de expressão de vírus recombinante (por exemplo, baculovírus) contendo as moléculas de polinucleotídeo da invenção; oócitos *Xenopus*, os quais podem ser injetados com, por exemplo, plasmídeos; sistemas de célula vegetal, os quais podem ser infectados com, por exemplo, vetores de expressão de vírus recombinantes (por exemplo, vírus mosaico de couve-flor (CaMV) ou vírus mosaico de tabaco (TMV)) ou transformados com vetores de expressão de plasmídeo recombinantes (por exemplo, plasmídeo Ti) contendo uma seqüência de nucleotídeo variante EPO; ou sistemas de célula de mamífero (por exemplo, células COS, CHO, BHK, HEK293, VERO, HeLa, MDCK, Wi38, Swiss 3T3 e NIH 3T3) as quais podem ser transformadas com constructos de expressão recombinantes contendo, por exemplo, promotores derivados, por exemplo, do genoma de células de mamíferos (por exemplo, o promotor de metalotioneína) de vírus mamífero (por exemplo, o promotor tardio de adenovírus, CMV IE e o promotor 7,5K do vírus vaccinia) ou de células bacterianas (por exemplo, a ligação do repressor tet

é empregada nos sistemas tet-on e tet-off). Também úteis como células hospedeiras são as células primárias ou secundárias obtidas diretamente de um mamífero e transfectadas co um vetor de plasmídeo ou infectadas com um vetor viral. Dependendo da célula hospedeira e do respectivo vetor usa-

5 do para introduzir o polinucleotídeo da invenção o polinucleotídeo pode integrar, por exemplo, no cromossomo ou no DNA mitocondrial ou pode ser mantido extracromossomalmente como, por exemplo, episomalmente ou pode estar somente temporariamente compreendido nas células.

Uma vez que o EPO é altamente glicosilado *in vivo*, é desejável
10 escolher um sistema de expressão, o qual proporcione a glicosilação fiel da proteína. Conseqüentemente, é preferível introduzir os polinucleotídeos que codificam variantes de partes do EPO da presente invenção em células eucarióticas superiores, particularmente em células de mamífero, por exemplo, células COS, CHO, BHK, HEK293, VERO, HeLa, MDCK, Wi38, Swiss 3T3
15 ou NIH 3T3.

Outro aspecto da presente invenção é um animal não-humano transgênico contendo um polinucleotídeo, um vetor e/ou uma célula hospedeira conforme descrito acima. O animal pode ser um animal mosaico, o que significa que somente parte das células compõe o corpo compreendem
20 polinucleotídeos, vetores e/ou células da presente invenção ou o animal pode ser um animal transgênico o que significa que todas as células do animal compreendem os polinucleotídeos e/ou vetores da presente invenção ou são derivadas de uma célula da presente invenção. Animais mosaicos ou transgênicos podem ser ou homo- ou heterozigóticos, em relação aos polinucleotídeos da presente invenção contidos na célula. Em uma modalidade preferida, os animais transgênicos são ou animais "knock-out" ou "knock-in" homo- ou heterozigóticos com relação aos genes os quais codificam para as proteínas da presente invenção. Os animais podem, em princípio, ser qualquer animal, preferivelmente, entretanto, ele é um mamífero, selecionado do grupo
25 de primatas não-humanos, cavalo, bovino, ovelha, cabra, porco, cachorro, gato, bode, coelho, camundongo, rato, porquinho-da-índia, hámster ou gerbo.

Outro aspecto da presente invenção é um processo para produ-

zir um polipeptídeo variante EPO codificado por um polinucleotídeo da presente invenção compreendendo: o cultivo da célula hospedeira descrita acima e a recuperação do polipeptídeo codificado pelo referido polinucleotídeo. Combinações preferidas de células hospedeiras e vetores são delineadas 5 acima e a combinação adicional será prontamente aparente para alguém versado na técnica. Dependendo do uso posterior tencionado do peptídeo recuperado, um tipo celular adequado pode ser escolhido. Conforme delineado acima, células eucarióticas são preferivelmente escolhidas, se for desejado que as proteínas produzidas pelas células exibam um padrão essencialmente natural de glicosilação e células procarióticas são escolhidas se, por exemplo, glicosilação ou outras modificações, as quais são normalmente introduzidas nas proteínas somente em células eucarióticas, não forem desejadas ou necessárias.

É conhecido na técnica anterior que a farmacocinética dos fármacos de proteína pode ser significativamente alterada por modificação da proteína. Para EPO de comprimento total, foi descrito que a glicosilação, particularmente a presença de resíduos de ácido siálico no final das cadeias laterais de oligossacarídeo, atribui para o tempo de circulação (WO 95/05465) e que a remoção dos grupos de ácido siálico expõe os resíduos 10 de galactose, o que aumenta a depuração pelo fígado. Conseqüentemente, uma tentativa tomada para aumentar o tempo de circulação do EPO foi o aumento nos resíduos de ácido siálico. Várias tentativas, dessa forma, envolvem o fornecimento de sítios de glicosilação adicionais (ver, por exemplo, WO 91/05867, WO 94/09257 e WO 01/81405). Tais análogos de EPO modificados 15 podem ter pelo menos uma cadeia de carboidrato N-ligada ou O-ligada adicional. Outras tentativas de aumentar a meia-vida do EPO envolvem a adição de resíduos de polietilenoglicol (PEG) de comprimento de estrutura de aminoácido variada (ver, por exemplo, WO 00/32772, WO 01/02017, WO 03/029291). Outra tentativa usou a modificação de moléculas 20 EPO com pelo menos um oligossacarídeo N-ligado ou O-ligado, as quais foram ainda modificadas por oxidação, sulfatação, fosforilação PEGilação ou uma combinação destes (ver WO 2005/025606). Todas essas tentativas po-

dem ser igualmente empregadas para estender a meia vida das variantes EPO da presente invenção e, concordantemente, em uma modalidade preferida acima, o processo compreendendo ainda a etapa de modificação da variante EPO, em que a modificação é selecionada do grupo consistindo em 5 oxidação, sulfatação, fosforilação, adição de oligossacarídeos ou combinações destes. Se a adição de outros oligonucleotídeos N-ligados ou O-ligados for desejada, é possível introduzi-las pela introdução de sítios de glicosilação adicionais conforme tem sido descrito na técnica anterior, por exemplo, nas posições 30, 51, 57, 69, 88, 89, 136 e/ou 138, se a respectiva posição estiver 10 presente na variante da presente invenção (ver WO 01/81405).

Outro aspecto da invenção é um processo para produzir células capazes de expressar pelo menos uma das variantes EPO compreendendo células geneticamente projetadas *in vitro* com o vetor da reivindicação 3 ou 15 4, em que o(s) referido(s) polipeptídeo(s) variante(s) é(são) codificado(s) por um polinucleotídeo da presente invenção.

Outro aspecto da invenção é um polipeptídeo com a seqüência de aminoácidos codificada por um polinucleotídeo da invenção ou obtêvel pelo processo mencionado acima. Os polipeptídeos da invenção incluem todos aqueles descritos aqui e fragmentos desses polipeptídeos, os quais 20 carregam entre anulações 1 e 10N- e/ou C-terminais. Preferivelmente, as anulações são de menos de 10, menos de 9, menos de 8, menos de 7, menos de 6, menos de 5, menos de 4, menos de 3, menos de 2 ou menos de 1 aminoácido. Os polipeptídeos embarcados pela invenção também incluem proteínas de fusão que contêm ou a variante da porção EPO conforme indicado nas SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22 ou a versão 25 humanizada de 14, 16, 18, 20 e 22 ou um fragmento seu conforme definido acima fundido com uma seqüência de aminoácido não-relacionada. As seqüências não-relacionadas podem compreender domínios funcionais adicionais ou peptídeos de sinalização. Peptídeos de sinalização estão descritos 30 em maiores detalhes e exemplificados abaixo.

Os polipeptídeos podem ser qualquer um daqueles descritos acima, mas com não mais do que 10 (por exemplo, não mais do que: 10,

nove, oito, sete, seis, cinco, quatro, três, dois ou uma) substituições conservativas. Substituições conservativas são conhecidas na técnica e tipicamente incluem a substituição de, por exemplo, um aminoácido polar com outro aminoácido polar e um aminoácido ácido com outro aminoácido ácido. Con-

5 cordantemente, substituições conservativas preferivelmente incluem substituições com os seguintes grupos de aminoácidos: glicina, alanina, valina, prolina, isoleucina e leucina (cadeia lateral alifática, não-polar); ácido aspártico e ácido glutâmico (cadeia lateral negativamente carregada); asparagina, glutamina, metionina, cisteína, serina e treonina (cadeia lateral polar não-

10 carregada); lisina, histidina e arginina; e fenilalanina, triptofano e tirosina (cadeia lateral aromática); e lisina, arginina e histidina (cadeia lateral positivamente carregada). É bem-conhecido na técnica como determinar o efeito de uma dada substituição, por exemplo, no pK_1 , etc. Tudo o que é requerido de um polipeptídeo com uma ou mais substituições conservativas é que ele

15 tenha pelo menos 50% (por exemplo, pelo menos: 55%; 60%; 65%, 70%; 75%; 80%; 85%; 90%; 95%; 98%; 99%; 99,5%; ou 100% ou mais) da capacidade da variante EPO inalterada de proteger os neurônios de dano/morte celular (por exemplo, por apoptose ou necrose), em que a morte celular é induzida por privação de oxigênio e/ou glicose, por exposição tóxica, quími-

20 ca, física, mecânica, inflamatória ou de radiação ou por infecção viral ou bacteriana.

Tanto polipeptídeos quanto peptídeos podem ser produzidos por técnicas de DNA recombinante *in vitro* padrão e transgênese *in vivo*, usando seqüências de nucleotídeos codificando os polipeptídeos ou peptídeos apropriados. Métodos bem-conhecidos por aqueles versados na técnica podem ser usados para construir vetores de expressão contendo seqüências codificantes relevantes e sinais de controle de transcrição/tradução apropriados. Ver, por exemplo, as técnicas descritas em Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2^ª Ed.) [Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y., 25 1989] e Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* [Green Publishing Associates e Wiley Interscience, N.Y., 1989].

Polipeptídeos e fragmentos da invenção também incluem aque-

les descritos acima, porém modificados para uso *in vivo* pela adição, nas extremidades amino- e/ou carbóxi-terminais, de agentes e bloqueio para facilitar a sobrevivência do polipeptídeo relevante *in vivo*. Isso pode ser útil naquelas situações nas quais o peptídeo terminal tende a ser degradado 5 pelas proteases antes da absorção celular. Tais agentes bloqueadores podem incluir, sem limitação, seqüências peptídicas relacionadas ou não-relacionadas adicionais que podem ser ligadas aos resíduos amino e carbóxi-terminais do peptídeo a ser administrado. Isso pode ser feito ou quimicamente durante a síntese do peptídeo ou por tecnologia do DNA recombinante 10 por métodos familiares aos artesãos de habilidade mediana.

Alternativamente, agentes bloqueadores, tais como ácido piroglutâmico ou outras moléculas conhecidas na técnica podem ser ligadas aos resíduos amino- e carbóxi-terminais, ou o grupo amino no amino terminal ou o grupo carboxila no carbóxi-terminal pode ser substituído com uma diferente 15 porção. Da mesma forma, os peptídeos podem ser covalentemente ou não-covalentemente acoplados a proteínas "carreadoras" farmaceuticamente aceitáveis antes da administração.

O termo fragmento de peptídeo ou polipeptídeo "isolado", conforme aqui utilizado, refere-se a um fragmento de peptídeo ou polipeptídeo o 20 qual ou não tem uma contraparte de ocorrência natural ou foi separado ou purificado de componentes os quais naturalmente o acompanham, por exemplo, em tecidos tais como língua, pâncreas, fígado, baço, ovário, testículo, músculo, tecido de articulação, tecido neural, tecido gastrointestinal ou tecido tumoral ou fluidos corporais tais como sangue, soro ou urina. Tipicamente, o fragmento de peptídeo ou polipeptídeo é considerado "isolado" 25 quando ele está pelo menos 70%, por peso seco, livre das proteínas e outras moléculas orgânicas de ocorrência natural com a qual ele está naturalmente associado. Preferivelmente, uma preparação de um polipeptídeo (ou fragmento de peptídeo seu) da invenção é pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 90% e mais preferivelmente pelo menos 99%, em peso seco, o polipeptídeo (ou o fragmento de peptídeo seu), respectivamente, da invenção. Dessa forma, por exemplo, uma preparação do polipeptídeo x é 30

pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 90%, e mais preferivelmente 99% em peso seco, de polipeptídeo x. Uma vez que um polipeptídeo que é quimicamente sintetizado é, por sua natureza, separado dos componentes que naturalmente o acompanham, o polipeptídeo sintético é "isolado".

5 Um polipeptídeo isolado (ou fragmento de peptídeo) da invenção pode ser obtido, por exemplo, pela extração de uma fonte natural (por exemplo, de fluidos de tecidos ou corporais); pela expressão de um ácido nucléico recombinante que codifica o polipeptídeo; ou por síntese química. Um polipeptídeo que é produzido em um sistema celular diferente da fonte da
10 qual ele naturalmente se origina é "isolado", porque será necessário ser livre de componentes os quais naturalmente o acompanham. O grau de isolamento ou pureza pode ser medido por um método apropriado, por exemplo, cromatografia em coluna, eletroforese em gel de poliacrilamida ou análise de HPLC.

Outro aspecto da invenção é um anticorpo, o qual especificamente se liga ao polipeptídeo variante EPO codificado por polinucleotídeos da invenção ou obteníveis pelo processo mencionado acima. O termo "anticorpo" compreende anticorpos monoclonais ou policlonais e seus fragmentos de ligação, particularmente fragmentos Fc assim como os chamados "anticorpos de cadeia individual" (Bird R. E. et al (1988) *Science* 242:423-6),
15 anticorpos quiméricos, humanizados, particularmente CDR-enxertados, e dia por tetracorpos (Holliger P. et al (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-8). São também compreendidas imunoglobulinas como proteínas que são selecionadas através de técnicas incluindo, por exemplo, exposição de fago para se ligar especificamente aos polipeptídeos da presente invenção.
20 Nesse contexto, o termo "ligação específica" refere-se a anticorpos promovidos contra peptídeos derivados de junções de união ou junções criadas por outros processos, por exemplo, ENIT | RVGQ de hS3, VGQQ | AL-LV de h1-4, VNFY | ALLV de h1-5, KRME | PWEP de hS4, ITVP | GPVG de h1-1, LNEN | NHC de h2-1, KRME | KELM de mS, LLAN | FLRG de mG3,
25 DTFC | RRGD de mG5, KVNF | LRGK de m301 ou LSEA | VHGR de mK3. Tais peptídeos podem compreender mais ou menos aminoácidos N- ou C-terminais. Um anticorpo é considerado como sendo específico para a varian-

te EPO, se sua afinidade para a variante for pelo menos 50 vezes superior, preferivelmente 100 vezes superior, mais preferivelmente pelo menos 1000 vezes superior do que para o EPO humano ou de murino de comprimento total. Preferivelmente anticorpos específicos da presente invenção não se 5 ligam ou essencialmente não se ligam ao EPO humano ou de murino de comprimento total. É bem-conhecido na técnica como fazer anticorpos e selecionar anticorpos com uma dada especificidade.

Outro aspecto da presente invenção envolve o uso de um polinucleotídeo, um vetor, uma célula hospedeira ou um polipeptídeo da presente invenção para a produção de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma condição associada com o dano tecidual devido à morte celular (por exemplo, apoptose e necrose). A apoptose ou necrose leva à destruição celular, a qual pode ser prevenida ou melhorada ao usar um polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira ou polipeptídeo da presente invenção. A 10 morte celular pode ser induzida por muitos estímulos internos e externos diferentes e incluem, preferivelmente, isquemia, hipóxia, infecção bacteriana ou viral, radiação, ou induzida por estímulos metabólicos, tóxicos, químicos, auto-imunológicos ou traumáticos. É bem-conhecido na técnica como detectar morte celular como, por exemplo, usando critérios morfológicos, um ensaio de TUNNEL, ensaio de MTT, ensaio de vida/morte por manchamento (por exemplo, manchamento com brometo de etídio e laranja acridina), ensaio de caspase, microscopia eletrônica, corrida de DNA ou o ensaio de liberação de LDH descrito abaixo. Por exemplo, apoptose é caracterizada por fragmentação de cromatina, extravasamento dos conteúdos celulares e eventualmente morte da célula. Ela foi reconhecida por desempenhar um papel em muitos processos patológicos agudos ou crônicos. Concordantemente, um uso preferido da presente invenção compreende a administração de polinucleotídeos, vetores, células hospedeiras ou polipeptídeos da presente invenção para prevenir, tratar ou melhorar distúrbios neurodegenerativos ou 15 20 25 30 neurinflamatórios agudos e crônicos, distúrbio agudo ou crônico do coração (por exemplo, enfarte do miocárdio), pulmão (por exemplo, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica), rim (por exemplo, glomerulonefrite), fígado (por

exemplo, falência hepática crônica) ou pâncreas (por exemplo, pancreatite), assim como condições associadas com transplante de célula (por exemplo, célula tronco) ou órgão (por exemplo, rim ou fígado). Nesse aspecto, é também previsto que as variantes EPO da presente invenção podem ser incluídas

- 5 das em soluções de estocagem usadas para estocar órgãos ou membros para transporte e/ou depois de injúria traumática.

Distúrbios neurodegenerativos agudos incluem, mas não estão limitados, a vários tipos de distúrbios neurodegenerativos agudos associados com a morte celular neuronal, incluindo insuficiência cerebrovascular,

10 trauma cerebral focal ou difuso, dano cerebral difuso e injúria da medula espinhal. Exemplos de distúrbios neurodegenerativos agudos são: isquemia ou enfarte cerebral incluindo oclusão embólica e oclusão trombótica, reperfusão seguido de isquemia aguda, injúria hipóxica-isquêmica perinatal, parada cardíaca, assim como hemorragia intracranial de qualquer tipo (tal como epidu-

15 ral, subdural, subaracnóide e intracerebral) e lesões intracraniais e intra-vertebrais (tais como contusão, penetração, corte, compressão e laceração), encefalite infecciosa da síndrome de criança sacudida ("whiplash shaken infant syndrome") (por exemplo, herpes encefalite), meningite (por exemplo, bacteriana), dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca).

20 Distúrbios neurodegenerativos crônicos que podem ser tratados como as variantes EPO da presente invenção incluem, mas não estão limitadas, a demências (por exemplo, doença de Alzheimer, demências vasculares), doença de Pick, doença do corpo de Lewy difuso, paralisia supranuclear progressiva (síndrome de Steele-Richardson), esclerose múltipla, atrofia

25 sistêmica múltipla (incluindo síndrome de Shy-Drager), condições epiléticas crônicas associadas com neurodegeneração, doenças neuronais motoras incluindo esclerose lateral amiotrófica, ataxias degenerativas, degeneração basal cortical, complexo de Guam-Parkinson-demência-SLA, panencefalite esclerosante subaguda, doença de Huntington, doença de Parkinson, sinu-

30 cleinopatias (incluindo atrofia sistêmica múltipla), afasia progressiva primária, degeneração estriatonigral, doença de Machado-Joseph/ataxia espinocerebelar tipo 3 e degenerações olivopontocerebelares, doença de Gilles de La

Tourette, paralisia bulbar e pseudobulbar, atrofia muscular espinal e espino-bulbar (doença de Kennedy), esclerose lateral primária, paraplegia espástica familiar, doença de Werdnig-Hoffman, doença de Kugelberg-Welander, doença de Tay-Sach, doença de Sandhoff, doença espástica familiar, paraparesse espástica, leucoencefalopatia multifocal progressiva, disautonomia familiar (síndrome de Riley-Day), e doenças de prón (incluindo, mas sem se limitar, a doença de Creutzfeldt-Jakob, Gerstmann-Strussler-Scheinker, Kuru e insônia familiar fatal), polineuropatias (por exemplo, diabética, álcool-tóxica, síndrome Guillain-Barré, polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica), doenças de prón, vício, distúrbios afetivos (por exemplo, depressão), distúrbios esquizofrênicos, síndrome da fadiga crônica, dor crônica (por exemplo, dor nas costas inferior).

Outro aspecto da presente invenção envolve o uso de um polinucleotídeo, um vetor, uma célula hospedeira ou um polipeptídeo da presente invenção para a produção de um agente anti-envelhecimento. A base para essa aplicação das variantes EPO da presente invenção é o fato de que a deterioração progressiva da maioria das funções corporais, as quais acompanham o envelhecimento, tem sido associadas com a morte celular e é, dessa forma, previsto que as variantes EPO da presente invenção, as quais somente fornecem o efeito protetor celular benéfico, podem ser tomadas continuamente sem sofrer os efeitos colaterais geralmente associados com a administração contínua de EPO, o que, entretanto, pode ser atribuído ao efeito eritropoietico do EPO.

Os inventores também descobriram surpreendentemente que os ácidos nucléicos e proteínas de acordo com a invenção possuem propriedades anti-inflamatórias surpreendentes (ver figuras e experimentos). Dessa forma, essas variantes EPO são úteis no tratamento da inflamação e de doenças degenerativas. Doenças inflamatórias são doenças tais como, porém sem se limitar, a esclerose múltipla, infecções virais e bacterianas ou sepsia. Doenças degenerativas são doenças tais como, porém não limitadas, a apoplexia, enfartes do miocárdio.

A invenção também refere-se a todos os tipos e formas de ex-

pressão *in vivo* dos ácidos nucléicos de acordo com a invenção. Ela ainda refere-se a células transformadas, particularmente a células tronco as quais são usadas como agentes terapêuticos. Tais células podem ser estavelmente transformadas com um ácido nucléico de acordo com a invenção. O ácido nucléico pode estar em um cassete onde ele é operativamente ligado a um promotor. O promotor pode ser capaz de direcionar a expressão somente em tecidos particulares, tais como, porém sem se limitar, a tecido neuronal ou ao cérebro ou tecido o qual exibe inflamação ou degeneração. Ensaios respectivos podem ser tomados do WO 97/14307.

10 A atividade (em unidades) de polipeptídeo EPO é tradicionalmente definida baseando-se na sua eficácia na estimulação da produção de hemácias em modelos de roedores (e conforme derivado por padrões internacionais de EPO). Uma unidade (U) de EPO regular (PM de cerca de 34.000) é cerca de 10 ng de proteína (1 mg de proteína é aproximadamente 100.000 U). Entretanto, conforme mencionado, a invenção envolve o uso de formas não-hematopoiéticas da eritropoietina, e como tais, essa definição baseada na atividade hematopoiética é inapropriada. Dessa forma, conforme aqui utilizado, a unidade de atividade da variante EPO é definida como a quantidade de proteína necessária para eliciar a mesma atividade em sistemas celulares neurais ou outro responsivo à eritropoietina conforme é eliciado por EPO natural no mesmo sistema. O artesão versado irá prontamente determinar as unidades de um EPO não-hematopoiético seguindo as orientações aqui.

25 Em um outro aspecto, a presente invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo um polinucleotídeo, um vetor, uma célula hospedeira, um polipeptídeo e/ou um anticorpo da presente invenção e um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis.

30 Na prática de um aspecto da presente invenção, uma composição farmacêutica conforme descrito acima pode ser administrada a um mamífero por qualquer via a qual proporcione um nível suficiente de uma variante de eritropoietina. Ela pode ser administrada sistematicamente ou localmente. Tal administração pode ser de forma parenteral, transmucosal, por

exemplo, oral, nasal, retal, intravaginal, sublingual, submucosal ou transdérmica. Preferivelmente, a administração é parenteral, por exemplo, através de injeção intravenosa ou intraperitoneal, e também incluindo, mas sem se limitar, à administração intra-arterial, intramuscular, intradérmica e subcutânea.

- 5 Se a composição farmacêutica da presente invenção for administrada localmente, ela pode ser injetada diretamente no órgão ou tecido a ser tratado. Em casos de tratamento do sistema nervoso, essa via de administração inclui, porém não está limitada, às vias de administração intracerebral, intraventricular, intracerebroventricular, intratecal, intracisternal, intra-espinal e/ou 10 peri-espinal, as quais podem empregar agulhas intracraniais e intravertebrais, e cateteres com ou sem dispositivos de bomba.

Em uma modalidade preferida da composição farmacêutica compreende um polipeptídeo variante EPO em uma forma de unidade de dosagem adaptada para a proteção ou intensificação de células, tecidos ou 15 órgãos EPO-responsivos, os quais compreendem, por unidade de dosagem, uma quantidade não-tóxica eficaz na faixa de cerca de 0,5 mg até 5 mg de variantes EPO/ 0,6 mg até 5 mg de variantes EPO; 0,7 mg até 5 mg de variantes EPO; 0,8 mg até 5 mg de variantes EPO; 0,9 mg até 5 mg de variantes EPO; 1 até 5 mg de variantes EPO; 1,5 até 5 mg de variantes EPO; 2 até 5 20 mg de variantes EPO; 2,5 até 5 mg de variantes EPO; 3,5 até 5 mg de variantes EPO; 4 mg até 5 mg de variantes EPO; ou 4,5 até 5 mg de variantes EPO e um veículo farmaceuticamente aceitável.

Em uma modalidade preferida, um polipeptídeo variante EPO pode ser administrado sistematicamente em uma dosagem entre 100 nanogramas até cerca de 50 microgramas por Kg de peso corporal, preferivelmente de cerca de 20 microgramas até cerca de 50 microgramas por Kg de peso corporal. Tais níveis de soro podem ser alcançados em cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 horas pós-administração. Tais dosagens podem ser 25 repetidas conforme necessário. Por exemplo, a administração pode ser repetida diariamente, ou a cada outro, terceiro, quarto, quinto, sexto ou sétimo dia, contanto que seja clinicamente necessário, ou depois de um intervalo apropriado, por exemplo, a cada 1 a 12 semanas, preferivelmente, a cada 30

a 8 semanas. Em uma modalidade, a quantidade eficaz de variante EPO e um veículo farmaceuticamente aceitável pode ser empacotada em um único frasco de dose individual ou outro recipiente. Dependendo da doença ou condição respectivamente tratada, a variante EPO pode ser administrada em 5 uma única dose, por um período predeterminado de tempo ou continuamente. Quando uma condição ou doença aguda é tratada, ele deve ser suficiente para proporcionar o paciente com uma única dose de variante EPO ou por um período de, por exemplo, por 2 dias até 12 meses, preferivelmente 1 semana até 6 meses, mais preferivelmente 2 semanas até 3 meses. Se uma 10 doença ou condição crônica é tratada ou se a variante EPO é usada para prevenir ou reduzir a deterioração associada com o envelhecimento, a variante EPO pode ser administrada continuamente. Se a variante EPO da presente invenção for administrada por um dado período de tempo ou continuamente, ela é preferivelmente administrada nos intervalos e intervalos preferidos indicados acima. Os intervalos necessários irão depender em parte do nível de soro da variante EPO necessário para tratar ou melhorar a doença respectiva e na farmacocinética da variante EPO respectiva, a qual irá em parte depender das modificações do EPO, por exemplo, por PEG. Estará na 15 descrição do médico determinar a duração, dose e tipo exatos da variante EPO levando em consideração, por exemplo, a condição do paciente a ser tratado, a severidade da condição, etc.

Para outras vias de administração, tais como pelo uso de um perfusato, injeção em um órgão ou outra administração local, uma composição farmacêutica irá ser fornecida, a qual resulta em níveis similares de uma 20 variante EPO conforme descrito acima. Um nível de cerca de 10 pg/mL até cerca de 1000 ng/mL é desejado.

As composições farmacêuticas da invenção podem compreender uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto, por exemplo, polinucleotídeo, polipeptídeo, célula ou vetor, e um veículo farmaceuticamente aceitável. Em uma modalidade específica, o termo "farmaceuticamente aceitável" significa aprovado por uma agência regulatória do governo federal ou estadual ou listado na Farmacopéia Americana ou outra farmaco-

péia geralmente reconhecida para uso em animais, e mais particularmente em seres humanos. O termo "veículo" refere-se a um diluente, adjuvante, excipiente ou veículo com o qual o terapêutico é administrado. Tais veículos farmacêuticos podem ser líquidos estéreis, tais como soluções salinas em

5 água e óleos, incluindo aqueles de origem de petróleo, animal, vegetal ou sintética, tais como óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo de sésamo e similares. Uma solução salina é um veículo preferido quando a composição farmacêutica é administrada intravenosamente. Soluções salinas e dextrose aquosa e soluções de glicerol também podem ser empregadas como veículos líquidos, particularmente para soluções injetáveis. Excipientes farmaceuticamente adequados incluem amido, glicose, lactose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha, giz, sílica-gel, estearato de sódio, monoestearato de glicerol, talco, cloreto de sódio, leite desnatado seco, glicerol, propilenoglicol, água, etanol e similares. A composição, caso desejado, também pode conter quantidades menores de agentes umidificantes ou emulsificantes, ou agentes tamponantes de pH. Essas composições podem tomar a forma de soluções, suspensões, emulsão, comprimidos, pílulas, cápsulas, pós, formulações de liberação sustentada e similares. A composição pode ser formulada como um supositório, com aglutinantes tradicionais e veículos tais

10 como triglicerídeos. Os compostos da invenção podem ser formulados como formas de sal ou neutras. Sais farmaceuticamente aceitáveis incluem aqueles formados com grupos amino livres tais como aqueles derivados dos ácidos clorídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., e aqueles formados com grupos carboxila livres tais como aqueles derivados de hidróxidos de

15 sódio, potássio, amônio, cálcio, férreo, isopropilamina, trietilamina, 2-etylaminooetanol, histidina, procaína, etc. Exemplos de veículos farmaceuticamente adequados estão descritos em "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Tais composições conterão uma quantidade terapeuticamente eficaz do composto, preferivelmente na forma purificada, juntamente com uma quantidade adequada de veículo de forma a fornecer a forma para a administração própria para o paciente. A formulação deve de adequar ao modo de administração.

20

25

30

- Composições farmacêuticas adaptadas para administração oral podem ser fornecidas como cápsulas ou comprimidos; como pós ou grânulos; como soluções, xaropes ou suspensões (em líquidos aquosos ou não-aquosos); como espumas ou sobremesas comestíveis. Comprimidos ou
- 5 cápsulas de gelatina dura podem compreender lactose, amido ou seus derivados, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio, ácido esteárico ou seus sais. Cápsulas de gelatina mole podem compreender óleos vegetais, ceras, gorduras, polióis líquidos ou semi-sólidos, etc. Soluções e xaropes podem compreender água, polióis e açúcares.
- 10 Um agente ativo tencionado para administração oral pode ser revestido com ou misturado com um material que retarde a desintegração e/ou absorção do agente ativo no trato gastrointestinal (por exemplo, mono-esteato de glicerila ou diesteato de glicerila podem ser usados). Dessa forma, a liberação sustentada do agente ativo pode ser alcançada durante
- 15 muitas horas e, caso necessário, o agente ativo pode ser protegido de ser degradado no estômago. Composições farmacêuticas para administração oral podem ser formuladas para facilitar a liberação de um agente ativo em um local gastrointestinal particular devido a condições enzimáticas ou pH específico.
- 20 Composições farmacêuticas adaptadas para administração transdérmica podem ser fornecidas como placas discretas tencionados a permanecer em contato íntimo com a epiderme do receptor por um período prolongado de tempo. Composições farmacêuticas adaptadas para administração tópica podem ser fornecidas como ungüentos, cremes, suspensões,
- 25 loções, pós, soluções, pastas, géis, borrifos, aerossóis ou óleos. Para administração tópica à pele, boca, olho ou outros tecidos externos, um ungüento tópico ou creme é preferivelmente usado. Quando formulado em um ungüento, o ingrediente ativo pode ser empregado ou com uma base de ungüento parafínico ou miscível em água. Alternativamente, o ingrediente ativo pode
- 30 ser formulado em um creme com uma base óleo-em-água ou com uma base água-em-óleo. Composições farmacêuticas adaptadas para administração tópica ao olho inclui gotas oftálmicas. Nessas composições, o ingrediente

ativo pode ser dissolvido ou suspenso em um veículo adequado, por exemplo, em um solvente aquoso. Composições farmacêuticas adaptadas para administração tópica na boca inclui "lozenges" pastilhas e enxágües bucais.

Composições farmacêuticas adaptadas para administração nasal 5 podem compreender veículos sólidos tais como pós (preferivelmente com um tamanho de partícula na faixa de 20 a 500 micrões). Pós podem ser administrados de forma na qual a dose é consumida, isto é, por inalação rápida através do nariz de um recipiente de pó mantido próximo ao nariz. Alternativamente, composições adotadas para administração nasal podem compreender 10 veículos líquidos, por exemplo, borrifos nasais ou gotas nasais. Essas composições podem compreender soluções aquosas ou oleosas do ingrediente ativo. Composições para administração por inalação podem ser fornecidas em dispositivos especialmente adaptados incluindo, mas sem se limitar, a aerossóis pressurizados, nebulizadores ou insufladores, os quais podem 15 ser construídos de forma a fornecer dosagens predeterminadas do ingrediente ativo. Em uma modalidade preferida, composições farmacêuticas da invenção são administradas através da cavidade nasal para os pulmões.

Composições farmacêuticas adaptadas para administração retal 20 podem ser fornecidas como supositórios ou enemas. Composições farmacêuticas para administração vaginal podem ser fornecidas como formulações de pessários, tampões, cremes, géis, pastas, espumas ou borrifos.

Composições farmacêuticas adaptadas para administração parenteral incluem soluções ou suspensões injetáveis estéreis aquosas e não-aquosas, as quais podem conter antioxidantes, tampões, bacteriostáticos e 25 solutos que tornam as composições substancialmente isotônicas com o sangue de um receptor mencionado. Outros componentes que podem estar presentes em tais composições incluem água, álcoois, polióis, glicerina e óleos vegetais, por exemplo. Composições adaptadas para administração parenteral podem ser apresentadas em recipientes de dose unitária ou de dose múltipla, por exemplo ampolas fechadas e frasquinhos, e podem ser estocadas em uma condição seca por congelamento (lioofilizada) requerendo somente a adição de um veículo líquido estéril, por exemplo, solução salina estéril para

injeções, imediatamente antes do uso. Soluções e suspensões de injeção extemporâneas podem ser preparadas a partir de grânulos, comprimidos e pós estéreis. Em uma modalidade, um auto-injetor compreendendo uma solução injetável de um variante EPO pode ser fornecida para uso emergencial

5 por ambulâncias, salas de emergência e situações de campo de guerra, e mesmo para auto-administração em um ambiente doméstico, particularmente onde a possibilidade de amputação traumática pode ocorrer, tal como pelo uso imprudente de uma segadeira. A probabilidade de que as células e tecidos em um pé ou dedo grave irá sobreviver depois do religamento pode ser

10 aumentada pela administração de um variante EPO em sítios múltiplos na parte em gravidade tão logo quanto praticável, mesmo antes da chegada do pessoal médico no local, ou a chegada do indivíduo aflagido gravemente com o dedo na sala de emergência.

Em uma modalidade preferida, a composição é formulada de

15 acordo com os procedimentos de rotina como uma composição farmacêutica adaptada para administração intravenosa a seres humanos. Tipicamente, composições para administração intravenosa são soluções em tampão aquoso isotônico estéril. Onde necessário, a composição também pode incluir um agente solubilizante e um anestésico local, tal como lidocaína para aliviar

20 a dor no local da injeção. Geralmente, os ingredientes são fornecidos ou separadamente ou misturados juntos em uma forma de dosagem unitária, por exemplo, como um pó liofilizado seco ou um concentrado sem água em um recipiente hermeticamente fechado tal como em uma ampla ou sachê indicando a quantidade de agente ativo. Onde a composição é para ser administrada por infusão, ela pode ser dispersa com uma garrafa de infusão contendo solução salina ou água de grau farmacêutico estéril. Onde a composição é administrada por injeção, uma ampola de solução salina estéril pode ser fornecida de forma que os ingredientes podem ser misturados antes da administração.

30 Supositórios geralmente contêm ingrediente ativo na faixa de 0,5% até 10% em peso; formulações orais preferivelmente contêm 10% a 95% de ingrediente ativo.

Uma composição perfusato pode ser fornecida para uso em banhos de órgãos transplantados, para perfusão *in situ*, ou para administração à vasculatura de um órgão doador antes da coleta do órgão.

Tais composições farmacêuticas podem compreender níveis de 5 uma variante EPO ou de uma forma de uma variante EPO não adequada para administração aguda ou crônica, local ou sistêmica a um indivíduo, mas irá servir às funções tencionadas aqui em um cadáver, banho de órgão, perfusato de órgão ou em um perfusato *in situ* antes da remoção ou redução dos níveis de variante EPO contidos ali antes da exposição ou retorno do 10 órgão ou tecido tratado à circulação regular.

A invenção também fornece uma embalagem ou kit farmacêutico compreendendo um ou mais recipientes enchidos com um ou mais dos ingredientes das composições farmacêuticas da invenção. Opcionalmente associado com tal(is) recipiente(s) pode ser um boletim na forma prescrita por 15 uma agência governamental regulando o produto, o uso ou a venda de produtos farmacêuticos ou biológicos, cujo boletim reflete a aprovação pela agência de produção, uso ou venda para administração humana.

Em outra modalidade, por exemplo, variante EPO pode ser distribuída em um sistema de liberação controlada. Por exemplo, o polipeptídeo 20 pode ser administrado usando infusão intravenosa, uma bomba osmótica, implantável, uma placa transdérmico, lipossomas ou outras formas de administração. Em uma modalidade, uma bomba pode ser usada (ver Sefton (1987) *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14: 201; Buchwald et al. (1980) *Surgery* 88:507; Saudek et al. (1989) *N. Eng. J. Med.* 321: 574). Em outra modalidade, o composto pode ser distribuído em uma vesícula, particularmente em 25 um lipossoma (ver Langer (1990) *Science* 249:1527-1533; Treat et al. (1989) em *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein e Fidler (eds.), Liss, N. Y., 353-365; WO 91/04014; U.S. 4.704.355). Em outra modalidade, materiais poliméricos podem ser usados 30 (ver *Medical Applications of Controlled Release* (1974) Langer e Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, Fla.; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, (1984) Smolen e Ball (eds.), Wiley: N.Y.; Ranger e

Peppas (1953) *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23: 61; ver também Levy et al. (1985) *Science* 228:190; During et al. (1989) *Ann. Neurol.* 25: 351 ; Howard et al. (1989) *J. Neurosurg.* 71: 105).

Em ainda outra modalidade, um sistema de liberação controlada 5 pode ser colocado em proximidade do alvo terapêutico, isto é, as células, tecido ou órgão alvo, requerendo dessa forma uma fração da dose sistêmica (ver, por exemplo, Goodson (1984) 115-138 em *Medical Applications of Controlled Release*, vol. 2). Outros sistemas de liberação controlada são discutidos na revisão por Langer (1990, *Science* 249: 1527-1533).

10 Em outra modalidade, variante EPO, conforme propriamente formulada, pode ser administrada por administração nasal, oral, retal, vaginal ou sublingual.

15 Em uma modalidade específica, pode ser desejável administrar as composições farmacêuticas da invenção localmente para a área necessitada de tratamento; isso pode ser alcançado, por exemplo, e não a título de limitação, por infusão local durante a cirurgia, aplicação tópica, por exemplo, juntamente com um curativo de ferimento após a cirurgia, por aplicação tópica, por exemplo, juntamente com um curativo de ferimento depois de cirurgia, por injeção, através de um cateter, através de um supositório ou através 20 de um implante, o referido implante sendo um material poroso, não-poroso ou gelatinoso, incluindo membranas, tais como membranas silásticas, ou fibras.

25 A seleção da dose eficaz preferida será determinada por um artesão versado baseando-se na consideração de vários fatores os quais serão conhecidos por uma pessoa normalmente versada na técnica. Tais fatores incluem a forma particular da composição farmacêutica, por exemplo, polipeptídeo ou vetor, e seus parâmetros farmacocinéticos tais como biodisponibilidade, metabolismo, meia-vida, etc., os quais foram estabelecidos durante os procedimentos de desenvolvimento usuais tipicamente empregados 30 na obtenção da aprovação regulatória para um composto farmacêutico. Outros fatores na consideração da dose incluem a condição ou doença a ser tratada ou o benefício a ser alcançado em um indivíduo normal, a massa

corporal do paciente, a via de administração, se a administração é aguda ou crônica, medicamentos concomitantes e outros fatores bem-conhecidos por afetar a eficácia dos agentes farmacêuticos administrados. Dessa forma, a dosagem precisa deve ser decidida de acordo com o julgamento do clínico e 5 cada circunstância do paciente, por exemplo, dependendo da condição e do status imune do paciente individual, de acordo com técnicas clínicas padronizadas.

Em outro aspecto da invenção, uma solução de perfusão ou perfusato é fornecida para a perfusão e estocagem de órgãos para transplante, 10 a solução de perfusão incluindo uma quantidade de composições farmacêuticas eficazes para proteger células responsivas ao variante EPO e células, tecidos ou órgãos associados.

Transplante inclui, mas não está limitado, ao xenotransplante, onde um órgão (incluindo células, tecido ou outra parte corporal) é coletado 15 de um doador e transplantado em um receptor diferente; um autotransplante, onde o órgão é tomado de uma parte de um corpo e recolocado em outra, incluindo procedimentos cirúrgicos de bancada, nos quais um órgão pode ser removido, e enquanto *ex vivo*, ressecado, reparado ou, de outra forma, manipulado, tal como para remoção tumoral, e a seguir retornado para o local original. Em uma modalidade, a solução de perfusão é a solução da Universidade de Wisconsin (UW) (U.S. 4.798.824), a qual contém de cerca de 1 20 até cerca de 25 U/mL de eritropoietina, 5% de hidroxietilamino (com um peso molecular de cerca de 200.000 até cerca de 300.000 e substancialmente livre de etilenoglicol, etilenocloridrina, cloreto de sódio e acetona): KH_2PO_4 25 25 mM/ glutationa 3 mM; adenosina 5 mM; glicose 10 mM; tampão HEPES 10 mM; gluconato de magnésio 5 mM; CaCl_2 1,5 mM; gliconato de sódio 105 mM; 200.000 unidades de penicilina; 40 unidades de insulina; 16 mg de dexametasona; 12 mg de vermelho de fenol; e tem um pH de 7,4 – 7,5 e uma 25 osmolalidade de cerca de 320 mOSm/L. A solução é usada para manter rins e pâncreas cadavéricos antes do transplante. Ao usar a solução, a conservação pode ser prolongada além do limite de 30 horas recomendado para a conservação do rim cadavérico. Esse perfusato particular é meramente ilus-

trativo de uma variedade de tais soluções que podem ser adaptadas para o presente uso pela inclusão de uma quantidade eficaz a composição farmacêutica. Em uma outra modalidade, a solução de perfusato contém o equivalente de cerca de 5 até cerca de 35 U/mL de eritropoietina, ou de cerca de 5 10 até cerca de 30 U/mL de eritropoietina.

Enquanto o receptor preferido de um variante EPO para os propósitos aqui inteiramente é um humano, os métodos aqui se aplicam igualmente a outros mamíferos, particularmente animais domesticados, gado, animais de companhia e de zoológico. Entretanto, a invenção não é tão limitante e os benefícios pode ser aplicados a qualquer mamífero.

Se uma pessoa for conhecida por estar em risco de desenvolver uma apoplexia, a administração profilática da composição farmacêutica da presente invenção é possível. Nesses casos, as composições farmacêuticas, particularmente o polipeptídeo variante EPO é preferivelmente administrado 15 em doses preferidas delineadas acima e particulares preferidas com base diária. Preferivelmente, entre 100 nanogramas até cerca de 50 microgramas por Kg de peso corporal, preferivelmente cerca de 20 microgramas até cerca de 50 microgramas por Kg de peso corporal. Essa administração pode continuar até a redução do risco de desenvolver uma apoplexia. Na maioria dos 20 exemplos, entretanto, a composição farmacêutica será administrada uma vez que a apoplexia tenha sido diagnosticada. Nesses casos, é preferível que uma primeira dose da composição farmacêutica seja administrada pela primeira vez dentro de 24 horas depois dos primeiros sintomas de uma apoplexia serem evidentes, preferivelmente dentro de 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 25 3, 2 ou 1 hora ou menos. Preferivelmente, a administração é, a seguir continuada por preferivelmente pelo menos 7, mais preferivelmente pelo menos 14 e, mais preferivelmente, por pelo menos 21 dias. As doses são administradas preferivelmente uma vez por dia e, preferivelmente, nas doses indicadas acima.

30 Breve descrição das figuras e desenhos

A figura 1: comparação dos produtos de PCR do EPO: Painel A representa os produtos de DNA de várias reações de PCR efetuadas ou com

plasmídeo puro compreendendo as variantes EPO de murino diferentes ou CDNA de cérebro ou rim de camundongo, os quais são separados em um gel de agarose 1,2%. Da esquerda para a direita as raias compreendem: marcador de peso molecular de 1 Kb, o produto de mK3 puro, mG3 puro, 5 mG5 puro, m301 puro, mS puro, mWT puro, CDNA puro, CDNA de rim. Painel B representa o produto de DNA de um PCR efetuado com CDNA de cérebro humano. Da esquerda para a direita as raias compreendem padrão de peso molecular de 1 Kb e o produto de PCR do CDNA de cérebro humano.

10 A figura 2: Alinhamento de seqüências de nucleotídeos das variantes EPO identificadas no CDNA de cérebro de murino e de EPO de murino do "tipo selvagem", isto é, a seqüência do EPO anteriormente descrita.

A figura 3: Alinhamento de seqüências de nucleotídeos das variantes EPO identificadas no CDNA de cérebro humano e de EPO humano do "tipo selvagem".

15 A figura 4: Alinhamento de seqüências de nucleotídeos das variantes EPO identificadas em camundongo e humano com o EPO de "tipo selvagem" respectivo.

20 A figura 5: Atividade hematopoietica de variantes EPO e de EPO humano e de murino da presente invenção. Painel A representa os resultados de um ensaio formador de colônia para variantes EPO e EPO de murino e o Painel B representa o ensaio de formação de colônia para variantes EPO e EPO humano.

A figura 6: ajuste experimental para ensaios de neuroproteção com rhEPO e isômeros EPO.

25 A figura 7: painel A mostra um experimento com extensão de privação de glicose oxigênio (OGD) de 1 h 40 min e 1 h 50 min. Em ambos os pontos de tempo uma taa de proteção de 40 – 50% para os neuroguardiões, mas sem proteção com mEPO e rhEPO foi observada. Painel B representa um experimento com dois pontos de tempo diferentes (extensão de 30 OGD entre dois experimentos varia de acordo com a densidade de neurônios). Em 2 h 45 min somente uma fraca proteção é alcançada com wtEPO (23 – 30%) em comparação com os neuroguardiões (60 – 70%). A capaci-

dade de proteção total do rhEPO somente é observada em níveis de danos mais elevados (3 h 15 min).

A figura 8: painel amostra um experimento com 2 h 00 min, 2 h 15 min e 2 h 20 min de extensão de OGD com uma concentração de proteína se igualando a 100 U/L de hEPO. Em todos os três pontos de tempo uma taxa de proteção de 40 – 50% para seres humanos, porém sem proteção com mEPO e rhEPO. Painel B mostra um experimento com dois diferentes pontos de tempo (extensão de PGD entre dois experimentos varia de acordo com a densidade de neurônios). Em 2 h 45 min somente uma fraca proteção é alcançada com wtEPO (20 – 30%) em comparação com os neuroguardiões (60 – 70%). A capacidade de proteção total do EPO é somente observada em níveis de danos mais elevados (3 h 15 min).

A figura 9: painel A mostra um Western Blot de meio de células HEK293 transfectadas com pcDNA3.1-V5/His-hEPO, pcDNA3.1-V5/His-hS3 ou pcDNA3.1-V5/His-hS4, respectivamente. Esses meios foram usados para os experimentos mostrados na figura 8. A concentração de hEPO, quantificada por ELISA-EPO de camundongo (R & D) foi de 2 U/mL. rhEPO (= 2,5 ng forma carregados no gel), hEPO (=0,4 ng foram carregados no gel), hS3 e hS4; cada 20 µL de meio (coletado 2 dias depois da transfecção). Marcador = 5 µL de proteína padrão sinalizada com His BenchMark® (Invitrogen). Painel B mostra um Western Blot de EPO do tipo selvagem de camundongo purificado sinalizado com His (mEPO), variantes do EPO hS3 e hS4 humano. mEPO foi quantificado com o ELISA de EPO de camundongo. 130 pg de EPO foram carregados no gel (anticorpo primário: rhEPO-Antikörper anticoeilo; Santa-Cruz).

A figura 10. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das variantes EPO criadas recombinantemente (mutantes alfa-hélice) e identificadas *in vivo*. Aqui, SEQ ID NO: 50 é a seqüência do tipo selvagem alfa-hélice humana; SEQ ID NO: 51 é hAmA (mutação pontual de alanina); SEQ ID NO: 52 é hAmE (mutação pontual de ácido glutâmico); SEQ ID NO: 53 é hA-10 (mutante por anulação) e SEQ ID NO: 54 é hA-20 (mutante por anulação).

A figura 11: citoproteção mediada por hEPO e hS3 em um mo-

dele de isquemia consistindo em privação de soro e hipóxia em mioblastos cardíacos H9c2. Células H9c2 foram incubadas em meio DMEM privado de soro seja em condições normóxicas ou hipóxicas por 24 h.

Apoptose foi avaliada 24 h mais tarde por ensaio LDH. Os dados 5 foram normalizados pelo ajuste da liberação de delta LDH delta de células não-tratadas em condições normóxicas ou hipóxicas até 100%. **A:** diagrama de coluna representando os valores médios da liberação de LDH normalizada. **B:** dados foram representados como um diagrama de "box plot" mostrando a mediana (linha transversal à caixa), o 25º percentil (dobradiça inferior), o 75º percentil (dobradiça superior), o valor máximo e o valor mínimo. A 10 quantidade de experimentos $n = 7$. $P^* < 0,001$ (ANOVA1).

A figura 12: imunoprecipitação de variantes EPO usando um anticorpo anti-mEPO de R&D (cabra, marcado com biotina); **A:** detecção de uma segunda isoforma de EPO (30 KDa) em uma proteína de rim extraída de camundongos tratados com CoCl_2 (129S6). **B:** bloqueio da interação anticorpo-antígeno por DarbpoietinA.

A figura 13. Neuroproteção mediada por eritropoietina alfa-hélice (hA; $n = 4$). 100/UL hA: 30 pM; 50 U/L de hA: 15 pM; hEPO: 30 pM = 100 U/L; $P^* < 0,05$; ANOVA1 versus controle.

20 A figura 14. Neuroproteção mediada por várias isoformas de EPO humanas ($n = 6$) $P^* < 0,05$; ANOVA1 versus controle.

A figura 15. Neuroproteção mediada por variantes de anulação de alfa-hélice de eritropoietina ($n = 6$) $P^* < 0,05$; ANOVA1 versus controle **A:** diagrama de coluna mostrando os valores médios da liberação de LDH normalizada. **B:** "Box plot" mostrando os valores das medianas e percentis (25%, 75%) da liberação de LDH normalizada.

30 A figura 16. Efeitos das variantes EPO e do EPO humano de comprimento completo na produção de citocina induzida por LPS por macrófagos humanos. Monócitos humanos purificados foram diferenciados em macrófagos na presença de rhu M-CS (50 ng/mL) por 6 dias. Macrófagos ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram pré-incubados com hS4, hS3 ou hEPO (300 mU/mL cada) por 3 h e, a seguir, estimulados com 10 ng/mL de endotoxina (LPS de *E. coli*

0127:B8) por 4 h. A concentração de citocina nos sobrenadantes foi determinada por ELISA (Cytometric Beads Array , Becton Dickinson, Heidelberg, Alemanha). Os dados são apresentados como média \pm SD. **Resultados diferiram do grupo de controle (PBS) ($p < 0,01$; teste U de Mann-Whitney; $n = 3 - 9$ por grupo).

A figura 17: alinhamento das seqüências de ácido nucléico de variantes de anulação EPO.

A figura 18: seqüências de DNA de mutantes e variantes de anulação criadas de forma recombinante assim como hélice A do tipo selvagem (hélice A Hwt-epo). Aqui, SEQ ID NO: 55 é hA (hélice A do tipo selvagem), SEQ ID NO: 56 é hAmA (mutante de anulação com alanina), SEQ ID NO: 57 é hAmE (mutante de anulação com ácido glutâmico), SEQ ID NO: 58 é hA-10 (mutante de anulação e hélice A menos 10 aa) e SEQ ID NO: 59 é hA-20 (mutante de anulação de hélice A menos 20 aa).

A figura 19: uma modalidade preferida em que as seqüências de transporte líder são anuladas é demonstrada. A mostra a seqüência de hA DNA sem líder como SEQ ID NO: 60. Essa é a proteína exportada madura. Ele também mostra a seqüência líder (SEQ ID NO: 63). B mostra o aminoácido hA sem líder como SEQ ID NO: 61 e a seqüência de aminoácidos da seqüência líder como SEQ ID NO: 62.

Exemplos

Síntese de CDNA de EPO de murino

RNA foi isolado dos rins de camundongos C57BL/6 ou SV129S6 do tipo selvagem ou de dois diferentes cérebros de camundongo (1 hora depois da apoplexia) por extração com trizol. O RNA foi precipitado com clorofórmio e isopropanol e finalmente dissolvido em DEPC-H₂O. DNA foi digerido para o protocolo de DNase sem RNase RQ1 da Promega. A reação foi interrompida pela adição de 200 μ L de fenol/clorofórmio/álcool isopropílico (25/24/1) à mistura reacional e centrifugada por 10 min a 10000 rpm e 10°C. O sobrenadante foi misturado com 200 μ L de clorofórmio/álcool isopropílico (24/1) e centrifugado por 10 min a 10000 rpm e 10°C. 20 μ L de cloreto de lítio 8 M e 550 μ L de etanol absoluto foram adicionados ao sobrenadante.

Essa mistura foi, a seguir, incubada por 1 h a -70°C e subseqüentemente precipitada por 30 min por centrifugação a 11000 rpm e 0°C. O pélete resultante foi lavado com 600 µL de etanol 75%, centrifugado a 8000 rpm (4°C, 10 min) e seco a temperatura ambiente. O RNA foi dissolvido em 20 µL de 5 DEPC-H₂O.

A transcriptase reversa de vírus de leucemia de murino Monoley (MuLV, RNase menos H, comprada da Promega) foi empregada na síntese de CDNA do primeiro filamento em um volume reacional de 15 µL com DEPC-H₂O compreendendo 3 µg de RNA e 3 µL de iniciador hexâmero aleatório (10 µM). A transcrição reversa foi executada com 6 µL de tampão reacional M-MuLV (5 x), dNTP 2 µL (2,5 mM cada), 1 µL de inibidor da RNase (1 U/µL), 1 µL de transcriptase reversa M-MuLV e 5 µL de DEPC-H₂O em 10 uma máquina de PCR correndo o seguinte programa: 5 min a 21°C; 1 h a 37°C; 5 min a 95°C.

15 O "pool" de CDNA resultante foi usado par amplificar o CDNA de EPO completo por uma aproximação de PCR "nested". A primeira etapa empregou iniciadores posicionados fora da região codificadora do gene EPO (genepo_sentido (SEQ ID NO 39) gaa ctt cca agg atg aag act tgc agc e ge- nepo-anti-sentido; SEQ ID NO 40): gtg gca gca gca tgt cac ctg tc). A segun- 20 da etapa usou iniciadores projetados para amplificar o gene do códon de início ao de parada, o qual se ligou aos sítios de clivagem BamHI para a clo- nagem subseqüente (epo_sentido (SEQ ID NO 41 tat gga tcc atg ggg gtg ccc gaa cgt ccc ac e epo_antisentido (SEQ ID NO 42 tat gga tcc tca cct gtc ccc tct cct gca gac). Todos os iniciadores foram da MWG-Biotech AG. Um PCR 25 nested foi efetuado em uma máquina PCR Hybaid em dois etapas, primeiro PCR (3 min a 95°C; 35 ciclos; 30 seg a 65°C, 1 min a 72°C, 30 seg a 95°C; 10 min a 72°C; 4°C de parada) e um segundo PCR (3 min a 95°C; 5 ciclos: 30 seg a 67°C, 1 min a 72°C, 30 seg a 95°C; 15 ciclos: 30 seg a 70°C, 1 min a 72°C, 30 seg a 95°C; 10 min a 72°C; 4°C).

30 Em ambos os PCRs, a DNA Polimerase Pfu Turbo Hotstart (S- tratagene) foi usada de acordo com o protocolo do fabricante. O produto de PCR do primeira etapa foi diluído 1:50 para o segundo PCR. Um segundo

protocolo de síntese de CDNA foi efetuado usando o sistema RT-PCR de acesso (Invitrogen) com os seguintes parâmetros: 48°C por 5 min; 94°C por 2 min; 40 ciclos: 94°C por 30 seg, 65°C por 1 min, 70°C por 2 min; 70°C por 7 min; 4°C. O segundo PCR foi efetuado conforme descrito acima.

5 O CDNA de EPO de comprimento total amplificado e os isômeros EPO foram separados em um gel de TAE-agarose 1,2%. Uma figura dos vários produtos de PCR é mostrada na figura 1a. Os fragmentos foram, a seguir, purificados usando o sistema de limpeza total Wizard SV-Gel (Promega) ou o Kit de Extração de Gel (Qiagen, Hilden, Alemanha). Uma vez 10 que a Pfu polimerase gera produtos terminais cegos, o CDNA foi subclonado no vetor II-TOPO pCR-Cego (pCR-Blunt) usando células Top10 One Shot quimicamente competentes da (ambas da Invitrogen).

DNA de plasmídeo foi isolado de colônias individuais pelo uso do kit de preparação QIA da Qiagen. As inserções foram seqüenciadas em um 15 seqüenciador de DNA ALFexpress® (Pharmacia Biotech) usando o kit de seqüenciamento de ciclo de iniciador (Primer Cycle Sequencing Kit) Thermo Sequenase® (Amersham Biosciences). Os iniciadores M13FWDCY (SEQ ID NO 43: gtc gtg act ggg aaa acc ctg gcg) e M13REVCY (SEQ ID NO 44 agc gga taa caa ttt cac aca gga) foram marcados com Cy5. Os parâmetros para 20 o seqüenciamento foram: t = 900 min; T = 55°C; 800 V; 55 mA e 30 W. A análise de seqüência revelou a existência de uma nova variante de EPO sem o éxon 4 e três variantes internamente anuladas. As seqüências de nucleotídeos estão demonstradas na figura 2a e figura 2b e as seqüências de peptídeo codificadas estão demonstradas na figura 4. A seqüência de nucleotídeo e de peptídeo da variante EPO mS corresponde à SEQ ID NO 13 e 25 SEQ ID NO 14, respectivamente. A seqüência de nucleotídeo e peptídeo da variante EPO mG3 corresponde à SEQ ID NO 15 e SEQ ID NO 16, respectivamente. A seqüência de nucleotídeo e peptídeo da variante EPO mG5 corresponde à SEQ ID NO 17 e SEQ ID NO 18, respectivamente. A seqüência 30 de nucleotídeo e peptídeo da variante EPO m301 corresponde à SEQ ID NO 19 e SEQ ID NO 20, respectivamente. A seqüência de nucleotídeo e peptídeo da variante EPO mK3 corresponde à SEQ ID NO 21 e SEQ ID NO 22,

respectivamente.

Síntese do CDNA de EPO humano

Poli A + RNA de rim adulto humano (macho) e cérebro fetal (macho) foi comprado da Stratagene. CDNA foi gerado de 250 ng de RNA de rim ou 200 ng de RNA de cérebro de acordo com a transcriptase reversa de vírus de leucemia de murino Moloney (MuLV, RNase menos H) conforme descrito acima. O "pool" de CDNA resultante foi usado para amplificar o CDNA de EPO completo usando Pfu polimerase (Stratagene) com os seguintes iniciadores: Hepo_sentido (SEQ ID NO 45): gat ggg ggt gca cga atg tcc tgc e Hepo_antisentido (SEQ ID NO 46): cac acc tgg tca tct gtc ccc tgt c.

O PCR foi efetuado em uma máquina de PCR da Invitrogen (3 min a 95°C; 35 ciclos; 30 seg a 67°C, 1 min a 72°C, 30 seg a 95°C; 10 min a 72°C). No caso de CDNA de cérebro fetal, uma aproximação de PCR nested foi usada, efetuando um segunda etapa de amplificação no produto de PCR de 20 ciclos. Os produtos de PCR amplificados foram separados em um gel de TAE-agarose 1,2% (figura 1b) e purificados usando o Kit de Extração de Gel (Qiagen, Hilden, Alemanha). O CDNA purificado foi subclonado no vetor II-TOPO de pCR-cego (**pCR-Blunt**) usando células Top10 One Shot quimicamente competentes (ambos da Invitrogen). DNA de plasmídeo foi isolado de colônias individuais pelo uso do kit de preparação QIA (Qiagen, hilden, Alemanha). As inserções foram seqüenciadas em um seqüenciador de DNA ALFexpress® (Pharmacia Biotech) usando o kit de seqüenciamento de ciclo de iniciador Thermo Sequenase® (Amersham Biosciences). Os iniciadores M13FWDCY (SEQ ID NO 43) e M13REVCY (SEQ ID NO 44) foram marcados com Cy5. Os parâmetros para o seqüenciamento foram: t = 900 min; T = 55°C; 800 V; 55 mA e 30 W. A análise de seqüência revelou a existência de dois novos variantes de EPO sem o éxon 3 e a primeira metade do éxon 4, respectivamente, e uma variedade de variantes que seguem a regra de trímeros ou hexâmeros repetidos conforme detectado no camundongo. As seqüências de nucleotídeos estão demonstradas na figura 3a e na figura 3b e as seqüências de peptídeos codificadas estão mostradas na figura 4. A seqüência de nucleotídeo e de peptídeo da variante EPO hS3 corresponde à

SEQ ID NO 1 e SEQ ID NO 2, respectivamente. A seqüência de nucleotídeo e peptídeo da variante EPO h1-4 corresponde à SEQ ID NO 3 e SEQ ID NO 4, respectivamente. A seqüência de nucleotídeo e peptídeo da variante EPO 1-5 corresponde à SEQ ID NO 5 e SEQ ID NO 6, respectivamente. A seqüência de nucleotídeo e peptídeo da variante EPO hS4 corresponde à SEQ ID NO 7 e SEQ ID NO 8, respectivamente. A seqüência de nucleotídeo e peptídeo da variante EPO h1-1 corresponde à SEQ ID NO 9 e SEQ ID NO 10, respectivamente. A seqüência de nucleotídeo e peptídeo da variante EPO h2-1 corresponde à SEQ ID NO 11 e SEQ ID NO 12, respectivamente.

10 Expressão das proteínas sinalizadas com His nas células HEK

Sítios de restrição BamHI e EcoRI para clonagem foram adicionados tanto às variantes EPO de camundongo quanto de humanos pelo uso de projeções de iniciadores sentido e projeções de iniciadores anti-sentido sem códon de parada (para variantes de camundongo: *epo_sentido* (SEQ ID 15 NO 41) e *epoeco_anti-sentido* (SEQ ID NO 47): aaa gaa ttc cct gtc ccc tct cct gca gac ctc; para variantes humanas; *hepobam_se* (SEQ ID NO 48): tat gga tcc atg ggg gtg cac gaa tgt cc, *hepoeco_as* [SEQ ID NO 49]: aga gaa ttc tct gtc ccc tgt cct gca g). Os produtos de PCR foram clonados em pcDNA-3.1-HIS/V5 A (Invitrogen) usando os sítios de restrição BamHI e EcoRI. Os 20 plasmídeos foram amplificados em células XL-1 azul competentes (recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^R)] (Stratagene). O protocolo de transformação das células XL-1 azul competentes foi efetuado sem β-mercaptoetanol e com um pulso de aquecimento prolongado de 60 segundos. DNA de plasmídeo foi extraído usando o Kit 25 de Minipreparação QIAprep (Qiagen, Hilden, Alemanha). Para transfecção em células de mamíferos o DNA foi extraído usando o Kit Maxi de Plasmídeo EndoFree (Qiagen, Hilden, Alemanha). Células HEK 293 (BD biosciences) cresceram por 18 dias em meio Eagle modificado da Dulbecco (DMEM; Biocrom, Berlim, 1 g/1 de glicose, 3.7 g/L de NaHCO₃; suplementado com 10% 30 de soro de bezerro fetal GOLD, 1% de penicilina/estreptavidina e 1% de L-glutamina) em frascos de cultura de tecido (25 cm²) a 37°C e 5% de CO₂. As células foram divididas a cada 2 – 3 dias depois de alcançar 80 – 90% de

confluência. Na DIV18, 120.000 células foram plaqueadas por cavidade em uma placa de 12 cavidades contendo meio Eagle modificado da Dulbecco sem antibióticos. As células cresceram por aproximadamente 48 h até 50% de confluência. A transfecção foi efetuada com Lipofectamine 2000 (Invitrogen) adaptando o protocolo fornecido para células HEK.

O meio de plaqueamento das células HEK foi substituído 10 minutos antes da transfecção por DMEM sem soro sem antibióticos. As células foram incubadas 5 h a 37°C com exemplos DNA-lipofectamina. O meio foi, a seguir, alterado para um DMEM contendo soro fresco sem antibióticos. Na DIV12, as células foram divididas e plaqueadas em Eagle modificado da Dulbecco com antibióticos.

Expressão e purificação de variantes EPO sinalizadas com His

Proteínas sinalizadas com His foram expressas de forma transitória em células HEK. Meio das células HEK293 foi coletado 2 – 6 dias depois da transfecção com constructos – pcDNA-3.1-HIS/V5 A. Os fragmentos celulares foram peletizados a 3500 rpm, 4°C por 15 min. Resina de Afinidade com Metal BD TALON® (BD Biosciences) foi usada para purificação de proteínas sinalizadas com his. Todas as etapas (equilírio, lavagem e eluição) foram efetuadas em pH 7,1. O protocolo fornecido foi modificado para uma etapa de ligação de um dia para o outro prolongado a 4°C. O eluato foi coletado em frações de 500 µL. As frações foram analisadas por Western Blots usando um anticorpo anti-rhEPO da Santa Cruz ou um Kit de ELISA de EPO de murino (R&D). Imidazol foi removido das frações contendo proteína usando colunas dessalinizadoras HiTrap® (5 mL) da Amersham Biosciences de acordo com o protocolo dos fabricantes. Isso incluiu uma alteração do tampão para PBS.

Western Blot

Um gel SDS 16% foi preparado usando protocolos padronizados e correu a 110 V. O "blot" foi feito em membranas de nitrocelulose por 45 min a 200 mA. O "blot" foi bloqueado por pelo menos uma hora em tampão de bloqueio contendo 5% de leite em pó desnatado em 0,1% de Tween-20. A incubação com o primeiro anticorpo (IgG policlonal de coelho EPO (H-162)

sc-7956, Santa Cruz, 1:500) foi efetuada de um dia para o outro a 4°C. O anticorpo secundário (HRP anti-coelho de cabra; 1:1000) foi adicionado por 2 horas em temperatura ambiente. O "blot" foi descrito pelo uso de Luminol; as fotos foram expostas por 2 minutos. As membranas oram manchadas com Vermelho Ponceau. O anticorpo EPO específico foi capaz de detectar todas as variantes EPO.

Ensaio de formação de colônia eritróide

Células da medula óssea foram coletadas da tíbia e fêmur de camundongos machos C57BL/6 (8 – 11 semanas) e ressuspensas em meio α (suplementado com 10% de soro de bezerro fetal GOLD, 1% de penicilina/estreptavidina e 1% de L-glutamina). As células foram semeadas em placas de Petri de 35 mm² (225.000 células/placa) contendo 8 partes de metilcelulose Metho Cult SF 3236 ((StemCell Technologie Inc), 1 parte de células e 2 partes de meio α misturado com meio pré-condicionado de célula HEK contendo os derivados EPO (150 U/L no caso de EPO de murino). 150 U/L de rhEPO (Roche) foi usado como controle positivo. As placas foram incubadas a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ por 48 horas. Para avaliação, somente as colônias avermelhadas contendo pelo menos 6 células hemoglobinizadas foram levadas em consideração.

Potencial hematopoiético das variantes EPO

Metho Cult SF 3236 dispara a formação de colônias (CFU-M, CFU-G ou CFU-E) somente depois da adição das citocinas apropriadas. A formação da CFU-E (unidade de eritroblasto formadora de colônia) pode ser observada, depois da adição de eritropoietina, depois de 2 dias. As pequenas colônias avermelhadas irregulares desaparecem pelo dia 3.

Nesse ensaio, o potencial hematopoiético das variantes foi testado e comparado com a forma de tipo selvagem do EPO, assim como do rhEPO. As seguintes condições foram preparadas por comparação: meio das células HEK transfetado com pZ/EG como controle negativo, meio das células HEK transfetado com células pZ/EG mais 150 U/L de rhEPO (Roche) como um controle positivo, e meio das células HEK transfetado ou com pZ/EG-EPO-IRES (150 U/L de EPO murino), pZ/EG-união-IRES (vari-

ante S; mS) ou pZ/EG-G3-IRES (variante G3; mG3). Na DIV2 somente as colônias avermelhadas foram contadas contendo pelo menos 6 células hemoglobinizadas. Os resultados dos três experimentos independentes estão demonstrados na figura 5.

5 Em comparação com EPO de murino e rhEPO, as variantes de EPO de murino (variante mG3 e mS) não tiveram potencial hematopoietico.

Culturas neuronais primárias

Culturas neuronais primárias de rato foram obtidas dos E16 até os embriões iniciais E19 de ratos Wistar (Bundesinstitut fur gesundheitlichen

10 Verbraucherschutz und Veterinarmedizin, Berlim, Alemanha). Os neurônios de camundongo que expressam Cre foram obtidos dos embriões E16 de camundongos transgênicos heterozigóticos expressando Cre-recombinase sob o controle do promotor α -1 de tubulina (fornecido pelo Dr. U. Schweitzer; Experimental Endocrinology, Charité). Culturas de rato e murino foram preparadas de acordo com um protocolo modificado de Brewer (1995) *J Neurosci Res.* 42: 674-83. O córtex cerebral foi isolado depois da remoção das meninges e rinsado duas vezes em PBS (Biochrom, Berlim, Alemanha). Depois de 15 min de incubação em tripsina/EDTA (0,05/0,02% p/v em PBS) a 37°C, os tecidos foram rinsados duas vezes em N-Med (meio Eagle modificado da Gibco com 10% de soro de bezerro fetal, 100 U de penicilina mais estreptomicina da Biochrom, L-glutamina 2 mM, 100 IE de insulina/L, HEPES 10 mM e glicose 44 mM) e dissociados cuidadosamente em um pequeno volume de N-med usando uma pipeta Pasteur. As células foram peletizadas em temperatura ambiente por 2 min de centrifugação a 210 g e ressuspensas em meio iniciador NBM (meio neurobasal da Gibco com B27 2% suplementado da Gibco, 1% de Pen/Strep, L-glutamina 0,5 mM e glutamato 25 μ M).

Preparação de placas de cultura

Placas de 24 cavidades e placas de 6 cavidades foram pré-tratadas por incubação de um dia para o outro a 4°C com poli-L-lisina da Bi-

30 ochrom (2,5 μ g/mL em PBS). A rinsagem das cavidades com PBS foi seguida por 1 h de incubação a 37°C com meio de revestimento (meio Eagle modificado com 5% de FCS Gold de PAA, 1% de Pen/Strep, HEPES 10 mM e

0,03 p/v de colágeno G da Biochrom), a seguir as cavidades foram cuidadosamente rinsados duas vezes com PBS. O volume e o tipo do meio de plaqueamento foram escolhidos dependendo do procedimento experimental.

Privação de oxigênio glicose em neurônios corticais primários de rato – um

5 modelo de cultura celular de isquemia cerebral

Para OGD, o meio de cultura foi removido por lavagem pela rinsagem de uma vez com PBS. OGD foi induzida com 500 μ L de uma solução aglicêmica desoxigenada (BSS_0-O_2 ; 143,8 mM de Na^+ , 5,5 mM de K^+ , 1,8 mM de Ca^{2+} , 0,8 mM de Mg^{2+} , 125,3 mM de Cl^- , 26,2 mM de HCO_3^- e 0,8 mM de SO_4^{2-} , pH 7,4) em uma atmosfera hipóxica gerada por um incubador que não permite a entrada ou saída de gás umidificado (Concept 400, Ruskin Technologies, Bridgend, RU) esguichado com uma mistura de gás contendo 5% de CO_2 , 85% de N_2 e 10% de H_2 . O tempo de OGD dependeu da densidade e da idade da cultura e variou entre 2 h 30 min e 2 h 40 min. Em 10 experimentos de controle, as cavidades foram tratadas com 500 μ L da solução de BSS_0 glicêmica oxigenada (BSS_0+O_2 ; 143,8 mM de Na^+ , 5,5 mM de K^+ , 1,8 mM de Ca^{2+} , 0,8 mM de Mg^{2+} , 125,3 mM de Cl^- , 26,2 mM de HCO_3^- , 0,8 mM de SO_4^{2-} e 20 mM de glicose, pH 7,4) e incubados a 37°C em uma atmosfera normóxica contendo 5% de CO_2 . Imediatamente após OGD, os 15 controles e as células tratadas foram alterados da solução de BSS para 500 μ L de meio contendo 40% de NBM condicionado mais 60% de NBM fresco. Depois de 24 h, a atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi medida nos 20 sobrenadantes como um indicador de morte celular.

Para a medição de LDH, 25 μ L de meio foi misturado com 100 μ L de solução de β -NADH fresco (0,15 mg/mL em tampão 1 x LDH; Sigma, forma reduzida) em placa de 96 cavidades (Greiner). 25 μ L de piruvato 22,7 mM (Sigma) foi adicionado imediatamente antes da colocação da placa no leitor (Thermo Labsystems; MRX^{TC} Revelation). Os parâmetros foram escolhidos como se segue: filtro de 340 nm, tempo de agitação: 5 seg, intervalo: 30 seg, contagens: 10. A concentração de LDH foi calculada proporcionalmente ao padrão de LDH (Greiner, calibrador de sistema).

Indução da neuroproteção por meio condicionado a partir de células HEK293

transfetadas expressando variantes EPO

Nos seguintes experimentos rhEPO (EPO recombinante humano da Sigma Aldrich, Deisen-hofen, Alemanha) foi usado como um controle positivo. Ensaios de neuroproteção estão esquematicamente demonstrados na figura 6. Os neurônios foram plaqueados em placas de 24 cavidades em uma densidade de 300.000 células em um volume final de 600 μ L de meio iniciador NBM. Depois de 4 dias, 200 μ L do meio foram substituídos por 250 μ L de NBM fresco (o mesmo que o NBM iniciador sem glutamato).

Para o pré-tratamento com rhEPO, mEPO de tipo selvagem, hEPO de tipo selvagem ou variantes EPO, o meio foi removido até um volume final de 200 μ L e enchido com 200 μ L de NBM+B27 contendo quantidades equimolares (correspondendo a 200 U/L de rhEPO) de EPO e variantes EPO, respectivamente. Concentrações equivalentes das várias variantes EPO (assim como mEPO e hEPO) no meio condicionado de células HEK293 foram estimadas por Western blot e Elisa-EPO. Depois disso, os neurônios cresceram por 48 h sob condições umidificadas e normóxicas a 37°C antes da privação de oxigênio e glicose (OGD) ser efetuada (intervalo de OGD conforme indicado). A morte celular foi avaliada 24 h depois de OGD pela medição da liberação de LDH. A redução na liberação de LDH, em comparação com os neurônios falsamente tratados (meio das células HEK293 transfetado com o plasmídeo da estrutura; ko; 100%) é uma medida quantitativa da neuroproteção. Em todos os experimentos observou-se um efeito neuroprotetor mais robusto fornecido pelas variantes EPO, se comparado com EPO do tipo selvagem (wt) (ver figura 7 painel A e B para EPO de murino e suas variantes e figura 8 painel A e B para EPO humano e suas variantes).

A neuroproteção induzida pelas variantes de EPO de murino é mais robusta do que aquela induzida pelo EPO (rhEPO assim como EPO de camundongo do tipo selvagem). Por exemplo, a neuroproteção mediada por EPO pode somente ser observada em uma janela claramente definida de extensão OGD (correspondendo a um nível de dano claramente definido). Em baixa concentração, a neuroproteção por hS3 e hS4 foi igual ou melhor à neuroproteção de wt hEPO. no total, a neuroproteção induzida pelas varian-

tes é mais forte do que aquela induzida pelo rhEPO. Além disso, as variantes têm um potencial neuroprotetor mais elevado do que tanto as formas do tipo selvagem mEPO quanto hEPO, as quais foram produzidas pelo mesmo procedimento que as variantes EPO.

5 H9c2 – modelo de isquemia

A linhagem celular de mioblasto de coração BDIX de rato (obtida da European Collection of Cell Cultures) foi cultivada em DMEM (biochrom) contendo 4,5 g/L de glicose suplementado com L-glutamina 2 mM, 10% de soro de bezerro fetal inativado e 1% de penicilina-estreptavidina. Culturas 10 subconfluentes (70%) foram subcultivadas 1:4. As células foram plaqueadas em 400 µL de meio contendo hEPO ou hS3 120 pM, respectivamente, em uma densidade de 15.000 células por cavidade em placas de 24 cavidades e cultivadas por 48 horas. Hipóxia foi alcançada pelo cultivo das células em 400 µL de DMEM deficiente de soro contendo 4,5 g/L de glicose suplementado com L-glutamina 2 mM e 1% de penicilina/estreptavidina e deixando-as por 24 horas em uma estação de trabalho anaeróbica (Concept 400, Ruskinn Technologies, Bridgend, RU) saturada com uma mistura de gás contendo 15 5% de CO₂, 85% de N₂ e 10% de H₂ a 37°C. As células de controle foram deixadas em DMEM deficiente de soro em um incubador normóxico. No fim 20 do experimento o meio foi substituído para 400 µL de DMEM deficiente de soro fresco e LDH foi medida de acordo com os protocolos padronizados 24 horas antes.

Imunoprecipitação

Camundongos 129S6 machos ou camundongos C57Bl6 machos 25 (8 – 10 semanas, Bundesinstituts fur Risikobewertung, Berlim) com livre acesso para comida e água foram usados para os experimentos. CoCl₂ foi injetado subcutaneamente em uma dose de 60 mg/Kg e os animais foram mortos 18 horas mais tarde. A expressão de proteína foi medida nos extratos de proteína de soro, rim e cérebro por um ELISA comercialmente disponível 30 (R&D, mEPO).

Anticorpos para a imunoprecipitação foram comprados da R&D (anticorpo anti-mEPO, cabra, marcado com biotina) e Santa-Cruz (anti-

rhEPO, coelho). A imunoprecipitação foi efetuada de acordo com os protocolos padronizados e avaliada por western blot).

O bloqueio do anticorpo de detecção do western blot foi conseguido por duas horas de incubação com 10 µg de darbpoietina A em temperatura ambiente antes da incubação em "blot".

Geração de mutantes de alfa-hélice (figura 10)

Mutantes de alfa-hélice humanos foram todos gerados por aproximações baseadas em PCR usando protocolos padronizados.

Mutante A (hAmA) e mutante E (hAmE) são variantes da alfa-hélice com troca de aminoácido na posição 41 (arginina). A sequência de CDNA foi alterada de AGG para GCG para o mutante A (alanina) ou para GAG para o mutante E (glutamato) – 20aa e -10aa são variantes de anulação da alfa-hélice sem 20 aminoácidos ou 10 aminoácidos, respectivamente, no c-terminal. Todos os mutantes foram gerados sem V5 e sinalizados com His e expressos em células HEK 293. Experimentos de neuroproteção foram efetuados conforme descrito anteriormente usando meio de células HEK transfetado expressando as diferentes variantes.

Citoproteção mediada por hEPO e hS3 em um modelo de isquemia em células H9c2 (figura 11)

O potencial citoprotetor das variantes EPO foi mostrado de forma exemplar para hEPO e hS3 purificado em um modelo de isquemia consistindo em privação de soro e hipóxia em mioblastos cardíacos H9c2 (figura 1). A liberação de LDH foi avaliada como um marcador de morte celular apoptótica. Descobriu-se capacidades citoprotetoras para ambas as variantes (aproximadamente 20% e 25% para hEPO e hS3).

Imunoproteção descreve a isoforma de união EPO em extratos de proteína de rim de camundongos tratados com CoCl₂ (figura, 12)

Para reforçar nossa descoberta das isoformas de união EPO em tecidos de murino e humano por uma aproximação baseada em PCR efetuou-se a imunoprecipitação no soro de murino, extratos de proteína de cérebro e rim de camundongos tratados com CoCl₂ usando anticorpos testados para reconhecer ambas as isoformas. Injeção subcutânea de CoCl₂ é co-

nhecida por aumentar os níveis de eritropoietina em vários tecidos de camundongo, a saber sangue, cérebro, fígado e rim.

Foi-se capazes de precipitar eritropoietina (aproximadamente 40 KDa) de extratos de proteína de soro, cérebro e rim de camundongos tratados de CoCl_2 (figura 2); a precipitação de eritropoietina de um extrato de proteína de rim de um camundongo não-tratado falhou devido ao baixo nível de expressão. Além disso, foi-se capaz de provar a existência de uma segunda proteína menor (aproximadamente 30 KDa) no extrato de proteína de rim de camundongos tratados com CoCl_2 . Essa proteína é especificamente reconhecida pelo anticorpo anti-rhEPO conforme mostrado pelo bloqueio completo da interação antígeno-anticorpo com Darbpoietina A. Essas descobertas suportam fortemente a existência de uma isoforma de união de eritropoietina de murino. Esses resultados foram produzidos em uma segunda cepa de camundongo, a saber, C57Bl6.

15 Neuroproteção mediada por diferentes isoformas da alfa-hélice de eritropoietina (figura 13)

Analisando os potenciais neuroprotetores das variantes de eritropoietina até aqui identificadas sugeriu-se que a alfa-hélice é o domínio funcionalmente importante para o caráter neuroprotetor da eritropoietina. 20 Para testar essa hipótese, expressou-se uma forma encurtada de eritropoietina humana, a saber o domínio alfa-hélice, em células HKE 293 e testou-se esse peptídeo no modelo de OGD. Descobriu-se um potencial protetor equivalente com 30 pM e 15 pM desse peptídeo para 30 pM do hEPO conforme mostrado na figura 13.

25 Para identificar os resíduos funcionais importantes nos domínios de alfa-hélice de eritropoietina humana gerou-se diferentes mutantes de eritropoietina contendo ou trocas de aminoácido (hAmA e hAmE) ou anulações de domínio completas (hA-10 e hA-20).

Nem a troca de aminoácido neutro ou ácido na posição 41 foi 30 capaz de destruir o potencial neuroprotetor da alfa-hélice no nosso modelo OGD (figura 14).

Neuroproteção mediada por várias isoformas de EPO humano (n

= 6) $P^* < 0,05$; ANOVA1 versus controle (figura 14).

Variantes de anulação sem 10 ou 20 aminoácidos no c-terminal da alfa-hélice foram expressas em células HEK293 e também testadas no modelo de OGD. A variante de anulação hA-10 ainda tinha propriedades 5 neuroprotetoras compráveis com a isoforma de união de hS3. A anulação de 20 aminoácidos (hA-20) levou a um peptídeo que não foi mais protetor (figura 15).

Imunomodulação por variantes de eritropoietina humana (figura 16)

As variantes de EPO humano hS3 e hS4 exibem fortes efeitos 10 imunomodulatórios. Nos macrófagos humanos estimulados com a endotoxina lipopolissacarídeo (LPS) hS3 e hS4 induzem a citocina antiinflamatória IL-10 e reduzem a expressão das citocinas proinflamatórias IL-6 e IL-8. Em comparação o EPO, os efeitos antiinflamatórios de hS3 e hS4 são muito 15 mais pronunciados. Essas propriedades antiinflamatórias das variantes EPO são úteis no tratamento de doenças inflamatórias (por exemplo, esclerose múltipla, infecções virais e bacterianas, sepsia) e degenerativas (por exemplo, apoplexia, enfartes do miocárdio).

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

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

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

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

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

Arg Thr Gly Asp Arg
160 164

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

<400> 3
atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60
ctgggcctcc cagtcctggg cgcggccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120
aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cgggctgtgc tgaacactgc 180
agcttgaatg agaatatcac tgcctccagac accaaagtta atttctatgc ctggaaagagg 240
atggaggctcg ggcagcaggc cctgttggtc aactcttccc agccgtggga gcccctgcag 300
ctgcattgtgg ataaagccgt cagttggcatt cgcagcctca ccactctgct tcgggctctg 360
ggagcccaga aggaagccat ctccccctcca gatgcggcct cagctgctcc actccgaaca 420
atcaactgctg acactttccg caaactcttc cgagtctact ccaatttctt ccggggaaag 480
ctgaagctgt acacagggga ggcctgcagg acaggggaca gatga 525

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

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 5
 atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60
 ctgggcctcc cagtccctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120
 aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cgggctgtgc tgaacactgc 180
 agcttgaatg agaatatcac tgtcccagac accaaagtttta atttctatgc cctgttggtc 240
 aactcttccc agccgtggga gcccctgcag ctgcattgtgg ataaagccgt cagtggcctt 300
 cgcagccctca ccactctgct tcgggctctg ggagcccaga aggaagccat ctccccctccca 360
 gatgcggcct cagctgtcc actccgaaca atcactgtg acactttccg caaactcttc 420
 cgagtctact ccaatttcct ccggggaaag ctgaagctgt acacagggga ggcctgcagg 480
 acaggggaca gatga 495

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

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Gly Asp Arg

<210> 7
 <211> 489
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7

atgggggtgc acgaatgtcc tgccctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60

ctggggcctcc cagtccctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120

aggtacacctt tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cgggctgtgc tgaacactgc 180

agcttgaatg agaatatcac tgcgtccagac accaaagtta atttctatgc ctggaaaggagg 240
 atggagccgt gggagccct gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg ctttcgcagc 300
 ctcaccactc tgcttcgggc tctgggagcc cagaaggaag ccatctcccc tccagatgctg 360
 gcctcagctg ctccactccg aacaatcaact gctgacactt tccgcaaact cttccgagtc 420
 tactccaatt tcctccgggg aaagctgaag ctgtacacag gggaggcctg caggacaggg 480
 gacagatga 489

<210> 8
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Arg

<210> 9
 <211> 475
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60
 ctgggcctcc cagtcctggg cgcacccacca cgcctcatct gtgacagccg agtccctggag 120
 aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cgggctgtgc tgaacactgc 180
 agcttgaatg agaatatcac tgtcccaaggc cctgttggtc aactctccc agccgtggaa 240
 gcccctgcag ctgcatgtgg ataaagccgt cagtgccctt cgccgcctcc ccactctgct 300
 tcgggctctg ggagccaga aggaagccat ctccctcca gatgcggcct cagctgtcc 360
 actccgaaca atcaactgctg acactttccg caaactcttc cgagtctact ccaatttcct 420
 ccggggaaag ctgaagctgt acacagggga ggcctgcagg acaggggaca gatga 475

<210> 10
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

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

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

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

Ala Pro Ala Ala Ala Cys Gly
 85

<210> 11
 <211> 301
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60

ctgggcctcc cagtcctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtccctggag 120
 aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cgggctgtgc tgaacactgc 180
 agcttgaatg agaacaatca ctgctgacac tttccgcaaa ctcttccgag tctactccaa 240
 tttccctccgg ggaaagctga agctgtacac aggggaggcc tgcaggacag gggacagatg 300
 a 301

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

<400> 12

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

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

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

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

Asn Asn His Cys
 65

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

<400> 13
 atgggggtgc ccgaacgtcc caccctgtcg cttttactct ctttgctact gattcctctg 60
 ggcctccag tcctctgtgc tccccacgc ctcatctgctg acagtcgagt tctggagagg 120
 tacatcttag aggccaagga ggcagaaaaat gtcacgatgg gttgtgcaga aggtcccaga 180
 ctgagtggaa atattacagt cccagatacc aaagtcaact tctatgttg gaaaaaaatg 240
 gagaaggaat tgatgtcgcc tccagatacc accccacctg ctccactccg aacactcaca 300
 gtggatactt tctgcaagct ctccccggtc tacgccaact tctccgggg gaaaactgaag 360
 ctgtacacgg gagaggtctg caggagaggg gacaggtga 399

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

ctgggcctcc	cagtcctggg	cgccccacca	cgccatct	gtgacagccg	agtccctggag	120
aggtaacctct	tggaggccaa	ggaggccgag	aatatcacga	cgggctgtgc	tgaacactgc	180
agtttaatg	agaacaatca	ctgctgacac	tttccgc当地	cttcccgag	tctactccaa	240
tttccctccgg	ggaaagctga	agctgtacac	aggggaggcc	tgcaggacag	gggacagatg	300
a						301

<210>	12
<211>	68
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<400>	12

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

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

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

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

Asn	Asn	His	Cys
			65

<210>	13					
<211>	399					
<212>	DNA					
<213>	Mus musculus					
<400>	13					
atgggggtgc	ccgaacgtcc	caccctgtcg	cttttactct	ccttgctact	gattcctctg	60
ggcctccag	tcctctgtgc	tcccccacgc	ctcatctgctg	acagtcgagt	tctggagagg	120
tacatcttag	aggccaagga	ggcagaaaaat	gtcacgatgg	gttgtccaga	aggccccaga	180
ctgagtggaa	atattacagt	cccgataacc	aaagtcaact	tctatgttg	aaaaagaatg	240
gagaaggaat	tgtatgtgcc	tccagataacc	accccacctg	ctccactccg	aacactcaca	300
gtggatactt	tctgcaagct	cttccgggtc	tacgccaact	tcctccgggg	gaaaactgaag	360
ctgtacacgg	gagaggtctg	caggagaggg	gacaggtga			399

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

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg	Gly	Asp	Arg
		130	

<210> 15

<211> 387

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 15

atgggggtgc ccgaacgtcc caccctgctg ctttactct ctttgcactt gatccctctg 60

ggcctcccaag tcctctgtgc tccccacgc ctcatctgcg acagtcgagt tctggagagg 120

tacatcttag aggccaagga ggcagaaaaat gtcacgatgg gttgtgcaga aggtcccaga 180

ctgagtgaaa atattacagt cccagatacc aaagtcaact tctatgcttg gaaaagaatg 240

gaggtgaaag aacaggccat agaagtttgg caaggcctgt ccctgcttc agaagccatc 300

ctgcaggccc aggcctgtc agccaaacttc ctccggggga aactgaagct gtacacggga 360

gaggtctgca ggagagggga caggtga 387

<210> 16

<211> 128

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17

<211> 513

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 17

atgggggtgc ccgaacgtcc caccctgctg cttttactct ctttgctact gattcctctg

60

ggcctcccaag tcctctgtgc tccccacgc ctcatctgctg acagtcgagt tctggagagg

120

tacatcttag aggccaagga ggcagaaaat gtcacgatgg gttgtgcaga aggtcccaga

180

ctgagtgaaa atattacagt cccagatacc aaagtcaact tctatgctt gaaaagaatg

240

gaggtggaag aacaggccat agaagtttgg caaggcctgt ccctgctctc agaagccatc

300

ctgcaggccc aggcctgct agccaattcc tcccagccac cagagaccct tcagcttcat

360

atagacaaag ccatcagtgg tctacgtacg ctcacttac tgcttcgggt actggggagct

420

cagaaggaat tgatgtcgcc tccagatacc accccacctg ctccactccg aacactcaca

480

gtggatactt tctgcaggag aggggacagg tga

513

<210> 18

<211> 170

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 19

<211> 279

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 19

atgggggtgc	ccgaacgtcc	caccctgctg	cttttactct	ccttgctact	gattcctctg	60
ggcctccca	tcctctgtgc	tccccacgc	ctcatctgcg	acagtcgagt	tctggagagg	120
tacatcttag	aggccaagga	ggcagaaaaat	gtcacgtatgg	gttgtgcaga	aggcccaga	180
ctgagtgaaa	atattacagt	cccagatacc	aaagtcaact	tcctccgggg	gaaactgaag	240

ctgtacacgg gagaggtctg caggagaggg gacaggtga 279

<210> 20
<211> 92
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 20

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

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

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

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

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

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

<210> 21
<211> 591
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 21
atgggggtgc ccgaacgtcc caccctgtcg cttttactct ctttgctact gattcctctg 60
ggcctccag tcctctgtgc tccccacgc ctcatctgct acagtcgagt tctggagagg 120
tacatcttag aggccaagga ggcagaaaaat gtcacgatgg gttgtgcaga aggtcccaga 180
ctgagtgaaa atattacagt cccagatacc aaagtcaact tctatgcttg gaaaagaatg 240
gaggtgaaag aacaggccat agaagtttg caaggcctgt ccctgctctc agaagctgta 300
cacgggagag gtctgcagga gaggggacag gtgacatgct gctgccaccg tgggtggaccg 360
acgaacttgc tccccgtcac tgtgtcatgc caaccctcca ccactccaa ccctcatcaa 420
acgggtcatt accttcttac cagtctgtcc catggacact ccagcaccag cagtgacatc 480
ctcggggcca gaagaacttc ccagagctcc attctgaaat ctaaagatgt cgctggacaa 540
gccccaggcc ccagagaaga agagcctcag aatcagctcg gatgggttta g 591

<210> 22
<211> 196

<212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Gly Phe Val
 195

<210> 23
 <211> 159
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 23

atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgcctgtct gtcgctccct 60
 ctgggcctcc cagtcctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120
 aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacg 159

<210> 24
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

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

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

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

Ala Glu Asn Ile Thr
 50

<210> 25
 <211> 225
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgcctgtct gtcgctccct 60
 ctgggcctcc cagtcctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120
 aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacg cgggctgtgc tgaacactgc 180
 agcttgaatg agaatatcac tgcctccagac accaaagtta atttc 225

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

<400> 26

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

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

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

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

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

Met Glu

<210> 27
 <211> 243
 <212> DNA
 <213> *Mus musculus*

<400> 27
 atgggggtgc ccgaacgtcc caccctgctg cttttactct ccttgctact gattcctctg 60
 ggcctcccaag tcctctgtgc tcccccacgc ctcatctgcg acagtcgagt tctggagagg 120
 tacatcttag aggccaagga ggcagaaaat gtcacgatgg gttgtgcaga aggtcccaga 180
 ctgagtgaaa atattacagt cccagatacc aaagtcaact tctatgcttg gaaaagaatg 240
 gag 243

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

<400> 28

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

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

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

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

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

Glu

<210> 29
 <211> 326

<212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 29
 atgggggtgc ccgaacgtcc caccctgctg ctttactct cttgtact gattcctctg 60
 ggcctccag tcctctgtgc tcccccacgc ctcatctgctg acagtcgagt tctggagagg 120
 tacatcttag aggccaagga ggcagaaaat gtcacgatgg gttgtgcaga aggtcccaga 180
 ctgagtgaaa atattacagt cccagatacc aaagtcaact tctatgcttg gaaaagaatg 240
 gaggtgaaag aacaggccat agaagttgg caaggcctgt ccctgcttc agaagccatc 300
 ctgcaggccc aggcctgct agccaa 326

<210> 30
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

<210> 31
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 gtcgggcagc aggcgtaga agtctggcag ggcctggccc tgctgtcggg agctgtcctg 60
 cggggccagg ccctgttgttcaactttcc cagccgtggg agcccctgca gctgcatgtg 120
 gataaaagccg tcagttggct tcgcagcctc accactctgc ttctggctct gggagccag 180

aaggaagcca tctccctcc agatgcggcc tcagctgctc cactccgaac aatcaactgct 240
 gacactttcc gcaaactctt ccgagtctac tccaaattcc tccggggaaa gctgaagctg 300
 tacacagggg aggccctgcag gacaggggac agatga 336

<210> 32
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32

Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln
 20 25 30

Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu
 35 40 45

Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala
 50 55 60

Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr
 65 70 75

Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg
 80 85 90 95

Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 100 105 110

<210> 33
 <211> 234
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 cccctgcagc tgcatgtgga taaagccgtc agtggccttc gcagccctac cactctgctt 60
 cgggctctgg gagcccagaa ggaagccatc tcccctccag atgcggcctc agctgctcca 120
 ctccgaacaa tcactgctga cactttccgc aaactttcc gagtctactc caatttctc 180
 cggggaaagc tgaagctgta cacagggag gcctgcagga caggggacag atga 234

<210> 34
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu
1				5				10						15	

Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala
			20				25					30			

Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr
				35			40					45			

Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val	Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg
				50			55				60				

Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala	Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg
65					70			75				80			

<210> 35

<211> 156

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 35

aaggaattga tgtcgctcc agataaccacc ccacacctgctc cactccgaac actcacagtg 60

gatactttct gcaagctctt ccgggtctac gccaacttcc tccggggaa actgaagctg 120

tacacgggag aggtctgcag gagaggggac aggtga 156

<210> 36

<211> 51

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

Lys	Glu	Leu	Met	Ser	Pro	Pro	Asp	Thr	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro	Leu	Arg
1				5				10					15		

Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Phe	Cys	Lys	Leu	Phe	Arg	Val	Tyr	Ala	Asn
			20			25					30				

Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Val	Cys	Arg	Arg
			35			40			45						

Gly Asp Arg

50

<210> 37

<211> 61

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 37
 cttcctccgg gggaaaactga agctgtacac gggagaggc tgcaggagag gggacaggtg 60
 a 61

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

<400> 38

Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Val Cys Arg Arg
 1 5 10 15

Gly Asp Arg

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

<220>
 <223> PCR iniciador

<400> 39
 gaacttccaa ggatgaagac ttgcagc 27

<210> 40
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> PCR iniciador

<400> 40
 gtggcagcag catgtcacct gtc 23

<210> 41
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> PCR iniciador

<400> 41
 tatggatcca tgggggtgcc cgaacgtccc ac 32

<210> 42
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> PCR iniciador

<400> 42
tatggatctt cacctgtccc ctctcctgca gac

33

<210> 43
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR iniciador

<400> 43
gtcgtgactg ggaaaaccct ggcg

24

<210> 44
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR iniciador

<400> 44
agcggataac aatttcacac agga

24

<210> 45
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR iniciador

<400> 45
gatgggggtg cacgaatgtc ctgc

24

<210> 46
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR iniciador

<400> 46
cacacctggt catctgtccc ctgtc

25

<210> 47
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR iniciador

<400> 47

aaagaattcc ctgtccctc tcctgcagac ctc 33

<210> 48
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> PCR iniciador

<400> 48
 tatggatcca tgggggtgca cgaatgtcc 29

<210> 49
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> PCR iniciador

<400> 49
 agagaattct ctgtccctg tcctgcag 28

<210> 50
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50

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

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

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

Ala Glu Asn Ile Thr
 50

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

<220>
 <223> ponto de mutação do Homo sapiens

<400> 51

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

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

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

Ala Glu Asn Ile Thr
 50

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

<220>
 <223> ponto de mutação do Homo sapiens

<400> 52

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

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

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

Ala Glu Asn Ile Thr
 50

<210> 53
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> deleção mutante ha-10 do Homo sapiens

<400> 53

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

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

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

<210> 54
 <211> 33

<212> PRT
<213> artificial

<220>

<223> deleção mutante ha-20 do homo sapiens

<400> 54

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

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

Ile

<210> 55
<211> 159
<212> DNA
<213> homo sapiens

<400> 55
atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60
ctgggcctcc cagtcctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120
aggtaacctt tggaggccaa ggaggccgag aatatcacg 159

<210> 56
<211> 159
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> hAmA (hélice A da hWT-EPO da alanina mutante)

<400> 56
atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60
ctgggcctcc cagtcctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120
gcgtacacct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacg 159

<210> 57
<211> 159
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> hAmE (hélice A da hwt-EPO do ácido glutâmico mutante)

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

<210> 58
 <211> 129
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> hA-10 (hWT-EPO Hélia A minus 10aa)

<400> 58
 atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60
 ctggggctcc cagtcctggg cgccccacca cgccatctgt gacagccg agtcctggag 120
 aggtacctc 129

<210> 59
 <211> 99
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> hA-20 (hWT-EPO Hélia A minus 20aa)

<400> 59
 atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60
 ctggggctcc cagtcctggg cgccccacca cgccatctgt gacagccg agtcctggag 99

<210> 60
 <211> 78
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

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

<210> 61
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 61

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15

<210> 62
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 62

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

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly
20 25

<210> 63
<211> 81
<212> DNA
<213> homo sapiens

<400> 63
atgggggtgc acgaatgtcc tgccctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60
ctgggcctcc cagtcctggg c 81

REIVINDICAÇÕES

1. Variante da eritropoietina (EPO) que codifica um polinucleotídeo, selecionada do grupo consistindo em:
 - (a) polinucleotídeos que codificam pelo menos a forma madura dos polipeptídeos nomeados hs3, h1-4, h1-5, hs4, h1-1, h2-1, mS, mG3, mG5, m301 e mK3 com a seqüência de aminoácidos deduzida conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22, respectivamente;
 - 5 (b) polinucleotídeos com a seqüência codificante, conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21, codificando pelo menos a forma madura do polipeptídeo;
 - 10 (c) polinucleotídeo que codifica uma versão humanizada dos polipeptídeos mS, mG3, mG5, m301 e mK3 com a seqüência de aminoácidos deduzida conforme mostrado nas SEQ ID Nos: 14, 16, 18, 20 e 22,
 - 15 (d) polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo compreendendo uma fusão de uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo de seqüências de aminoácidos conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 24, 26, 28 e 30, no N-terminal de uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo de seqüências de aminoácidos conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 32, 34, 36 e 38;
 - 20 (e) polinucleotídeos compreendendo uma fusão de seqüências de polinucleotídeo selecionadas do grupo de seqüências de polinucleotídeo conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 23, 25, 27 e 29, 5' de uma seqüência de polinucleotídeo selecionada do grupo de seqüências de polinucleotídeo conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 31, 33, 35 e 37;
 - 25 (f) polinucleotídeos que codificam um derivado de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a) a (e), em que no referido derivado entre 1 e 10 resíduos de aminoácidos são conservativamente substituídos em comparação com o referido polipeptídeo, e o referido derivado tem atividade celular protetora e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoietica;
 - 30 (g) polinucleotídeos que codificam um fragmento de um polipep-

- tídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a) até (f), em que no referido fragmento entre 1 e 10 resíduos de aminoácidos são N- e/ou C-terminalmente anulados e/ou entre 1 e 10 aminoácidos são anulados N- e/ou C-terminalmente da junção em comparação com o referido polipeptídeo, e o referido fragmento tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente não tem atividade hematopoiética;
- 5 (h) polinucleotídeos os quais são pelo menos 50% idênticos a um polinucleotídeo conforme definido em qualquer um de (a) até (g) e os quais codificam para um polipeptídeo com atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética; e
- 10 (i) polinucleotídeos, o filamento complementar dos quais hibridiza sob condições estringentes em um polinucleotídeo conforme definido em qualquer um de (a) até (h) e o qual codifica para um polipeptídeo com atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;
- 15 ou o filamento complementar de tal polinucleotídeo.
2. Homólogo de uma variante de eritropoietina (EPO) que codifica um polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, a partir de outra espécie eucariótica superior.
- 20 3. Variante de eritropoietina (EPO) que codifica um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:
- (a) polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo variante E-PO, os quais compreendem a parte N-terminal do EPO de comprimento total 25 incluindo a hélice A, e os quais não têm pelo menos um dos seguintes:
- (i) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos entre a hélice A e a hélice B;
- (ii) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos de hélice B;
- (iii) um fragmento de pelo menos 2 aminoácidos entre a hélice B 30 e a hélice C;
- (iv) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos de hélice C;
- (v) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos entre as héli-

ces C e D; e/ou

- (vi) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos de hélice D; em que o referido variante tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;
- 5 (b) polinucleotídeos que codificam um derivado de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a), em que no referido derivado entre 1 e 10 resíduos de aminoácidos são conservativamente substituídos em comparação com o referido polipeptídeo, e o referido derivado tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;
- 10 (c) polinucleotídeos, o filamento complementar dos quais hibridiza sob condições estringentes em um polinucleotídeo conforme definido em qualquer um de (a) até (b) e o qual codifica para um polipeptídeo com atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;
- 15 ou o filamento complementar de tal polinucleotídeo.
4. Polinucleotídeo, como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, o qual é DNA, RNA ou DNA genômico.
- 20 5. Vetor contendo o polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4.
6. Vetor, de acordo com a reivindicação 5, no qual o polinucleotídeo está operativamente ligado às seqüências de controle de expressão, permitindo a expressão nas células hospedeiras procarióticas e/ou eucarióticas.
- 25 7. Célula hospedeira geneticamente projetada com o polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, ou ao vetor como definido na reivindicação 5 ou 6.
8. Animal não-humano transgênico compreendendo o polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, um vetor como definido na reivindicação 5 ou 6 e/ou uma célula hospedeira como definido na reivindicação 7.
- 30 9. Processo para produzir um polipeptídeo variante EPO codifi-

cado pelo polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, compreendendo: o cultivo da célula hospedeira como definido na reivindicação 7, e a recuperação do polipeptídeo codificado pelo referido polinucleotídeo.

5 10. Processo, de acordo com a reivindicação 9, compreendendo ainda a etapa de modificar a referida variante EPO, em que a modificação é selecionada de um grupo consistindo em oxidação, sulfatação, fosforilação, adição de oligossacarídeos ou combinações destes.

10 11. Processo para produzir células capazes de expressar pelo menos uma das variantes EPO compreendendo células geneticamente projetadas *in vitro* com o vetor como definido na reivindicação 5 ou 6, em que o(s) referido(s) polipeptídeo(s) da variante EPO é/são codificados pelo polinucleotídeo como definido nas reivindicações 1 a 4.

15 12. Polipeptídeo com a seqüência de aminoácidos codificada pelo polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou obtêvel pelo processo como definido na reivindicação 9 ou 10.

13. Anticorpo que se liga especificamente ao polipeptídeo como definido na reivindicação 12.

20 14. Composição farmacêutica compreendendo o polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, um vetor como definido na reivindicação 5 ou 6, uma célula hospedeira como definido na reivindicação 7, um polipeptídeo como definido na reivindicação 12, e/ou um anticorpo como definido na reivindicação 13, e um ou mais veículos farmacuticamente aceitáveis.

25 15. Uso do polinucleotídeo, como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, um vetor como definido na reivindicação 5 ou 6, uma célula hospedeira como definido na reivindicação 7, um polipeptídeo como definido na reivindicação 12, para a produção de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma condição associada com o dano tecidual devido à morte celular.

30 16. Uso, de acordo com a reivindicação 15, em que a referida morte celular é induzida por isquemia, hipóxia, infecção bacteriana, infecção

viral, auto-imunológica, traumática ou quimicamente induzida ou induzida por radiação.

17. Uso, de acordo com a reivindicação 15 ou 16, em que a referida condição é um distúrbio neurodegenerativo e/ou neuroinflamatório agudo ou crônico, é um distúrbio agudo ou crônico do coração, pulmão, rim, fígado ou pâncreas ou a referida condição está associada com um transplante de órgão ou célula.

18. Uso, de acordo com a reivindicação 17, em que o referido distúrbio neurodegenerativo e/ou neuroinflamatório agudo é selecionado do grupo consistindo em isquemia cerebral ou enfarte, incluindo oclusão embólica e oclusão trombótica, reperfusão após isquemia aguda, injúria isquêmica/hipóxica perinatal, parada cardíaca, hemorragia intracranial, hemorragia subaracnoidal e lesões intracraniais, lesões da corda espinal, lesões intravertebrais, síndrome infantil agitada por lesão em chicotada, encefalite infeciosa, meningite, dor de cabeça.

19. Uso, de acordo com a reivindicação 17, em que o referido distúrbio neurodegenerativo e/ou neuroinflamatório crônico é selecionado do grupo consistindo em demências, doença de Pick, doença do corpo de Lewy difuso, paralisia supranuclear progressiva (síndrome de Steele-Richardson), esclerose múltipla, atrofia do sistema múltipla, condições epiléticas crônicas associadas com neurodegeneração, doenças neuronais motoras, ataxias degenerativas, degeneração basal cortical, complexo demência de ALS-Parkinson de Guam, panencefalite esclerosante subaguda, doença de Huntington, doença de Parkinson, sinucleinopatias, afasia progressiva primária, degeneração estriatonigral, doença de Machado-Joseph/ataxia espinocerebelar tipo 3 e degenerações olivopontocerebelares, doença de Gilles de La Tourette, paralisia bulbar e pseudobulbar, atrofia muscular espinal e espino-bulbar (doença de Kennedy), esclerose lateral primária, paraplegia espástica familiar, doença de Werdnig-Hoffmann, doença de Kugelberg-Welander, doença de Tay-Sach, doença de Sandhoff, doença espástica familiar, paraparesse espástica, leucoencefalopatia multifocal progressiva, disautonomia familiar (síndrome de Riley-Day), polineuropatias, doenças de prón, desejo

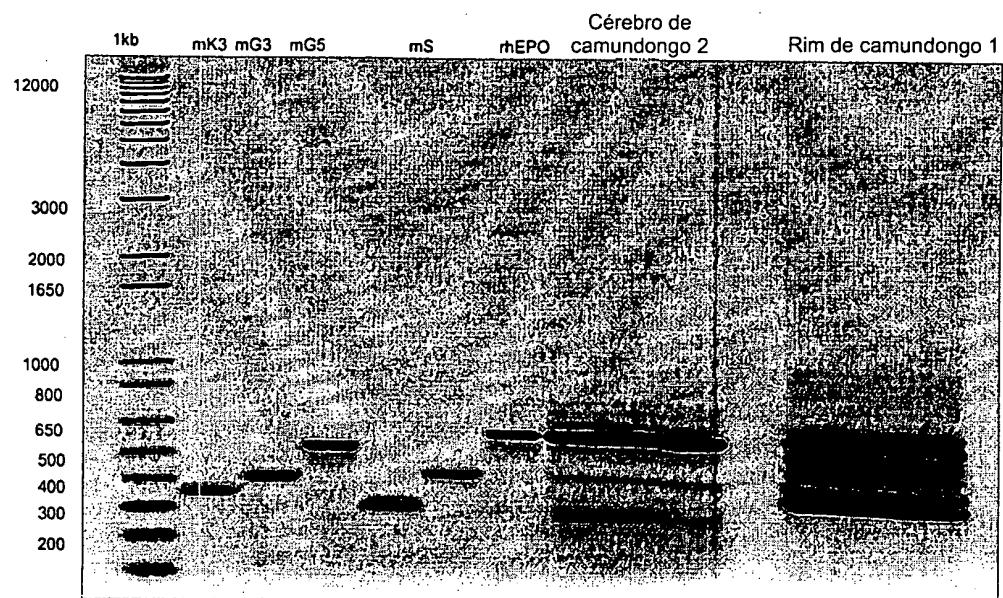
compulsivo, distúrbios afetivos, distúrbios esquizofrênicos, síndrome da fadiga crônica, dor crônica.

20. Uso, de acordo com a reivindicação 15 ou 16, em que a referida condição é o envelhecimento.

5 21. Uso, de acordo com as reivindicações 15 a 20, em que o medicamento é administrado antes de ou depois do início da referida condição.

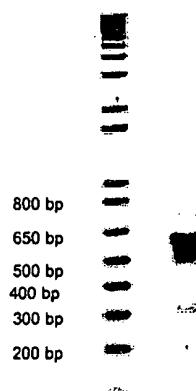
Fig. 1

A



B

1 kb EPO PCR (rim humano)



2/21

Fig. 2a

mEpo	atgggggtgcccgaacgtcccaccctgctgctttactctccttgcactgattc	55
mS	atgggggtgcccgaacgtcccaccctgctgctttactctccttgcactgattc	55
mG3	atgggggtgcccgaacgtcccaccctgctgctttactctccttgcactgattc	55
mG5	atgggggtgcccgaacgtcccaccctgctgctttactctccttgcactgattc	55
m301	atgggggtgcccgaacgtcccaccctgctgctttactctccttgcactgattc	55
mK3	atgggggtgcccgaacgtcccaccctgctgctttactctccttgcactgattc	55
mEpo	ctctgggcctcccagtccctgtgtctccacgcctcatctgcgcacagtcgagt	110
mS	ctctgggcctcccagtccctgtgtctccacgcctcatctgcgcacagtcgagt	110
mG3	ctctgggcctcccagtccctgtgtctccacgcctcatctgcgcacagtcgagt	110
mG5	ctctgggcctcccagtccctgtgtctccacgcctcatctgcgcacagtcgagt	110
m301	ctctgggcctcccagtccctgtgtctccacgcctcatctgcgcacagtcgagt	110
mK3	ctctgggcctcccagtccctgtgtctccacgcctcatctgcgcacagtcgagt	110
mEpo	tctggagaggtacatcttagaggccaaggaggcagaaaatgtcacgtgggtgt	165
mS	tctggagaggtacatcttagaggccaaggaggcagaaaatgtcacgtgggtgt	165
mG3	tctggagaggtacatcttagaggccaaggaggcagaaaatgtcacgtgggtgt	165
mG5	tctggagaggtacatcttagaggccaaggaggcagaaaatgtcacgtgggtgt	165
m301	tctggagaggtacatcttagaggccaaggaggcagaaaatgtcacgtgggtgt	165
mK3	tctggagaggtacatcttagaggccaaggaggcagaaaatgtcacgtgggtgt	165
mEpo	gcagaaggcccagactgagtgaaaatattacagtcccagataccaa <u>gtcaact</u>	220
mS	gcagaaggcccagactgagtgaaaatattacagtcccagataccaa <u>gtcaact</u>	220
mG3	gcagaaggcccagactgagtgaaaatattacagtcccagataccaa <u>gtcaact</u>	220
mG5	gcagaaggcccagactgagtgaaaatattacagtcccagataccaa <u>gtcaact</u>	220
m301	gcagaaggcccagactgagtgaaaatattacagtcccagataccaa <u>gtcaact</u>	220
mK3	gcagaaggcccagactgagtgaaaatattacagtcccagataccaa <u>gtcaact</u>	220
mEpo	<u>tctatgcttgaaaagaatggaggtgagaagaacaggccatagaagttggcaagg</u>	275
mS	<u>tctatgcttgaaaagaatggag-----</u>	243
mG3	<u>tctatgcttgaaaagaatggaggtgagaagaacaggccatagaagttggcaagg</u>	275
mG5	<u>tctatgcttgaaaagaatggaggtgagaagaacaggccatagaagttggcaagg</u>	275
m301	<u>tc-----</u>	222
mK3	<u>tctatgcttgaaaagaatggaggtgagaagaacaggccatagaagttggcaagg</u>	275
mEpo	cctgtccctgctctcagaagccatcctgcaggcccaggccctgctagccaattcc	330
mS	-----	-
mG3	cctgtccctgctctcagaagccatcctgcaggcccaggccctgctagcca-----	326
mG5	cctgtccctgctctcagaagccatcctgcaggcccaggccctgctagccaattcc	330
m301	-----	-
mK3	cctgtccctgctctcagaagc-----	296
mEpo	tcccagccaccagagacccttcagttcatatagacaaagccatcagtggctac	385
mS	-----	-
mG3	-----	-
mG5	tcccagccaccagagacccttcagttcatatagacaaagccatcagtggctac	385
m301	-----	-
mK3	:-----	-

3/21

Fig. 2b

mEpo	gtagcctcacttcaactgcttcgggtactggagctcagaaggaattgtatgtcgcc	440
mS	-----aaggaattgtatgtcgcc	260
mG3	-----	
mG5	gtagcctcacttcaactgcttcgggtactggagctcagaaggaattgtatgtcgcc	440
m301	-----	
mK3	-----	
mEpo	tccagataccacccacactgctccactccgaacactcacagtggatactttctgc	495
mS	tccagataccacccacactgctccactccgaacactcacagtggatactttctgc	315
mG3	-----	
mG5	tccagataccacccacactgctccactccgaacactcacagtggatactttctgc	495
m301	-----	
mK3	-----	
mEpo	aagctttccgggtctacgcca <u>acttcc</u> ctccggggaa <u>act</u> taagctgtacacgg	550
mS	aagctttccgggtctacgcca <u>acttcc</u> ctccggggaa <u>act</u> taagctgtacacgg	370
mG3	-----cttcc <u>ctccggggaa</u> actgaagctgtacacgg	358
mG5	a-----	496
m301	-----ctccggggaa <u>act</u> taagctgtacacgg	250
mK3	-----tgtacacgg	305
mEpo	gagaggctctgcaggagagggacaggtga	579
mS	gagaggctctgcaggagagggacaggtga	399
mG3	gagaggctctgcaggagagggacaggtga	387
mG5	-----ggagaggggacaggtga	513
m301	gagaggctctgcaggagagggacaggtga	279
mK3	gagaggctctgcaggagagggacaggtgacatgctgctgccaccgtggacccg	360
mEpo	-----	
mK3	acgaacttgc <u>ccccgt</u> ca <u>ctgtgt</u> catgccaacc <u>cc</u> cc <u>acc</u> act <u>ccc</u> aa <u>acc</u> ctc	415
mEpo	-----	
mK3	atcaa <u>acgggt</u> catt <u>ac</u> tt <u>ttacc</u> agt <u>ctgt</u> cc <u>atgg</u> ac <u>actcc</u> ag <u>cacc</u> ag	470
mEpo	-----	
mK3	c <u>atgt</u> gac <u>atcc</u> tc <u>gggg</u> cc <u>aaga</u> act <u>ccc</u> ag <u>agct</u> cc <u>att</u> ct <u>gaa</u> at <u>ctaa</u>	525
mEpo	-----	
mK3	g <u>atgt</u> cg <u>ctgg</u> ac <u>aa</u> g <u>cccg</u> agg <u>cccc</u> ag <u>aga</u> ag <u>aga</u> ag <u>ccct</u> c <u>aga</u> at <u>cag</u> ct <u>cg</u>	580
mEpo	-----	
mK3	g <u>attt</u> gt <u>tt</u> tg <u> 591</u>	

Fig. 3a

hWT atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctctgtccctgtgtcgcccccctgggcctccagtc
 hs3 atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctctgtccctgtgtcgcccccctgggcctccagtc
 h1-4 atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctctgtccctgtgtcgcccccctgggcctccagtc
 h1-5 atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctctgtccctgtgtcgcccccctgggcctccagtc
 hs4 atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctctgtccctgtgtcgcccccctgggcctccagtc
 h1-1 atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctctgtccctgtgtcgcccccctgggcctccagtc
 h2-1 atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctctgtccctgtgtcgcccccctgggcctccagtc

 hWT ctgggcgcaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggatcccttggaggccaaggaggccgag
 hs3 ctgggcgcaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggatcccttggaggccaaggaggccgag
 h1-4 ctgggcgcaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggatcccttggaggccaaggaggccgag
 h1-5 ctgggcgcaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggatcccttggaggccaaggaggccgag
 hs4 ctgggcgcaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggatcccttggaggccaaggaggccgag
 h1-1 ctgggcgcaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggatcccttggaggccaaggaggccgag
 h2-1 ctgggcgcaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggatcccttggaggccaaggaggccgag

 hWT aatatcacgacgggctgtgtaacactgcagcttgaatgagaatatactgtcccagacaccaaagttaatttc
 hs3 aatatcacg-----
 h1-4 aatatcacgacgggctgtgtaacactgcagcttgaatgagaatatactgtcccagacaccaaagttaatttc
 h1-5 aatatcacgacgggctgtgtaacactgcagcttgaatgagaatatactgtcccagacaccaaagttaatttc
 hs4 aatatcacgacgggctgtgtaacactgcagcttgaatgagaatatactgtcccagacaccaaagttaatttc
 h1-1 aatatcacgacgggctgtgtaacactgcagcttgaatgagaatatactgtcccag-----
 h2-1 aatatcacgacgggctgtgtaacactgcagcttgaatgaga-----

 hWT tatgccttgaagaggatggaggatggcagcagggcgtagaagtctggcaggccctgctgtcgaaagct
 hs3 -----gtcgggcagcagggcgtagaagtctggcaggccctgctgtcgaaagct
 h1-4 tatgccttgaagaggatggaggatggcagcagggc-----
 h1-5 tatgcc-----
 hs4 tatgccttgaagaggatggaggatggcagcgtggag-----
 h1-1 -----
 h2-1 -----

 hWT gtcctgcggggccaggccctgttggcaactttcccagccgtggagccctgcagctgcattggataaagcc
 hs3 gtcctgcggggccaggccctgttggcaactttcccagccgtggagccctgcagctgcattggataaagcc
 h1-4 -----ctgttggcaactttcccagccgtggagccctgcagctgcattggataaagcc
 h1-5 -----ctgttggcaactttcccagccgtggagccctgcagctgcattggataaagcc
 hs4 -----ccctgcagctgcattggataaagcc
 h1-1 -----ccctgttggcaactttcccagccgtggagccctgcagctgcattggataaagcc
 h2-1 -----

 hWT gtcagtggccttcgcagccctcaccactctgttccggctctggagcccaagaaggacccatctcccccctccagat
 hs3 gtcagtggccttcgcagccctcaccactctgttccggctctggagcccaagaaggacccatctcccccctccagat
 h1-4 gtcagtggccttcgcagccctcaccactctgttccggctctggagcccaagaaggacccatctcccccctccagat
 h1-5 gtcagtggccttcgcagccctcaccactctgttccggctctggagcccaagaaggacccatctcccccctccagat
 hs4 gtcagtggccttcgcagccctcaccactctgttccggctctggagcccaagaaggacccatctcccccctccagat
 h1-1 gtcagtggccttcgcagccctcaccactctgttccggctctggagcccaagaaggacccatctcccccctccagat
 h2-1 -----

 hWT gcccctcagctgtccactccgaacaatcactgtgacactttccgaaactttccgagctactccaaatttc
 hs3 gcccctcagctgtccactccgaacaatcactgtgacactttccgaaactttccgagctactccaaatttc
 h1-4 gcccctcagctgtccactccgaacaatcactgtgacactttccgaaactttccgagctactccaaatttc
 h1-5 gcccctcagctgtccactccgaacaatcactgtgacactttccgaaactttccgagctactccaaatttc
 hs4 gcccctcagctgtccactccgaacaatcactgtgacactttccgaaactttccgagctactccaaatttc
 h1-1 gcccctcagctgtccactccgaacaatcactgtgacactttccgaaactttccgagctactccaaatttc
 h2-1 -----caatcactgtgacactttccgaaactttccgagctactccaaatttc

5/21

Fig 3b

hWT ctccggggaaagctgaagctgtacacaggggaggcctgcaggacaggggacagatga
hs3 ctccggggaaagctgaagctgtacacaggggaggcctgcaggacaggggacagatga
h1-4 ctccggggaaagctgaagctgtacacaggggaggcctgcaggacaggggacagatga
h1-5 ctccggggaaagctgaagctgtacacaggggaggcctgcaggacaggggacagatga
hS4 ctccggggaaagctgaagctgtacacaggggaggcctgcaggacaggggacagatga
h1-1 ctccggggaaagctgaagctgtacacaggggaggcctgcaggacaggggacagatga
h2-1 ctccggggaaagctgaagctgtacacaggggaggcctgcaggacaggggacagatga

Fig. 4

Afinidade da hélice

Hélice A Hélice B Hélice B

Afinidade da hélice

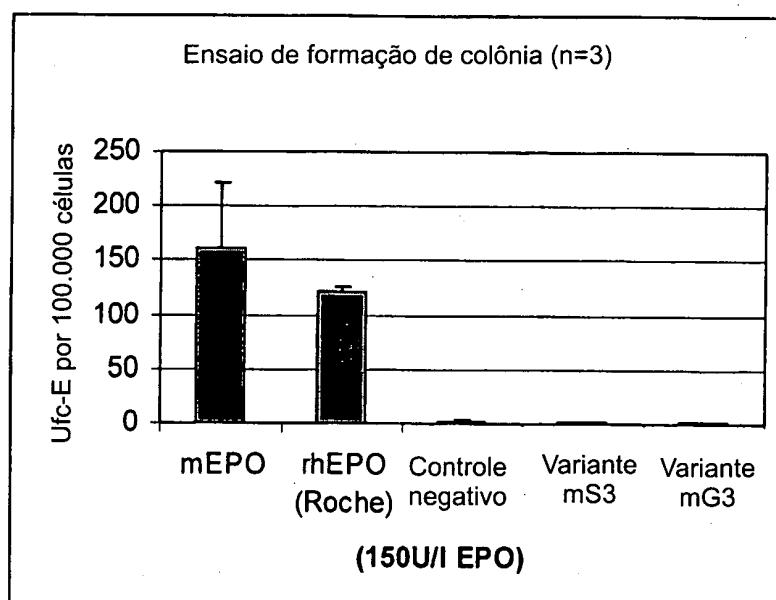
hWT	SSQPWEPLQLHVDKAVSGGLRSLTTLRGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTPRLFPRVYSNFLRGKLLKLYTGEACRTGDRS	Stop
hs3	SSQPWEPLQLHVDKAVSGGLRSLTTLRGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTPRLFPRVYSNFLRGKLLKLYTGEACRTGDR	Stop
h1-4	SSQPWEPLQLHVDKAVSGGLRSLTTLRGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTPRLFPRVYSNFLRGKLLKLYTGEACRTGDR	Stop
h1-5	SSQPWEPLQLHVDKAVSGGLRSLTTLRGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTPRLFPRVYSNFLRGKLLKLYTGEACRTGDR	Stop
hs4	---PWEPLQLHVDKAVSGGLRSLTTLRGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTPRLFPRVYSNFLRGKLLKLYTGEACRTGDR	Stop
h1-1	-----	-----
h2-1	-----	-----

mWT	SSQPPETLQLHIDKAISGLRSLTSLLRVLGAQKELMSPPDTTPAPLRLTVDFCQLPRVYANFLRGKLLKLYTGEVCRRGDRSStop
mS	-----KBLMSPPDTTPAPLRLTVDFCQLPRVYANFLRGKLLKLYTGEVCRRGDRSStop
mG3	-----FLRGKLLKLYTGEVCRRGDRSStop
mG5	SSQPPETLQLHIDKAISGLRSLTSLLRVLGAQKELMSPPDTTPAPLRLTVDFC-----RRGDRSStop
M3.01	-----LRGKLLKLYTGEVCRRGDRSStop
mK3	QVTCCCHRGGGPTNLLPVTVCQPSSTPNPHQTGHYLLTSLSGHSSTSSDILGARRTSQSSILKSVDQAOARGPREEFPQNOLGFV

7/21

Fig. 5

A



B

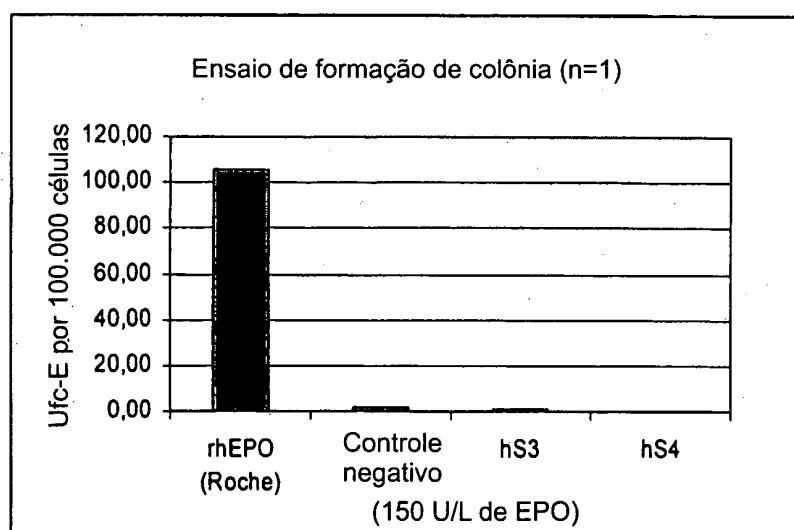


Fig. 6

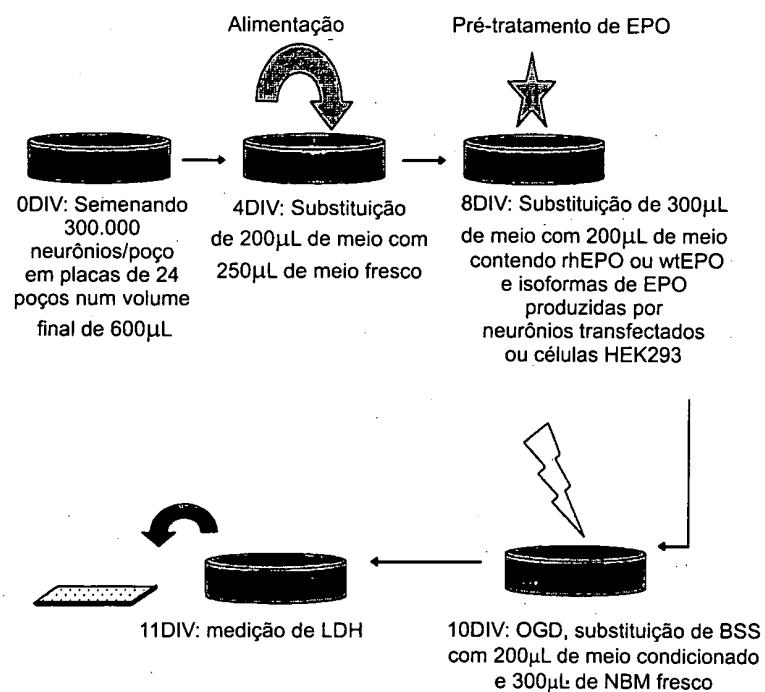
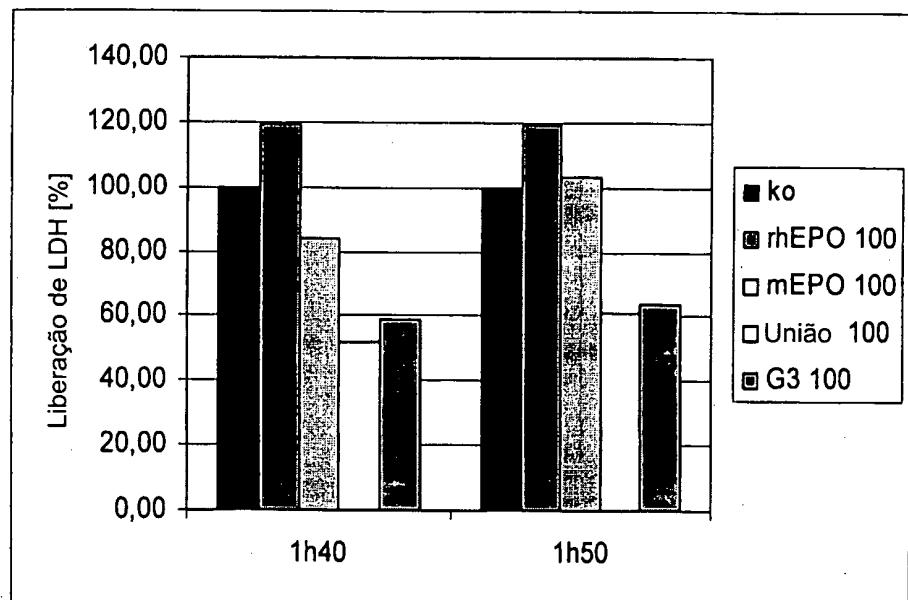


Fig. 7

A



B

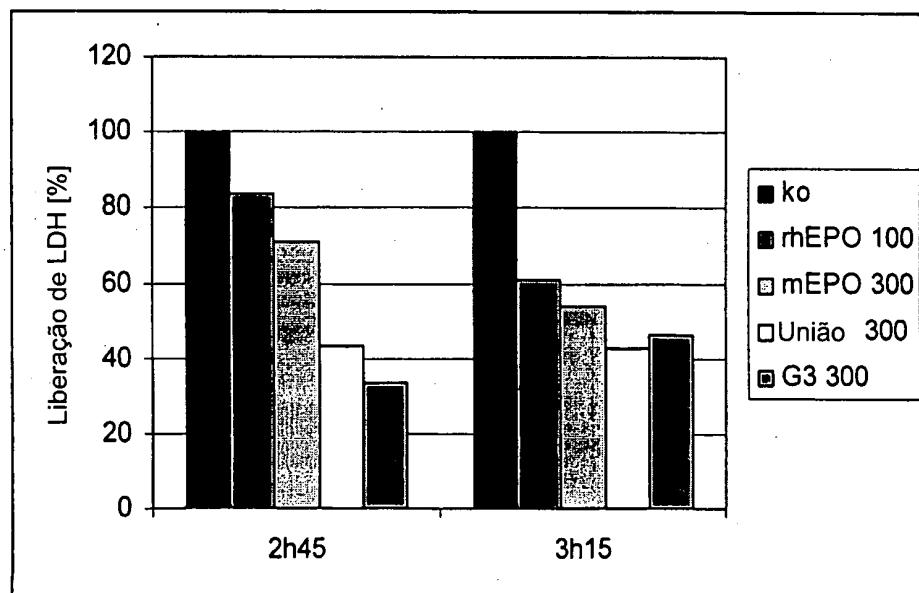
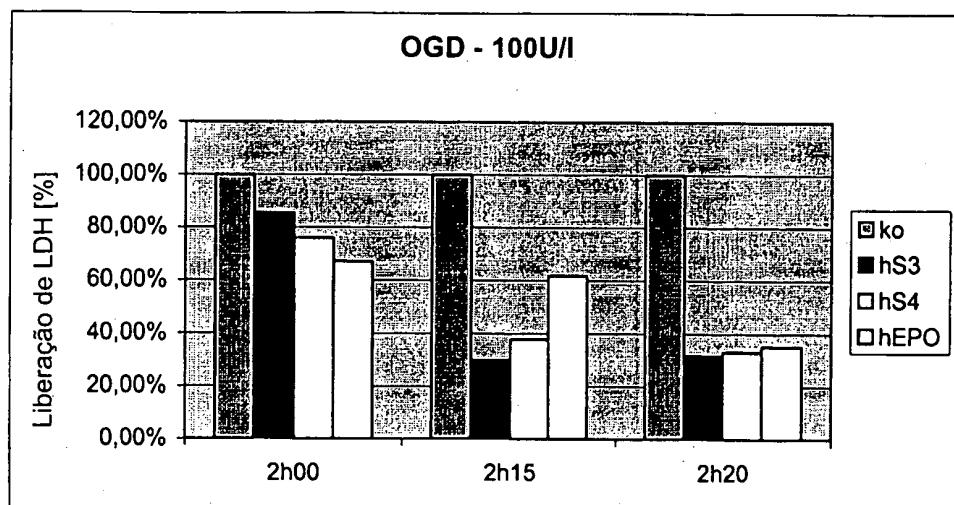
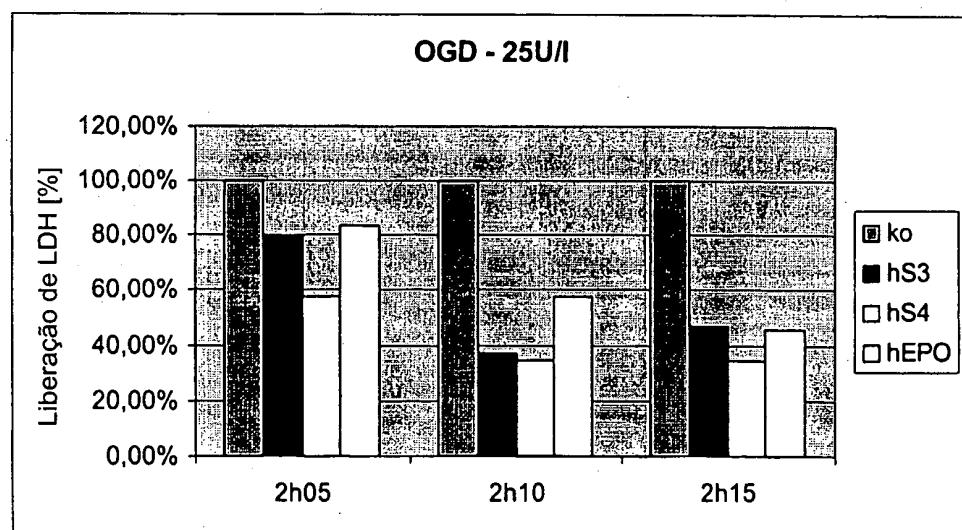


Fig. 8

A



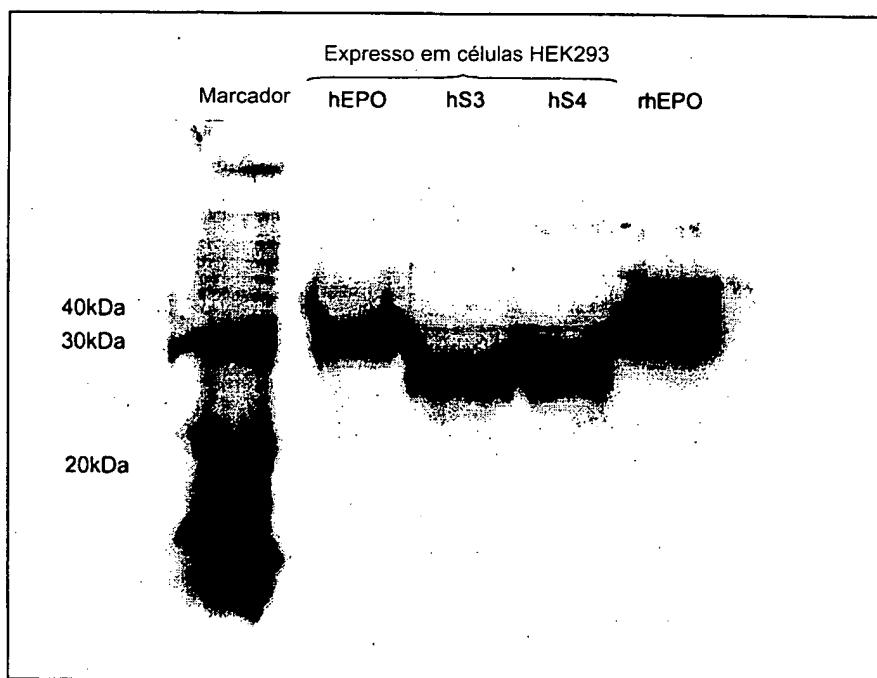
B



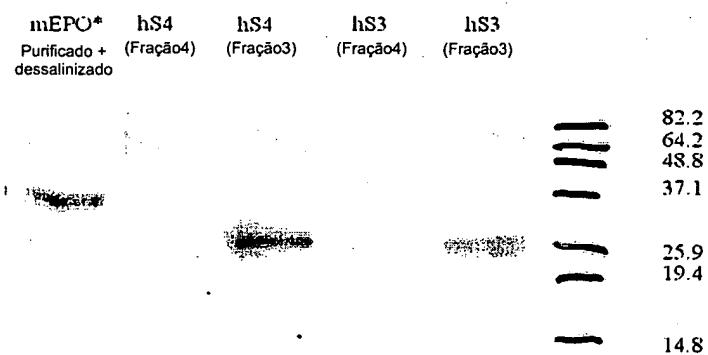
11/21

Fig. 9

A



B



10
Fig.

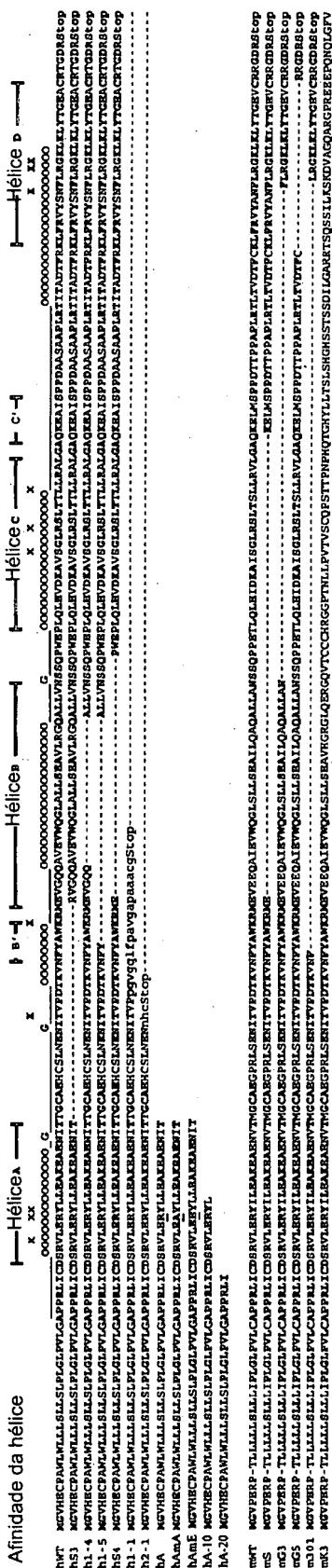
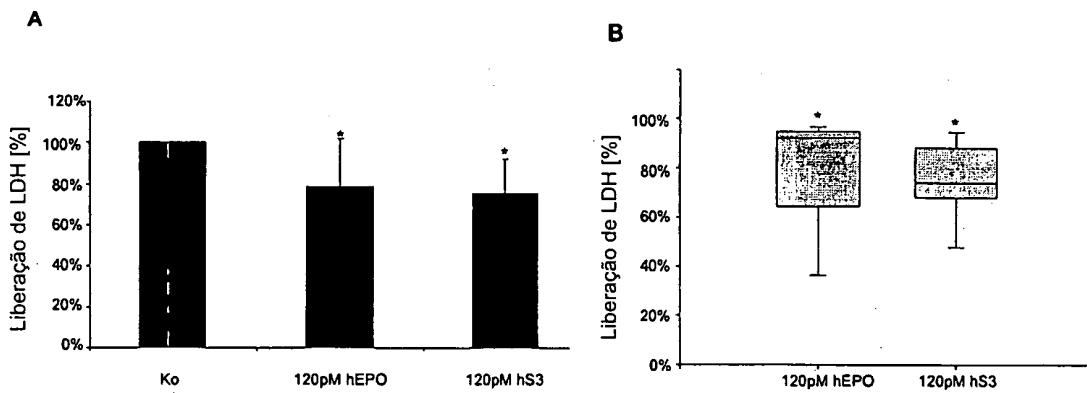


Fig. 11



14/21

Fig. 12

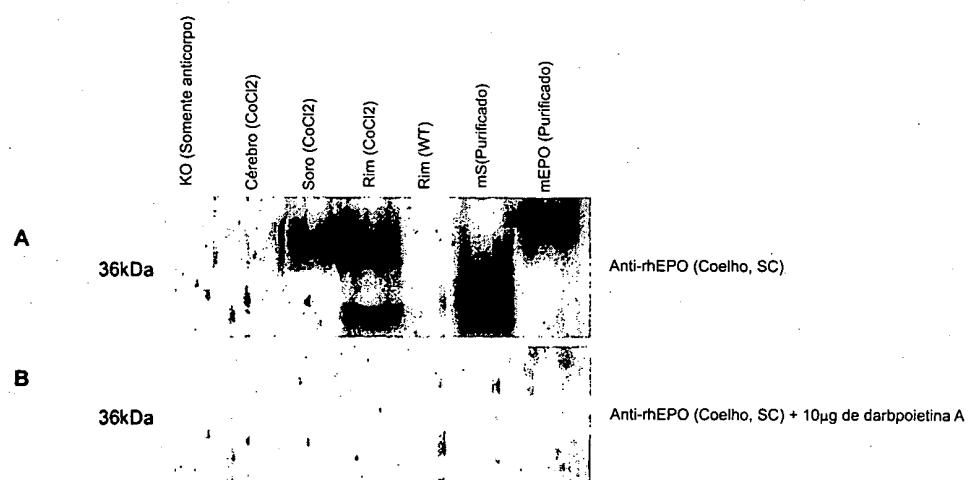
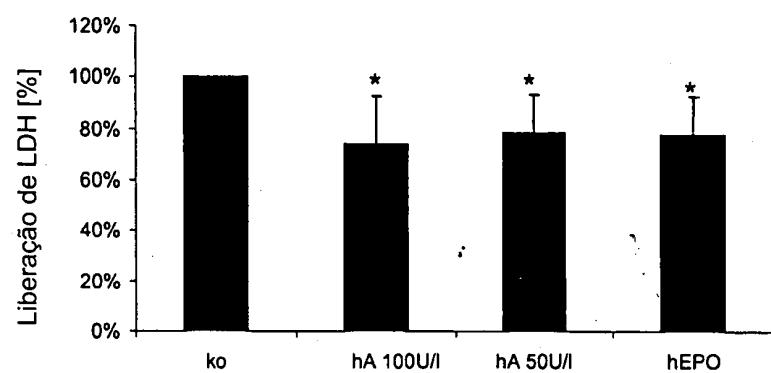


Fig. 13



16/21

Fig. 14

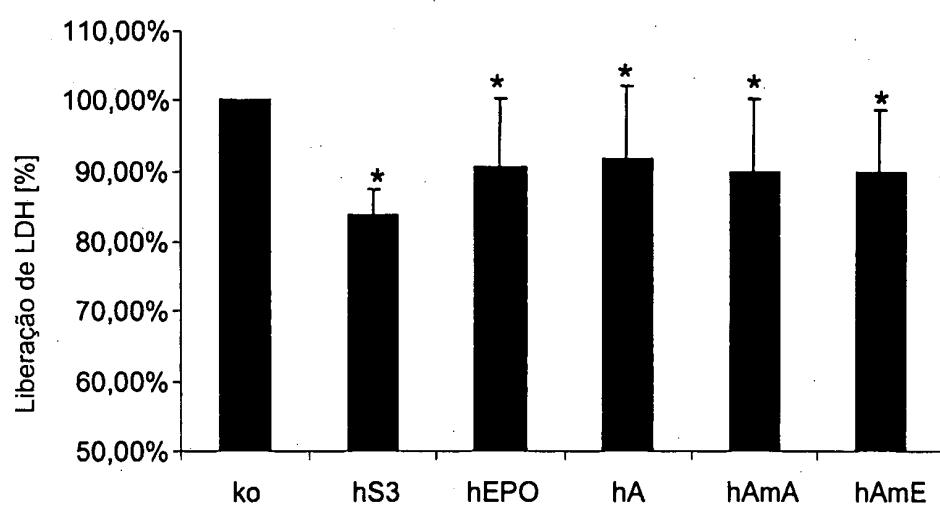
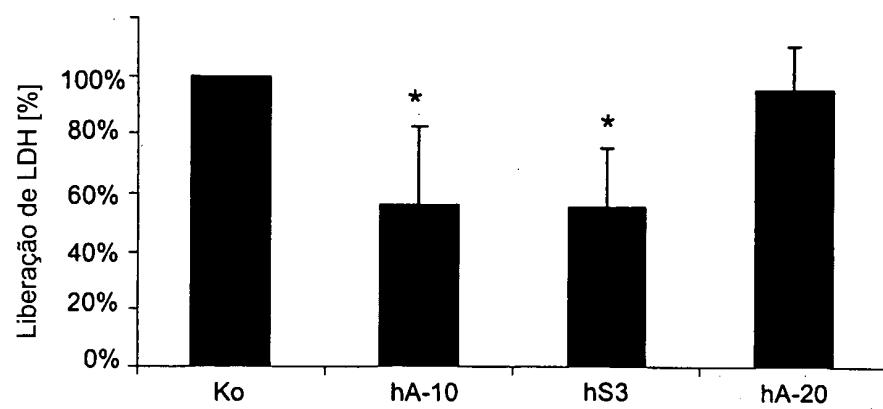
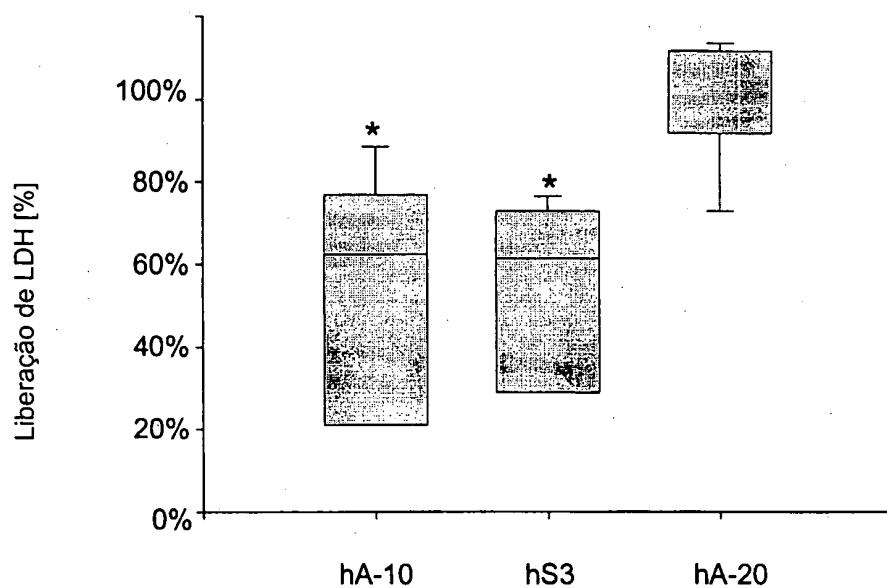


Fig. 15

A

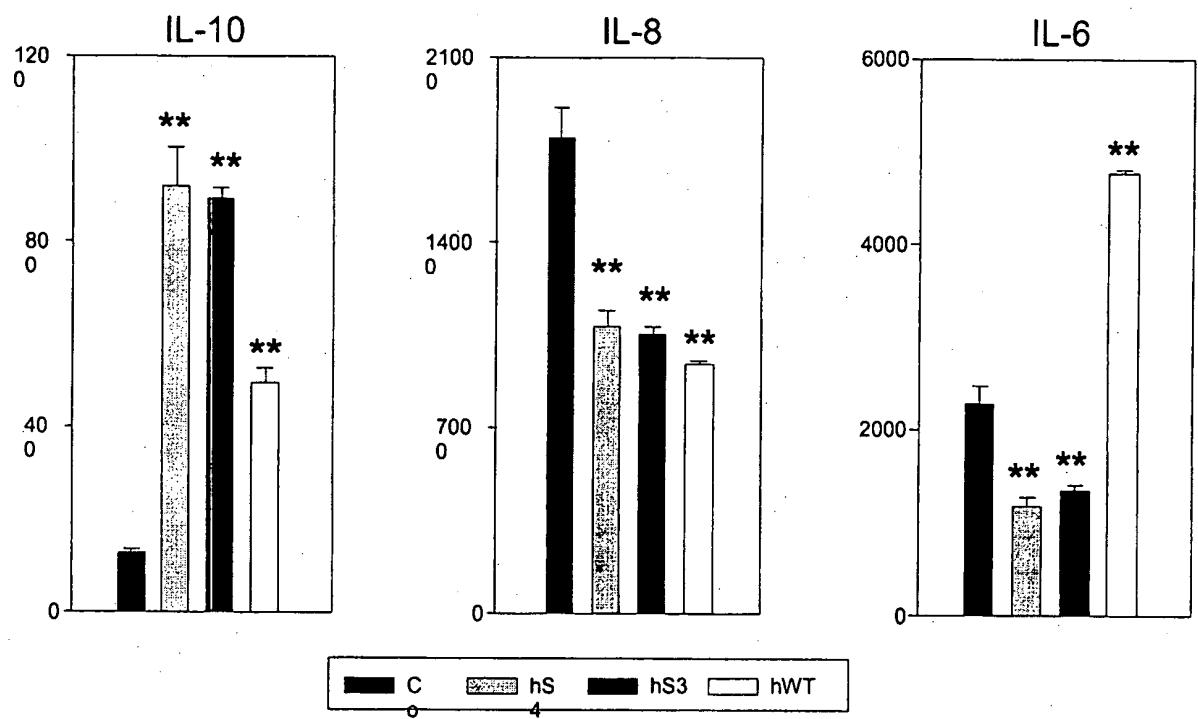


B



18/21

Fig. 16



19/21

Fig. 17

atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttcctgtccctgtgcgtccctctgggcctcccagtc
Atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttcctgtccctgtgcgtccctctgggcctcccagtc
Atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttcctgtccctgtgcgtccctctgggcctcccagtc
Atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttcctgtccctgtgcgtccctctgggcctcccagtc
Atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttcctgtccctgtgcgtccctctgggcctcccagtc
Atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttcctgtccctgtgcgtccctctgggcctcccagtc

ctgggcgcaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggtaaccttggaggccaaggaggccgag
ctgggcgcaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggtaaccttggaggccaaggaggccgag
ctgggcgcaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagggctaccttggaggccaaggaggccgag
ctgggcgcaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagggatcaccttggaggccaaggaggccgag
ctgggcgcaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagggatcaccttggaggccaaggaggccgag
ctgggcgcaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagggatcaccttggaggccaaggaggccgag

aatatcacgacgggctgtgctgaacactgcagcttgaatgagaatatactgtcccagacacccaaagttatcc
aatatcacg-----
aatatcacg-----
aatatcacg-----

tatgccttgaagaggatggaggtcggcagcaggccgtagaagtctggcagggcctggctgtcgaaagct

gtcctgcggggccaggccctgttgtcaactttccagccgtggagccctgcagctgcattggataaagcc

gtcagtggccttcgcagcctcaccactctgcttcggctctgcgagcccagaaggaagccatctccctccagat

gcccgcctcagctgtccactccgaacaatcactgcacactttccgaaactttccgagttactccaaatcc

ctccggggaaagctgaagctgtacacagggaggcctgcaggacagggacagatga

hWT
hA
hAmA
hAmE
hA-10
hA-20

Fig. 18

Hélice A de hWT-EPO

atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgctccctct
gggcctcccagtcctggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggt
acctttggaggccaaggaggccgagaatatcacg

Hélice A de hWT-EPO alanina mutante

atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgctccctct
gggcctcccagtcctggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggaggcgt
acctttggaggccaaggaggccgagaatatcacg

Hélice A de hWT-EPO ácido glutâmico mutante

atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgctccctct
gggcctcccagtcctggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggaggagt
acctttggaggccaaggaggccgagaatatcacg

Hélice A de hWT-EPO menos 10aa

atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgctccctct
gggcctcccagtcctggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggt
acctc

Hélice A de hWT-EPO menos 20aa

atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgctccctct
gggcctcccagtcctggcgccccaccacgcctcatc

Fig. 19

A - DNA hA sem líder

5

(Hélice A de hWT-EPO sem seqüência de transporte líder) – SEQ ID NO 60 – (Proteína exportada Madura)

5'-ccccaccacgcctcatctgtacagccgagtcctggagaggatcccttggaggccaaggaggccgagaatatcacg....-
3'

10

Seqüência líder (SEQ ID NO 63):

5'-atgggggtgcacgaatgcctgcctggctgtggcttcctgtccctgtcgctcccttggccctccagtcctggcgc-3'

15

B - Aminoácido B-hA sem líder

(Hélice A de hWT-EPO sem seqüência de transporte líder) – SEQ ID NO 61 (Proteína exportada Madura):

20

APPRLICDSRVLERYL

Seqüência líder (SEQ ID NO 62): MGVHECPAWLWLLSLLSPLGLPVLG

25

RESUMO

Patente de Invenção: "**VARIANTES DE ERITROPOIETINA**".

A presente invenção refere-se a novas variantes endógenas de eritropoietina (EPO) e seu uso para o tratamento ou prevenção de uma condição associada com o dano tecidual causado pela morte celular (apoptose, necrose) e inflamação, particularmente para neuroproteção, por exemplo, tratamento de doença aguda (por exemplo, apoplexia) e crônica (por exemplo, ALS) do sistema nervoso.

Novas páginas 1 - 34, do relatório descritivo, novo quadro reivindicatório (total de 21 reivindicações) para processamento na fase nacional brasileira.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "VARIANTES DE ERITROPOIETINA".

Campo da invenção

A presente invenção refere-se a novas variantes endógenas de eritropoietina (EPO) e seus usos para o tratamento ou prevenção de uma condição associada com o dano tecidual devido à morte celular (apoptose, necrose) e inflamação, particularmente para neuroproteção, por exemplo, tratamento de doença aguda (por exemplo, apoplexia) e crônica (por exemplo, ALS) do sistema nervoso.

10 Antecedentes da invenção

Apoplexia é uma doença debilitante a qual afeta mais de 400.000 pessoas por ano nos Estados Unidos e é a terceira causa mais comum de morte nos Estados Unidos. Além disso, metade dos pacientes internados tem problemas relacionados com apoplexia. Nas tendências atuais, 15 essa quantidade é projetada para pular para um milhão por ano por volta do ano 2050. Quando os custos diretos (cuidado e tratamento) e os custos indiretos (perda de produtividade) das apoplexias são considerados juntos, apoplexias colocam um encargo de \$ 43,3 bilhões por ano somente na sociedade americana. Cerca de 1/3 dos pacientes morrem nos primeiros três meses, 20 1/3 permanece com incapacidade severa, e 1/3 se recupera com um resultado aceitável. Em 1990, doenças cerebrovasculares foram a segunda causa principal de morte no mundo, matando mais de 4,3 milhões de pessoas por todo o mundo. Dessa forma, de uma perspectiva de saúde pública, apoplexia é uma das doenças mais relevantes.

25 Apoplexia é caracterizado pela perda repentina de circulação a uma área do cérebro, resultando em uma perda correspondente de função neurológica. Também chamado de acidente neurovascular ou síndrome do apoplexia, apoplexia é um termo não-específico englobando um grupo heterogêneo de causas patofisiológicas, incluindo trombose, embolismo e hemorragia. Apoplexias são atualmente classificados ou como hemorrágicos ou 30 como isquêmicos. Apoplexia isquêmico agudo refere-se aos apoplexias causados por trombose ou embolismo e respondem por 80% de todos os apo-

plexias.

Apoplexias isquêmicos resultam do bloqueio das artérias que suprem o cérebro, mais comumente nas ramificações das artérias carótidas internas. O bloqueio geralmente resulta quando um pedaço de um coágulo sangüíneo (trombo) ou de um depósito de gordura (ateroma) devido ao rompimento de aterosclerose (se tornando um êmbolo) viaja pela corrente sanguínea e se aloja em uma artéria que supre o cérebro. Os coágulos sangüíneos podem se formar quando um depósito de gordura se deposita na parede de uma ruptura de artéria. A ruptura de tal depósito de gordura também pode se formar quando um grande depósito de gordura reduz o fluxo sanguíneo, reduzindo ele até um gotejamento. Sangue que flui lentamente é mais provável de coagular. Dessa forma, o risco de formação de um coágulo e de bloqueio em uma artéria estreita é alto. Coágulos sangüíneos também podem se formar em outras áreas, tais como no coração ou em uma válvula cardíaca. Apoplexias devido a tais coágulos sangüíneos são mais comuns entre pessoas as quais tiveram recentemente cirurgia do coração e pessoas que têm um distúrbio de válvula cardíaca ou um ritmo cardíaco anormal (arritmia), especialmente fibrilação atrial. Também, em certos distúrbios tais como excesso de hemácias (policitemia), o risco de coágulos sangüíneos é aumentado porque o sangue é espessado.

Um apoplexia isquêmico também pode resultar, se o fluxo sanguíneo para o cérebro for reduzido, como pode ocorrer quando uma pessoa perde muito sangue ou tem uma pressão sanguínea muito baixa. Ocasionalmente, um apoplexia isquêmico ocorre quando o fluxo sanguíneo para o cérebro é normal, mas o sangue não contém oxigênio suficiente. Distúrbios que reduzem o conteúdo de oxigênio do sangue incluem anemia severa (uma deficiência das hemácias), sufocação e envenenamento por monóxido de carbono. Geralmente, o dano cerebral em tais casos é muito difundido (difuso) e resulta em coma. Um apoplexia isquêmico pode ocorrer se inflamação ou infecção estreitar os vasos sanguíneos que alimentam o cérebro. Similarmente, drogas tais como cocaína e anfetaminas podem causar espasmo das artérias, o que pode levar a um estreitamento das artérias que

alimentam o cérebro até uma extensão tal que cause um apoplexia.

O cérebro necessita de glicose e oxigênio para manter o metabolismo e a função neuronal. A distribuição inadequada de oxigênio para o cérebro leva a uma hipóxia e a isquemia resulta do fluxo sanguíneo cerebral insuficiente. As consequências da isquemia cerebral dependem do grau e da duração do fluxo sanguíneo cerebral reduzido. Os neurônios podem tolerar isquemia por 30 – 60 minutos. Se o fluxo não for restabelecido para a área isquêmica, isso resulta em uma série de processos metabólicos. Os neurônios ficam esgotados de ATP e mudam para a glicólise anaeróbica, uma via muito menos eficiente. Lactato se acumula e o pH intracelular diminui. Sem um fornecimento adequado de ATP, as bombas de íons na membrana plasmática falham. O influxo resultante de sódio, água e cálcio na célula causa o rápido inchaço dos neurônios e das células da glia. A despolarização da membrana também estimula a liberação massiva dos aminoácidos glutamato e aspartato, ambos os quais agem como neurotransmissores excitatórios no cérebro. Glutamato ativa ainda os canais de íons sódio e cálcio na membrana celular neuronal, a saber, o canal de cálcio N-metil-D-aspartato (NMDA) bem-caracterizado. Influxo de cálcio excessivo causa a ativação desordenada de uma ampla faixa de sistemas enzimáticos (proteases, lipases e nucleases). Essas enzimas e seus produtos metabólicos, tais como radicais livres de oxigênio, danificam as membranas celulares, o material genético e as proteínas estruturais nos neurônios, levando como resultado à morte celular dos neurônios (Dirnagl, U. et al. (1999) *Trends Neurosci.* 22: 391-397).

Apoplexias se iniciam repentinamente, se desenvolvem rapidamente e causam a morte do tecido cerebral de minutos até dias. No cérebro isquêmico, comumente distingui-se dois volumes de tecido – o núcleo do enfarte e a zona circundante, conhecida como peem umbra isquêmica – a margem subperfundida e metabolicamente comprometida ao redor do núcleo irrevogavelmente danificado. O núcleo e a peem umbra são caracterizados por dois diferentes tipos de morte celular: necrose e apoptose (a qual é também chamada de morte celular programada ou morte celular neuronal retardada). O déficit de perfusão severa no núcleo causa uma quebra dos pro-

cessos metabólicos, do fornecimento de energia celular e da homeostase iônica, o que causa a perda da integridade celular em minutos. Dessa forma, a necrose aguda da célula e do tecido prevalece no núcleo. Na peem umbra, alguma reperfusão residual é mantida pelos vasos colaterais, os quais podem ser incapazes de manter o metabolismo funcional completo, mas previne a desintegração estrutural imediata. Entretanto, no decorrer do tempo (de horas até vários dias), a alteração da homeostase celular faz com que mais e mais células morram, e o volume do enfarte aumenta. A peem umbra, dessa forma, tem que ser considerada como tecido em risco durante a maturação do enfarte. Nessa região, apoptose e cascatas de sinalização inflamatória desempenham um importante papel. Ela pode inicialmente constituir 50% do volume que irá terminar como enfarte. Os mecanismos que levam à morte celular retardada proporcionam alvos para uma terapia neuroprotetora específica nas regiões cerebrais desafiadas pela isquemia, mas as quais 15 ainda são viáveis.

Opções terapêuticas até aqui são altamente frustrantes: Trombólise com rtPA, a única terapia com eficácia comprovada em um teste clínico maior (NINDS), somente é eficaz em uma janela de tempo de três horas, limitando sua aplicação para somente uma pequena porcentagem de pacientes com apoplexia isquêmico. Em outras palavras, além da terapia aprobativa básica, atualmente mais de 95% das apoplexias não podem ser tratadas especificamente. Isso está em contraste pronunciado com o conhecimento envolvendo a patofisiologia básica dessa doença, a qual se desenvolveu na última década. Particularmente, conhecimento extensivo tem se acumulado 20 nos mecanismos do dano cerebral parenquimal e da neuroproteção endógena, assim como na reorganização funcional e estrutural.

Recentemente, atenção tem se focado nos papéis terapêuticos potenciais para as proteínas cerebrais endógenas que possuem propriedades neuroprotetoras. EPO, um hormônio de glicoproteína produzido primariamente pelas células do endotélio capilar peritubular do rim, o qual é um membro do hormônio do crescimento/família de citocina prolactona (Zhu Y. e D'Andrea A.D: (1994) *Curr. Opin. Hematol.* 1: 113-118) é um candidato pro-

missor. Embora EPO fosse primeiramente caracterizada e é agora amplamente conhecida por seu papel como um hormônio hematopoiético, a detecção de EPO e seu receptor (EPOR) no tecido cerebral de roedor e ser humano, assim como em neurônios e astrócitos cultivados expandiu a busca 5 por outros papéis biológicos do EPO.

No cérebro, um sistema EPO parácrino/(Epo-R)₂ existe independentemente do sistema endócrino da eritropoiese adulta; neurônios expressam (Epo-R)₂ e astrócitos produzem EPO (Ruscher et al. (2002) *J. Neurosci.* 22, 10291-301; Prass et al. (2003) *Stroke* 34,1981-1986). Foi demonstrado *in vitro* e *in vivo* que EPO é um potente inibidor da apoptose neuronal induzida por isquemia e hipóxia (Ruscher et al. (2002) *J. Neurosci.* 22, 10291-301; Bernaudin, M., et al. (1999) *J Cereb Blood Flow Metab.* 19: 643-51; Morishita, E., et al. (1997) *Neuroscience*. 76: 105-16). Foi reportado por vários grupos que a adição de EPO em culturas neuronais protege contra a toxicidade 10 do ácido glutâmico e hipóxica (Henn F. A: e Braus D.F. (1999) *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 249: 48-56, Vogeley K. et al. (2000) *Am. J. Psychiatry* 157: 34-39) e reduz a disfunção neurológica em modelos de roedores de isca (Brines M. L. et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 10526-10531 e Bernaudin et al. (1999) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 10: 643-.651). 15 Os resultados promissores desses experimentos confirmaram em estudos humanos em que foi demonstrado que a terapia com EPO para apoplexia agudo é segura e deve ser benéfica (Ehrenreich H. et al. (2002) *Mol. Medicine* 8: 495-505) e WO 00/35475 A2. Essas células e propriedades neuroprotetoras mais particulares do EPO levaram a pesquisas adicionais nessa área 20 para substanciar essas descobertas em um teste mais amplo e o uso de EPO é agora proposto em outra indicação assim como incluindo, por exemplo, esquizofrenia (Ehrenreich H et al. (2004) *Molecular Psychiatry* 9: 42-54 e WO 02/20031 A2).

Para a aplicação do EPO prevenir o dano tecidual, a atividade 30 hematopoiética não é geralmente requerida e deve ser prejudicial se grandes quantidades de EPO forem administradas para tratar ou melhorar os efeitos de hipóxia ou de dano tecidual induzido por isquemia. Conseqüente-

mente, têm sido feitas tentativas para criar variantes de EPO, as quais sómente exibam a propriedade protetora celular, porém não as propriedades hematopoiéticas. US 2003/0130197 descreve peptidomiméticos de EPO para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos, os quais não apresentam 5 homologia de seqüência com EPO de ocorrência natural ou fragmentos seus. US 6.531.121 descreve uma asialoeritropoietina a qual é gerada por desialilação completa do EPO recombinante mostrou uma capacidade aumentada de cruzar a barreira da célula endotelial e tinha uma atividade hematopoiética diminuída. Eritropoietina carbamilada (CEPO) também foi demonstrada por exibir um efeito protetor tecidual, porém nenhum efeito eritropoietico (Leist et al. (2004) *Science* 305: 239-242 e WO 2005/025606 A1.

Finalmente, foi demonstrado que um peptídeo de 17-mer de EPO inibiu a morte celular de duas linhagens celulares neuronais, SK-N-MC e NS20Y (Campana W. M. et al (1998) *Int. J. Mol. Medicine* 1: 235-241), enquanto ao mesmo tempo não teve atividade hematopoiética. Entretanto, 15 1 ng/mL do peptídeo EPO foi necessário para eliciar o mesmo efeito antiapoptótico que 100 pg/mL de EPO recombinante (rhEPO) em células NS20Y e que 400 pg/mL de rhEPO em células SK-N-MC. Dado o peso molecular aparente do rhEPO de cerca de 66.000 g/mol (o peso molecular calculado é de 20 cerca de 33.000 g/mol, mas não inclui o peso dos resíduos de oligossacárido compreendidos no rhEPO) e de cerca de 1.900 g/mol do peptídeo EPO em uma concentração de 1,52 pmol/L e 6,06 pmol/L, respectivamente, de rhEPO e 1 nmol/L do peptídeo EPO eliciaram o mesmo nível de um efeito protetor celular. Conseqüentemente, o peptídeo EPO está entre 650 vezes e 25 165 vezes menos ativo do que o do rhEPO na prevenção da morte celular. É evidente a partir desses dados que a região do EPO compreendida no 17-mer não desempenha um papel principal na função protetora celular do EPO. Conseqüentemente, todas as variantes de EPO, as quais têm uma atividade hematopoiética diminuída conhecida na técnica anterior, sofrem da 30 desvantagem de que elas não são de ocorrência natural, uma vez que elas ou perderam sua glicosilação natural ou elas são mutilações artificiais e/ou elas diminuíram vastamente a atividade protetora celular, em comparação

com o rhEPO. Conseqüentemente, existe uma necessidade na técnica anterior de proporcionar um derivado de EPO, o qual é próximo ao EPO de ocorrência natural e o qual tem uma atividade protetora tecidual igual ou melhor que o rhEPO, mas com menos ou sem hematopoiética, particularmente sem 5 atividade eritropoiética.

Esse problema é solucionado pela provisão de novas variantes EPO, as quais foram descobertas como ocorrendo naturalmente no tecido humano e de camundongo (cérebro, rim) e as quais exibem uma atividade protetora celular semelhante ou melhor ao rhEPO, mas as quais não exibem 10 qualquer atividade hematopoiética significativa.

Sumário da invenção

Em um aspecto, a presente invenção diz respeito com uma variante de EPO que codifica o polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:

- 15 (a) polinucleotídeos codificando pelo menos a forma madura dos polipeptídeos nomeados como hs3, h1-4, h1-5, hs4, h1-1, h2-l, mS, mG3, mG5, m301 e mK3 com a seqüência de aminoácidos deduzida conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22, respectivamente;
- 20 (b) polinucleotídeos com a seqüência codificadora, conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 codificando pelo menos a forma madura do polipeptídeo;
- 25 (c) polinucleotídeo codificando uma versão humanizada dos polipeptídeos mS, mG3, mG5, m301 e mK3 com a seqüência de aminoácidos deduzida conforme mostrado na SEQ ID NOs: 14, 16, 18, 20 e 22,
- 30 (d) polinucleotídeos codificando um polipeptídeo compreendendo uma fusão de uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo de seqüências de aminoácidos conforme mostrado na SEQ ID NO: 24, 26, 28 e 30, no N-terminal de uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo de seqüências de aminoácidos conforme mostrado na SEQ ID NO: 32, 34, 36 e 38;
- (e) polinucleotídeos compreendendo uma fusão de seqüências

de polinucleotídeo selecionados do grupo de seqüências de polinucleotídeo conforme mostrado na SEQ ID NO: 23, 25, 27 e 29, 5' de uma seqüência de polinucleotídeo selecionada do grupo de seqüências de polinucleotídeo conforme mostrado na SEQ ID NO: 31, 33, 35 e 37;

5 (f) polinucleotídeos codificando um derivado de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a) até (e), em que no referido derivado entre 1 e 10 resíduos de aminoácidos são conservativamente substituídos em comparação com o referido polipeptídeo, e o referido derivado tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, 10 mas essencialmente não tem atividade hematopoiética;

(g) polinucleotídeos que codificam um fragmento de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a) até (f), em que no referido fragmento entre 1 e 10 resíduos de aminoácidos são N- e/ou C-terminalmente anulados e/ou entre 1 e 10 aminoácidos são anulados N- 15 e/ou C-terminalmente da junção em comparação com o referido polipeptídeo, e o referido fragmento tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;

20 (h) polinucleotídeos os quais são pelo menos 50% idênticos a um polinucleotídeo, conforme definido em qualquer um de (a) a (g) e os quais codificam para um polipeptídeo com atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética; e

25 (i) polinucleotídeos, o filamento complementar dos quais hibridizam sob condições estringentes com um polinucleotídeo conforme definido em qualquer um de (a) até (h), e os quais codificam para um polipeptídeo com atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;

Ou o filamento complementar de tal polinucleotídeo.

Outro aspecto da presente invenção é um homólogo de um polinucleotídeo que codifica uma variante de eritropoietina (EPO) de outra espécie eucariótica superior.

Outro aspecto da presente invenção é uma variante EPO que

codifica um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:

(a) polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo variante E-PO, os quais compreendem a parte N-terminal do EPO de comprimento total incluindo a hélice A, e os quais não têm pelo menos um dos seguintes:

5 (i) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos, preferivelmente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 aminoácidos entre a hélice A e a hélice B;

10 (ii) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos, preferivelmente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 aminoácidos da hélice B;

15 (iii) um fragmento de pelo menos 2 aminoácidos, preferivelmente 3, 4, 5 ou 6 aminoácidos entre a hélice B e a hélice C;

(iv) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos, preferivelmente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 ou 23 aminoácidos da hélice C;

20 (v) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos, preferivelmente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 ou 27 aminoácidos entre as hélices C e D; e/ou

25 (vi) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos, preferivelmente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22 da hélice D;

em que o referido variante tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética.

(b) polinucleotídeos que codificam um derivado de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a), em que no referido derivado entre 1 e 10 resíduos de aminoácidos são conservativamente substituídos em comparação com o referido polipeptídeo, e o referido derivado tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;

(c) polinucleotídeos, o filamento complementar dos quais hibridiza sob condições estringentes para um polinucleotídeo conforme definido em qualquer um de (a) até (b) e o qual codifica para um polipeptídeo com atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencial-

almente sem atividade hematopoética;

ou o filamento complementar de tal polinucleotídeo.

Em um aspecto preferido, o polinucleotídeo da presente invenção o qual é DNA, DNA genômico ou RNA.

5 Em outro aspecto, a presente invenção diz respeito a um vetor contendo o polinucleotídeo da presente invenção. É preferível que o polinucleotídeo contido no vetor esteja operativamente ligado às seqüências de controle de expressão que permitem a expressão nas células hospedeiras procarióticas e/ou eucarióticas.

10 Outro aspecto da invenção é uma célula hospedeira geneticamente projetada com o polinucleotídeo da presente invenção ou com o vetor da presente invenção.

15 Outro aspecto da invenção é um animal não-humano transgênico contendo um polinucleotídeo da presente invenção, um vetor da presente invenção e/ou uma célula hospedeira da presente invenção.

Outro aspecto da invenção é um processo para produzir um polipeptídeo variante de EPO codificado pelo polinucleotídeo da presente invenção compreendendo: o cultivo da célula hospedeira da presente invenção e a recuperação do polipeptídeo codificado pelo referido polinucleotídeo.

20 Em uma modalidade preferida, o processo da presente invenção compreende ainda a etapa de modificar a referida variante de EPO, em que a modificação é selecionada do grupo consistindo em oxidação, sulfatação, fosforilação, adição de oligossacarídeos ou combinações destes.

Outro aspecto da invenção é um processo para produzir células capazes de expressar pelo menos uma das variantes EPO compreendendo células geneticamente projetadas *in vitro* com o vetor da invenção, em que a(s) referida(s) variante(s) de EPO é/são codificadas por um polinucleotídeo da invenção.

30 Outro aspecto da invenção é um polipeptídeo com a seqüência de aminoácidos codificada por um polinucleotídeo da presente invenção ou obtenível pelo processo da presente invenção.

Outro aspecto da invenção é um anticorpo que se liga especificamente

camente ao polipeptídeo da presente invenção.

Outro aspecto da invenção é uma composição farmacêutica compreendendo um polinucleotídeo da presente invenção, um vetor da presente invenção, uma célula hospedeira da presente invenção, um polipeptídeo da presente invenção e/ou um anticorpo da presente invenção e um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis.

Outro aspecto da invenção é o uso de um polinucleotídeo da presente invenção, um vetor da presente invenção, uma célula hospedeira da presente invenção, um polipeptídeo da presente invenção para a produção de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma condição associada com o dano tecidual devido à morte celular, por exemplo, apoptose e necrose, assim como por inflamação.

Em um uso preferido da presente invenção, a morte celular é induzida por isquemia, hipóxia, infecção bacteriana, infecção viral, induzida auto-imunológica, traumática ou quimicamente (por exemplo, metabólica, toxicamente), ou induzida por radiação.

Em um uso preferido da presente invenção, a condição é um distúrbio neurodegenerativo/neuroinflamatório agudo ou um distúrbio neurodegenerativo/neuroinflamatório crônico, é um distúrbio agudo ou crônico do coração (por exemplo, enfarte do miocárdio), pulmão (por exemplo, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, rim (glomerulonefrite), fígado (por exemplo, falência hepática crônica) ou pâncreas (por exemplo, pancreatite) ou a referida condição está associada com um órgão (por exemplo, rim ou fígado) ou transplante de célula (por exemplo, célula tronco).

Preferivelmente, o distúrbio neurodegenerativo e/ou neuroinflamatório agudo é selecionado do grupo consistindo em enfarte ou isquemia cerebral incluindo oclusão embólica e oclusão trombótica, reperfusão seguido de isquemia aguda, injúria hipóxica-isquêmica perinatal, parada cardíaca, hemorragia intracranial, hemorragia subaracnóide e lesões intracranianas (por exemplo, trauma do SNC), lesões da medula espinal lesões intravertebrais, síndrome de criança sacudida ("whiplash shaken infant syndrome"), encefalite infecciosa (por exemplo, encefalite por herpes), meningite (por

exemplo, bacteriana)dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca).

Preferivelmente, o distúrbio neurodegenerativo/neuroinflamatório crônico é selecionado do grupo consistindo em demências (por exemplo, doença de Alzheimer, demências vasculares), doença de Pick, doença do corpo de Lewy difuso, paralisia supranuclear progressiva (síndrome de Steele-Richardson), esclerose múltipla, atrofia sistêmica múltipla (incluindo a síndrome de Shy-Drager), condições epilépticas crônicas associadas com neurodegeneração, doenças neuronais motoras, ataxias degenerativas, degeneração basal cortical, complexo de Guam-Parkinson-demência-SLA, panencefalite esclerosante subaguda, doença de Huntington, doença de Parkinson, sinucleinopatias, afasia progressiva primária, degeneração estriatonigral, doença de Machado/Joseph/ataxia espinocerebelar tipo 3 e degenerações olivopontocerebelares, doença de Gilles de La Tourette, paralisia bulbar e pseudobulbar, atrofia muscular espinal e espinobulbar (doença de Kennedy), esclerose lateral primária, paraplegia espástica familiar, doença de Werdnig-Hoffman, doença de Kugelberg-Welander, doença de Tay-Sach, doença de Sandhoff, doença espástica familiar, paraparesse espástica, leucoencefalopatia multifocal progressiva, disautonomia familiar (síndrome de Riley-Day), polineuropatias (por exemplo, diabética, álcool-tóxica, síndrome Guillain-Barré, polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica), doenças de prion, vício, distúrbios afetivos (por exemplo, depressão), distúrbios esquizofrênicos, síndrome da fadiga crônica, dor crônica (por exemplo, dor nas costas inferiores).

Em um uso preferido da presente invenção, a condição é o envelhecimento.

Em um uso preferido da presente invenção, o medicamento é administrado antes de ou depois do início da referida condição.

Descrição detalhada da invenção

A não ser que seja definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado que os comumente entendidos por uma pessoa versada na técnica para a qual essa invenção pertence. Em caso de conflito, o presente documento, incluindo definições,

irá controlar. Métodos e materiais preferidos são descritos abaixo, embora métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui podem ser usados na prática ou testagem da presente invenção. Todas as publicações, pedidos de patente, patentes e outras referências aqui mencionadas 5 são incorporadas por referência na sua totalidade. Os materiais, métodos e exemplos aqui descritos são somente ilustrativos e não pretendem ser limitantes.

A presente invenção é baseada na surpreendente observação de que variantes de EPO são expressas no tecido neuronal e na determinação 10 de que as variantes protegeram os neurônios de danos induzidos por oxigênio e privação de glicose, mas não apresentaram atividade hematopoietica. Esse comportamento os tornam adequados para uso como terapêuticos em situações onde a função hematopoietica do EPO não é requerida ou prejudicial. De acordo com um primeiro aspecto da presente invenção está 15 uma variante de EPO que codifica polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:

(a) polinucleotídeos que codificam pelo menos a forma madura dos polipeptídeos nomeados hs3, h1-4, h1-5, hs4, h1-1, h2-1, mS, mG3, 20 mG5, m301 e mK3 com a seqüência de aminoácidos deduzida conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22, respectivamente;

(b) polinucleotídeos com a seqüência codificante, conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21, codificando pelo menos a forma madura do polipeptídeo;

25 (c) polinucleotídeo que codifica uma versão humanizada dos polipeptídeos mS, mG3, mG5, m301 e mK3 com a seqüência de aminoácidos deduzida conforme mostrado nas SEQ ID Nos: 14, 16, 18, 20 e 22,

(d) polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo compreendendo uma fusão de uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo 30 de seqüências de aminoácidos conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 24, 26, 28 e 30, no N-terminal, preferivelmente diretamente, isto é, sem quaisquer aminoácidos intervenientes, de uma seqüência de aminoácidos selecionada

do grupo de seqüências de aminoácidos conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 32, 34, 36 e 38;

5 (e) polinucleotídeos compreendendo uma fusão de seqüências de polinucleotídeo selecionadas do grupo de seqüências de polinucleotídeo conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 23, 25, 27 e 29, 5', preferivelmente diretamente 5', isto é, sem quaisquer polinucleotídeos intervenientes, de uma seqüência de polinucleotídeo selecionada do grupo de seqüências de polinucleotídeo conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 31, 33, 35 e 37;

10 (f) polinucleotídeos que codificam um derivado de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a) a (e), em que no referido derivado entre 1 e 10 resíduos de aminoácidos são conservativamente substituídos em comparação com o referido polipeptídeo, e o referido derivado tem atividade celular protetora e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;

15 (g) polinucleotídeos que codificam um fragmento de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a) até (f), em que no referido fragmento entre 1 e 10 resíduos de aminoácidos são N- e/ou C-terminalmente anulados e/ou entre 1 e 10 aminoácidos são anulados N- e/ou C-terminalmente da junção em comparação com o referido polipeptídeo, e o referido fragmento tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente não tem atividade hematopoiética;

20 (h) polinucleotídeos os quais são pelo menos 50% idênticos a um polinucleotídeo conforme definido em qualquer um de (a) até (g) e os quais codificam para um polipeptídeo com atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética; e

25 (i) polinucleotídeos, o filamento complementar dos quais hibridiza sob condições estringentes em um polinucleotídeo conforme definido em qualquer um de (a) até (h) e o qual codifica para um polipeptídeo com atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;

30 ou o filamento complementar de tal polinucleotídeo.

A invenção refere-se ainda a um peptídeo de uma variante EPO que codifica um polipeptídeo selecionado do grupo consistindo em:

- (a) polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos nomeados seqüências ha, hAma, hAmE, hA-20 e ha- de transporte, com a seqüência de aminoácido deduzida conforme mostrado nas SEQ ID NOS: 50, 51, 52, 53 e 60, respectivamente;
- (b) polinucleotídeos com a seqüência codificadora, conforme mostrado nas SEQ ID NOS: 55, 56, 57 58 e 60 codificam pelo menos a forma madura do polipeptídeo;
- 10 (c) polinucleotídeos que codificam um derivado de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a) a (b), em que no referido derivado entre 1 e 10 resíduos de aminoácidos são conservativamente substituídos em comparação com o referido polipeptídeo, e o referido derivado tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;
- (d) polinucleotídeos codificando um fragmento de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a) a (b), em que no referido fragmento entre 1 e 10 resíduos de aminoácidos são N- e/ou C-terminalmente anulados e/ou entre 1 e 10 aminoácidos são anulados N- e/ou 20 C-terminalmente da junção em comparação com o referido polipeptídeo, e o fragmento derivado tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;
- (e) polinucleotídeos, os quais são pelo menos 50% idênticos a um polinucleotídeo conforme definido em qualquer um de (a) a (b), e os 25 quais codificam para um polipeptídeo com atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética; e
- (f) polinucleotídeos, o filamento complementar do qual hibridiza sob condições estringentes para um nucleotídeo conforme definido em qualquer um de (a) a (h), e os quais codificam para um polipeptídeo com atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente 30 sem atividade hematopoiética;

ou o filamento complementar de tal polinucleotídeo.

Em um outro aspecto, os polinucleotídeos da presente invenção compreendem homólogos das variantes EPO da presente invenção derivados de outra espécie eucariótica superior, particularmente de mamíferos, 5 mais preferivelmente de primatas não-humanos; de roedores, por exemplo, rato ou porquinho-da-índia; ruminante, por exemplo, vaca; ou ovelha; cavalo; porco; coelho; cachorro; ou gato, os quais têm atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoietica. Nesse contexto, o termo homólogo refere-se a um polinucleotídeo 10 codificando uma variante EPO derivada de outra espécie, a qual comprehende essencialmente a mesma anulação que os polinucleotídeos de acordo com as SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 55, 56, 57, 58 ou 60. Uma anulação de um polinucleotídeo é considerada como sendo essencialmente a mesma, se ela envolver a anulação de polinucleotídeos codificando um polipeptídeo, o qual seja homólogo aos polipeptídeos respectivamente anulados nos polipeptídeos da variante EPO de acordo com as SEQ 15 ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 50, 51, 52, 53 ou 61. Os critérios para determinar a homologia entre duas seqüências de peptídeos são bem-estabelecidos. Para esse propósito, programas como BLASTP podem 20 ser usados. Uma anulação é ainda considerada como sendo essencialmente a mesma se ela envolver 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 55, 56, 57, 58 ou 61 mais ou menos nucleotídeos que a respectiva anulação nas SEQ ID Nos: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, ou 21, as quais também são representadas nas 25 figuras 1 e 2.

Outro aspecto da presente invenção é uma variante EPO que codifica um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:

(a) polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo variante de EPO, o qual comprehende a parte N-terminal do comprimento total do EPO, 30 incluindo a hélice A a qual não tem pelo menos um dos seguintes:

(i) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos, preferivelmente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 aminoácidos entre a hélice A e a hé-

lice B;

(ii) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos, preferivelmente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 aminoácidos da hélice B;

5 (iii) um fragmento de pelo menos 2 aminoácidos, preferivelmente 3, 4, 5 ou 6 aminoácidos entre a hélice B e a hélice C;

(iv) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos, preferivelmente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 ou 23 aminoácidos de hélice C;

10 (v) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos, preferivelmente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 ou 27 aminoácidos entre as hélices C e D; e/ou

(vi) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos, preferivelmente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, ou 22 de hélice D;

15 em que a referida variante tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética.

20 (b) polinucleotídeos codificando um derivado de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a), em que no referido derivado entre 1 e 10 resíduos de aminoácidos são conservativamente substituídos em comparação com o referido polipeptídeo, e o referido derivado tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;

25 (c) polinucleotídeos, o filamento complementar do qual hibridiza sob condições estringentes para um polinucleotídeo conforme definido em qualquer um de (a) a (b), e o qual codifica para um polipeptídeo com atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;

ou o filamento complementar de tal polinucleotídeo.

30 Nesse contexto, a hélice A, B, C e D do polipeptídeo EPO são regiões homólogas às respectivas regiões da hélice A, B, C e D do EPO de comprimento total de camundongo e humano conforme delineado na figura 4. É bem-conhecido na técnica como determinar homologias entre duas se-

5 qüências de polipeptídeos e alguém versado na técnica será capaz de alinhar uma dada seqüência de polipeptídeo EPO derivada, por exemplo, de outra espécie, e de determinar a respectiva posição da hélice A, B, C e D nesse polipeptídeo EPO. É preferível que o polinucleotídeo variante do EPO
10 seja derivado de um eucarioto superior, particularmente de um mamífero ou pássaro. Mamíferos preferidos são seres humanos, primatas não-humanos; roedores, por exemplo, rato ou porquinho-da-índia; ruminante, por exemplo, vaca; ou ovelha; cavalo; porco; coelho; cachorro; ou gato. Um grande número de tais polinucleotídeos que codificam EPO de comprimento total de várias espécies é conhecido, incluindo sem limitação gato (Acesso Gene Bank L10606), porco (Acesso Gene Bank 10607), ovelha (Acesso Gene Bank 10610), cachorro (Acesso Gene Bank L13027), macaco (Acesso Gene Bank M18189), macaco resus (Acesso Gene Bank L10609), camundongo (Acesso Gene Bank 12930), rato (Acesso Gene Bank L10608), humano (Acesso Gene Bank M11319), Bos taurus (Acesso Gene Bank U44762) e Bos indicus (Acesso Gene Bank L41354).

15

20 Preferivelmente, os polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo variante de EPO não têm o seguinte: (i); (ii); (iii); (iv); (v); (vi); (i) e (ii); (i) e (iii); (i) e (iv); (i) e (v); (i) e (vi); (ii) e (iii); (ii) e (iv); (ii) e (v); (ii) e (vi); (iii) e (iv); (iii) e (v); (iii) e (vi); (iv) e (v); (iv) e (vi); (v) e (vi); (i), (ii) e (iii); (i), (ii) e (iv), (i), (ii) e (v), (i), (ii), (vi), (i), (iii) e (iv); (i), (iii) e (v); (i), (iii) e (vi); (i), (iv) e (v); (i), (iv) e (vi); (i), (v) e (vi); (ii), (iii) e (iv); (ii), (iii) e (v); (ii), (iii) e (vi); (ii), (iv) e (v); (ii), (iv) e (vi); (ii), (v) e (vi); (iii), (iv) e (v); (iii), (iv) e (vi); (iii), (v) e (vi); ou (iv), (v) e (vi).

25 Um polipeptídeo que exibe atividade protetora celular é um polipeptídeo que tem pelo menos 50% (por exemplo, pelo menos: 55%; 60%; 65%; 70%; 75%; 80%; 85%; 90%; 95%; 98%; 99%; 99,5%; ou 100% ou mesmo mais) da capacidade do respectivo variante de EPO de proteger os neurônios de danos por apoptose, em que a apoptose é induzida por oxigênio ou privação de glicose, por exposição química ou radioativa ou por infecção viral ou bacteriana. Ensaios para determinar danos em células, particularmente em células neuronais, são conhecidos na técnica. Um ensaio ade-

30

quando é o ensaio de privação de glicose oxigênio, conforme descrito aqui abaixo. No ensaio descrito, a leitura para exibição é a quantidade de atividade de lactato desidrogenase (LDH). Entretanto, uma variedade de outros métodos existem, os quais permitem a avaliação dos danos induzidos em 5 uma célula e, particularmente, a quantidade de morte celular (por exemplo, apoptose, necrose). Esses ensaios incluem, sem limitação, ensaios Tunnel, ensaio MTT, ensaio de vida/morte por manchamento (por exemplo, manchamento com brometo de etídio e laranja acridina), ensaio da caspase, microscopia de elétron, corrida de DNA, os quais são bem-conhecidos na técnica.

10 Um polipeptídeo variante do EPO que exibe não essencialmente atividade homeopática é um polipeptídeo, o qual elicia na técnica conhecida os ensaios de formação de colônia, um exemplo do qual é descrito abaixo, na mesma concentração molar que o rhEPO e o wt mEPO, respectivamente, menos do que 10% da CFU-E (unidade de eritroblasto formadora de colônia), preferivelmente menos do que 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, ou 15 1%. As quantidades da CFU-E respectivas são calculadas para um dado rhEPO, wt mEPO ou variante EPO pela subtração de cada valor da quantidade de CFU-E observada em uma reação de controle (sem wt ou variante EPO).

20 No contexto dos polipeptídeos da presente invenção, o termo "junção" refere-se ao sítio em que dois aminoácidos seguem um ao outro, os quais não são consecutivos no rhEPO ou wt EPO de camundongo, e os quais são potencialmente o resultado de eventos de união ou outros rearranjos no RNAm de EPO. A respectiva junção das variantes EPO da presente invenção pode ser derivada da figura 4, por exemplo, é ENIT | RVQQ para 25 hS3, VGQQ | ALLV para h1-4, VNFY | ALLV para h1-5, KRME | PWEP para hS4, ITVP | GPVG para h1-1, LNEN | NHC para h2-I, KRME | KELM para mS, LLAN | FLRG para mG3, DTFC | RRGD para mG5, KVNF | LRGK para m301 ou LSEA | VHGR para mK3.

30 As moléculas de polinucleotídeo da invenção podem ser sintetizadas *in vitro* (por exemplo, por síntese baseada em fosforoamidita) ou podem ser obtidas de uma célula, tal como a célula de um mamífero.

As variantes de EPO nomeadas mS, mG3, mG5, m301 e mK3

com a seqüência de aminoácido deduzida conforme mostrado nas SEQ ID NOS: 14, 16, 18, 20 e 22, respectivamente, foram isoladas de camundongo. A seqüência de camundongo é altamente homóloga à seqüência humana. Um alinhamento das seqüências de aminoácido do EPO derivado de seres

5 humanos e camundongo é fornecido na figura 4. Conforme é aparente, a seqüência de camundongo é distinguida da seqüência humana pela falta de um resíduo de alanina na posição 8 e pelas seguintes 39 substituições (a enumeração é de acordo com a respectiva posição de aminoácido no EPO humano, o primeiro aminoácido indicado é o aminoácido humano naquela

10 posição e o segundo é aminoácido de camundongo correspondente): $^4\text{H} \rightarrow ^4\text{P}$, $^6\text{C} \rightarrow ^6\text{R}$, $^9\text{W} \rightarrow ^9\text{T}$; $^{11}\text{W} \rightarrow ^{11}\text{L}$, $^{18}\text{S} \rightarrow ^{18}\text{L}$, $^{19}\text{L} \rightarrow ^{19}\text{I}$; $^{27}\text{G} \rightarrow ^{27}\text{C}$; $^{43}\text{L} \rightarrow ^{43}\text{I}$; $^{52}\text{I} \rightarrow ^{52}\text{V}$; $^{54}\text{T} \rightarrow ^{54}\text{M}$; $^{60}\text{H} \rightarrow ^{60}\text{G}$; $^{61}\text{C} \rightarrow ^{61}\text{P}$. $^{62}\text{S} \rightarrow ^{62}\text{R}$; $^{64}\text{N} \rightarrow ^{64}\text{S}$; $^{84}\text{G} \rightarrow ^{84}\text{E}$; $^{85}\text{Q} \rightarrow ^{85}\text{E}$; $^{95}\text{A} \rightarrow ^{95}\text{S}$; $^{101}\text{V} \rightarrow ^{101}\text{I}$; $^{103}\text{R} \rightarrow ^{103}\text{Q}$; $^{104}\text{G} \rightarrow ^{104}\text{A}$; $^{109}\text{V} \rightarrow ^{109}\text{A}$; $^{115}\text{W} \rightarrow ^{115}\text{P}$; $^{117}\text{P} \rightarrow ^{117}\text{T}$; $^{122}\text{V} \rightarrow ^{122}\text{I}$; $^{126}\text{V} \rightarrow ^{126}\text{I}$; $^{134}\text{T} \rightarrow ^{134}\text{S}$; $^{138}\text{A} \rightarrow ^{138}\text{V}$;

15 $^{145}\text{A} \rightarrow ^{145}\text{L}$; $^{146}\text{I} \rightarrow ^{146}\text{M}$; $^{151}\text{A} \rightarrow ^{151}\text{T}$; $^{152}\text{A} \rightarrow ^{152}\text{T}$; $^{153}\text{S} \rightarrow ^{153}\text{P}$; $^{154}\text{A} \rightarrow ^{154}\text{P}$; $^{160}\text{I} \rightarrow ^{160}\text{L}$; $^{162}\text{A} \rightarrow ^{162}\text{V}$; $^{166}\text{R} \rightarrow ^{166}\text{C}$; $^{173}\text{S} \rightarrow ^{173}\text{A}$; $^{187}\text{A} \rightarrow ^{187}\text{V}$ e $^{190}\text{T} \rightarrow ^{190}\text{R}$.

Um mS, mG3, mG5, m301 ou mK3 humanizado carrega o resíduo de alanina adicional na posição 8 e/ou em um ou mais preferivelmente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 20 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 ou 37 posições da seqüência de aminoácidos humana ao invés da de camundongo. É particularmente preferido que mS, mG3, mG5, m301 e mK3 sejam completamente humanizados, isto é, que todo aminoácido nas posições de equilíbrio delineadas acima, até a extensão deles estarem presentes na respectiva variante, é de seqüência humana ao invés de ser da seqüência de camundongo. É esperado que a humanização das variantes de camundongo vá diminuir quaisquer problemas imunológicos, os quais devem ser encontrados quando do uso no tratamento de seres humanos.

As moléculas de ácido nucléico variante do EPO da invenção

30 podem ser DNA, CDNA, DNA genômico, DNA sintético ou RNA, e podem ser de filamento duplo ou de filamento único, o filamento de sentido ou de anti-sentido. Essas moléculas podem ser produzidas, por exemplo, pela rea-

ção em cadeia da polimerase (PCR) ou geradas por tratamento com uma ou mais endonucleases de restrição. Uma molécula de ácido ribonucléico (RNA) pode ser produzida por transcrição *in vitro*.

As moléculas de polinucleotídeo da invenção podem conter seqüências de ocorrência natural, ou seqüências que diferem daquelas que ocorrem naturalmente mas, devido à degeneração do código genético, codificam o mesmo polipeptídeo, isto é, os polipeptídeos com as SEQ ID NOS: 2, 47, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22. Além disso, essas moléculas de ácido nucléico não estão limitadas às seqüências codificantes, por exemplo, elas podem incluir algumas ou todas as seqüências não-codificantes que se encontram a montante ou a jusante de uma seqüência codificadora.

Além disso, as moléculas de ácido nucléico isoladas da invenção podem englobar segmentos que não são encontrados como tais no estado natural. Dessa forma, a invenção engloba moléculas de ácido nucléico recombinantes incorporadas em um vetor (por exemplo, em um plasmídeo ou vetor viral), ou no genoma de uma célula homóloga (ou o genoma de uma célula homóloga, em uma posição diferente do local cromossomal natural). Moléculas de ácido nucléico recombinantes e seus usos são discutidos adicionalmente abaixo.

Em modalidades preferidas, os polinucleotídeos da presente invenção também compreendem moléculas de ácido nucléico as quais são pelo menos 50%, preferivelmente 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas a: (a) uma molécula de ácido nucléico que codifica o polipeptídeo das SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 50, 51, 52, 53 ou 60 e (b) a seqüência de nucleotídeos das SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 55, 56, 57, 58 ou 61, respectivamente, e os quais apresentam ao mesmo tempo atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética.

A determinação da identidade porcentual entre duas seqüências é conseguida usando o algoritmo matemático de Karlin e Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873- 5877. Tal algoritmo é incorporado nos

programas BLASTN e BLASTP de Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410. Buscas por nucleotídeo BLAST são efetuadas com o programa BLASTN, pontuação = 100, comprimento de palavra = 12, para obter seqüências de nucleotídeos homólogas ao polipeptídeo variante EPO que codifica ácidos nucléicos. Buscas de proteína BLAST são efetuadas com o programa BLASTP, pontuação = 50, comprimento de palavra = 3, para obter seqüências de aminoácidos homólogas ao polipeptídeo variante EPO, respectivamente. Para obter alinhamentos intervalados para propósitos comparativos, gapped BLAST é utilizado conforme descrito em Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402. Ao utilizar os programas BLAST e gapped BLAST, os parâmetros predefinidos dos respectivos programas são usados.

A hibridização também pode ser usada como uma medida de homologia entre duas seqüências de ácidos nucléicos. Uma seqüência de ácidos nucléicos codificando qualquer uma das variantes EPO aqui descritas, ou um derivado ou fragmento seu, pode ser usada como uma sonda de hibridização de acordo com técnicas de hibridização padrão. A hibridização de uma sonda de variante EPO em DNA ou RNA de uma fonte de teste (por exemplo, uma célula de mamífero) é uma indicação da presença do DNA ou RNA relevante do EPO na melhor fonte. As condições de hibridização são conhecidas pelas pessoas versadas na técnica e podem ser encontradas em *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y., 6.3.1-6.3.6, 1991. Condições estringentes são definidas como equivalentes à hibridização em cloreto de sódio/citrato de sódio 6X (SSC) a 45°C, seguido por uma lavagem em 0,2X SSC, SDS 0,1% a 65°C. Ao selecionar uma sonda específica para uma variante carregando uma anulação interna, é preferível que a sonda usada para detectar ácidos nucléicos homólogos sobreponha os limites da anulação, por exemplo, hs3, h1-4, h1-5, hS4, mS, mG3, mG5 ou m301. Em casos onde a união leva a um C-terminal alternado da proteína, por exemplo, h1-1, h2-1 ou mK3 é preferido que a sonda usada para detectar seqüências de DNA homólogas sobreponha os limites entre a seqüência EPO conhecida e o C-terminal alternado. Por exemplo, uma sonda poderia ser

projetada, a qual compreende 10 bases complementares 5' do sítio de união e 10 bases complementares 3' do sítio de união.

Um "DNA isolado" é ou (1) um DNA que contém seqüência não-
idêntica àquela de qualquer seqüência de ocorrência natural, ou (2), no con-
5 texto de um DNA com uma seqüência de ocorrência natural (por exemplo, um CDNA ou um DNA genômico), um DNA livre de pelo menos um dos ge-
nes que flanqueiam o gene contendo o DNA de interesse no genoma do or-
ganismo no qual o gene contendo o DNA de interesse ocorre naturalmente.
O termo, dessa forma, inclui um DNA recombinante incorporado em um ve-
10 tor, em um plasmídeo autonomicamente replicante ou vírus, ou no DNA ge-
nômico de um procarioto ou eucarioto. O termo também inclui uma molécula
separada tal como um CDNA onde o DNA genômico correspondente tem
ítrons e, consequentemente, uma seqüência diferente; um fragmento ge-
nômico que não tem pelo menos um dos genes flanqueadores; um fragmen-
15 to de CDNA ou DNA genômico produzido pela reação em cadeia da polime-
rase (PCR) e que não tem pelo menos um dos genes flanqueadores; um
fragmento de restrição que não tem pelo menos um dos genes flanqueado-
res; um DNA que codifica uma proteína de ocorrência não-natural tal como
uma proteína d efusão, muteína ou fragmento de uma dada proteína; e um
20 ácido nucléico o qual é uma variante degenerada de um CDNA ou de um
ácido nucléico de ocorrência natural. Além disso, ele inclui uma seqüência
de nucleotídeos recombinante que é parte de um gene híbrido, isto é, um
gene que codifica uma proteína de fusão de ocorrência não-natural. Será
aparente a partir do precedente que DNA isolado não significa um DNA pre-
25 sente dentre centenas a milhões de outras moléculas de DNA em, por e-
xemplo, bibliotecas de CDNA ou de DNA genômico ou de digestos de restri-
ção de DNA genômico em, por exemplo, uma mistura reacional de digesto
de restrição ou uma fatia de gel eletroforético.

Outro aspecto da presente invenção é um vetor contendo o(s)
30 polinucleotídeo(s) da presente invenção ou uma proteína codificada por um
polinucleotídeo da presente invenção. O termo "vetor" refere-se a uma prote-
ína ou polinucleotídeo ou uma mistura desses a qual é capaz de ser introdu-

zida ou de introduzir as proteínas e/ou ácidos nucléicos compreendidos na célula. É preferível que as proteínas codificadas pelo polinucleotídeo introduzido sejam expressas na célula na introdução do vetor.

Em uma modalidade preferida, o vetor da presente invenção 5 compreende plasmídeos, fagemídeos, fagos, cosmídeos, cromossomos de mamífero artificiais, constructos "knock-out" e "knock-in", vírus, particularmente adenovírus, vírus vaccinia, vírus vaccinia atenuados, vírus pox canário, lentivírus (Chang, L.J. e Gay, E.E. (20001) *Curr. Gene Therap.* 1:237-251), herpes vírus, particularmente vírus herpes simplex (HSV-1, Carlezon, 10 W. A. et al. (2000) *Crit. Rev. Neurobiol.*), baculovírus, retrovírus, vírus adeno-associado (AAV, Carter, P.J. e Samulski, R.J. (2000) *J. Mol. Med.* 6:17-27), rinovírus, vírus da imunodeficiência humana (HIV), filovírus e versões projetadas suas (ver, por exemplo, Cobinger G. P. et al (2001) *Nat. Biotechnol.* 19:225-30), virossomas, lipossomas de DNA "nus" e partículas revestidas de 15 ácido nucléico, particularmente esferas de ouro. Particularmente preferidos são os vetores virais como vetores adenovirais ou vetores retrovirais (Lindemann et al. (1997) *Mol. Med.* 3:466-76 e Springer et al. (1998) *Mol. Cell.* 2:549-58). Lipossomas são geralmente pequenas vesículas unilamelares ou multilamelares feitas de lipídeos catiônicos, neutros e/ou aniônicos, por exemplo, por tratamento de ultra-som de suspensões lipossomais. O DNA 20 pode, por exemplo, estar ligado ionicamente à superfície dos lipossomas ou internamente encerrado no lipossoma. Misturas de lipídeos adequadas são conhecidas na técnica e compreendem, por exemplo, DOTMA (brometo de 1,2-dioleiloxpropil-3-trimetilamônio) e DPOE (dioleoilfosfatidiletanolamina), 25 os quais ambos têm sido usados em uma variedade de linhagens celulares.

Partículas revestidas de ácido nucléico são outro instrumento para a introdução de ácidos nucléicos nas células usando as chamadas "armas de gene"; as quais permitem a introdução mecânica de partículas nas células. Preferivelmente, as partículas por si só são inertes, e consequentemente, estão em uma modalidade preferida feita de esferas de ouro.

Em outro aspecto, o polinucleotídeo da presente invenção é operativamente ligado às seqüências de controle de expressão que permitem a

expressão em células hospedeiras procarióticas e/ou eucarióticas. Os elementos regulatórios transcricionais/traducionais referidos acima incluem, mas não estão limitados, a promotores, intensificadores, operadores, silenciadores, repressores e outros elementos induzíveis e não-induzíveis, constitutivos, regulados por ciclo celular e regulados metabolicamente que são conhecidos pelas pessoas versadas na técnica e que direcionam ou, de outra forma, regulam a expressão gênica. Tais elementos regulatórios incluem, mas não estão limitados, a elementos regulatórios que direcionam a expressão constitutiva como, por exemplo, promotores transcritos pela RNA polimerase do tipo III, por exemplo, promotores do gene RNAsn U6 ou RNAsc 7SK, o gene inicial imediato hCMV de citomegalovírus, os promotores inicial ou tardio do SV40 de adenovírus, promotor viral e as seqüências ativadoras derivadas de, por exemplo, NBV, HCV, HSV, HPV, EBV, HTLV, MMTV ou HIV; as quais permitem a expressão induzível como, por exemplo, o promotor CUP-1, o repressor tet, conforme empregado, por exemplo, nos sistemas tet-on e tet-off, o sistema lac, o sistema trp; elementos regulatórios direcionando a expressão tecido-específica, preferivelmente a expressão específica de célula nervosa, por exemplo, promotor (por exemplo, Thy-1.2, NSE, cadeia leve de miosina II, tirosina hidroxilase, promotor CaMKIIalfa, cadeia beta do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), dopamina beta-hidroxilase, Tau, elementos regulatórios (por exemplo, NRSE/RE-1; elemento silenciador neurônio-restritivo/elemento repressor 1) direcionando a expressão específica do ciclo celular como, por exemplo, cdc2, cdc25C ou ciclina A; ou o sistema TAC, o sistema TRC, as principais regiões operadora e promotora do fago A, as regiões de controle da proteína revestida fd, o promotor da 3-fosfoglicerato quinase, os promotores da fosfatase ácida e os promotores dos fatores de emparelhamento α - ou α - de levedura.

Conforme aqui utilizado, "operativamente ligado" significa incorporado em um constructo genético de forma que as seqüências de controle de expressão eficaz controlam a expressão de uma seqüência codificadora de interesse.

Semelhantemente, os polinucleotídeos da presente invenção

podem formar parte de um gene híbrido que codifica seqüências de polipeptídeo adicionais, por exemplo, uma seqüência a qual codifica uma proteína que funciona como um marcador ou repórter. O gene híbrido pode levar a uma proteína de fusão ou as duas ou mais partes podem ser separadas por 5 sítios de entrada ribossomais internos (IRES), os quais levam à expressão de duas ou mais proteínas separadas. Exemplos de genes marcador e repórter incluem da β -lactamase, cloranfenicol acetiltransferase, (CAT), adenosa desaminase (ADA), aminoglicosídeo fosfotransferase (neo^r, G418^r), diidrofolato redutase (DHFR), higromicina-B-fosfotransferase (HPH), timidina 10 quinase (TK), lacZ (codificando a β -galactosidase), proteína fluorescente verde (GFP) e variantes suas e xantina guanina fosforibosiltransferase (XGPRT). Como com muitos dos procedimentos padrão associados com a prática da invenção, artesãos versados estarão informados dos reagentes úteis adicionais, por exemplo, seqüências adicionais que podem servir a função 15 de um marcador ou repórter. Se a expressão do gene híbrido leva a um polipeptídeo, o polipeptídeo híbrido irá geralmente incluir uma primeira porção e uma segunda porção; a primeira porção sendo um polipeptídeo variante EPO e a segunda porção sendo, por exemplo, o repórter descrito acima de uma região constante de Ig ou parte de uma região constante Ig, por exemplo, os domínios CH2 e CH3 da cadeia pesada de IgG2. Outros híbridos poderiam incluir uma seqüência de peptídeo heteróloga para facilitar a purificação e/ou detecção, por exemplo, de um sinalizador antigênico como, por exemplo, um sinalizador myc, ou um sinalizador com ligação preferencial a uma região, por exemplo, taq de quitina ou sinalizador His. Moléculas de 20 ácido nucléico recombinantes também podem conter uma seqüência de polinucleotídeo codificando um polipeptídeo variante EPO operativamente ligado a uma seqüência de sinal heteróloga. Tais seqüências de sinal podem direcionar a proteína para diferentes compartimentos na célula e são bem-conhecidas por alguém versado na técnica. Uma seqüência de sinalização 25 preferida é uma seqüência que facilita a secreção da proteína resultante. Preferivelmente, essas seqüências de sinalização e/ou taq são projetadas de forma que elas possam ser clivadas da variante EPO depois da purificação 30

para proporcionar uma proteína essencialmente pura sem dois muitos aminoácidos, preferivelmente não mais do que 10 aminoácidos adicionais para o EPO final. Tais sítios de clivagem são bem-conhecidos na técnica e compreendem, por exemplo, sítios de clivagem de endopeptidase e sítios de clivagem de inteína.

Outro aspecto da presente invenção é uma célula hospedeira geneticamente projetada com o polinucleotídeo ou o vetor conforme delineado acima. As células hospedeiras que podem ser usadas para propósitos da invenção incluem, mas não estão limitadas, a células procarióticas tais como bactérias (por exemplo, *E. coli* e *B. subtilis*), as quais podem ser transformadas com, por exemplo, vetores de expressão de DNA de cosmídeo, DNA bacteriófago recombinante ou DNA de plasmídeo contendo as moléculas de polinucleotídeo da invenção; células eucarióticas simples como levedura (por exemplo, *Saccharomyces* e *Pichia*), as quais podem ser transformadas com, por exemplo, vetores de expressão de levedura recombinantes contendo a molécula de polinucleotídeo da invenção; sistemas de célula de inseto como, por exemplo, células Sf9 ou Hi5, as quais podem ser infectadas com, por exemplo, vetores de expressão de vírus recombinante (por exemplo, baculovírus) contendo as moléculas de polinucleotídeo da invenção; oócitos *Xenopus*, os quais podem ser injetados com, por exemplo, plasmídeos; sistemas de célula vegetal, os quais podem ser infectados com, por exemplo, vetores de expressão de vírus recombinantes (por exemplo, vírus mosaico de couve-flor (CaMV) ou vírus mosaico de tabaco (TMV)) ou transformados com vetores de expressão de plasmídeo recombinantes (por exemplo, plasmídeo Ti) contendo uma seqüência de nucleotídeo variante EPO; ou sistemas de célula de mamífero (por exemplo, células COS, CHO, BHK, HEK293, VERO, HeLa, MDCK, Wi38, Swiss 3T3 e NIH 3T3) as quais podem ser transformadas com constructos de expressão recombinantes contendo, por exemplo, promotores derivados, por exemplo, do genoma de células de mamíferos (por exemplo, o promotor de metalotioneína) de vírus mamífero (por exemplo, o promotor tardio de adenovírus, CMV IE e o promotor 7,5K do vírus vaccinia) ou de células bacterianas (por exemplo, a ligação do repressor tet

é empregada nos sistemas tet-on e tet-off). Também úteis como células hospedeiras são as células primárias ou secundárias obtidas diretamente de um mamífero e transfectadas co um vetor de plasmídeo ou infectadas com um vetor viral. Dependendo da célula hospedeira e do respectivo vetor usado para introduzir o polinucleotídeo da invenção o polinucleotídeo pode integrar, por exemplo, no cromossomo ou no DNA mitocondrial ou pode ser mantido extracromossomalmente como, por exemplo, epissomalmente ou pode estar somente temporariamente compreendido nas células.

Uma vez que o EPO é altamente glicosilado *in vivo*, é desejável escolher um sistema de expressão, o qual proporcione a glicosilação fiel da proteína. Conseqüentemente, é preferível introduzir os polinucleotídeos que codificam variantes de partes do EPO da presente invenção em células eucarióticas superiores, particularmente em células de mamífero, por exemplo, células COS, CHO, BHK, HEK293, VERO, HeLa, MDCK, Wi38, Swiss 3T3 ou NIH 3T3.

Outro aspecto da presente invenção é um animal não-humano transgênico contendo um polinucleotídeo, um vetor e/ou uma célula hospedeira conforme descrito acima. O animal pode ser um animal mosaico, o que significa que somente parte das células compõndo o corpo compreendem polinucleotídeos, vetores e/ou células da presente invenção ou o animal pode ser um animal transgênico o que significa que todas as células do animal compreendem os polinucleotídeos e/ou vetores da presente invenção ou são derivadas de uma célula da presente invenção. Animais mosaicos ou transgênicos podem ser ou homo- ou heterozigóticos, em relação aos polinucleotídeos da presente invenção contidos na célula. Em uma modalidade preferida, os animais transgênicos são ou animais "knock-out" ou "knock-in" homo- ou heterozigóticos com relação aos genes os quais codificam para as proteínas da presente invenção. Os animais podem, em princípio, ser qualquer animal, preferivelmente, entretanto, ele é um mamífero, selecionado do grupo de primatas não-humanos, cavalo, bovino, ovelha, cabra, porco, cachorro, gato, bode, coelho, camundongo, rato, porquinho-da-índia, hâmster ou gerbo.

Outro aspecto da presente invenção é um processo para produ-

zir um polipeptídeo variante EPO codificado por um polinucleotídeo da presente invenção compreendendo: o cultivo da célula hospedeira descrita acima e a recuperação do polipeptídeo codificado pelo referido polinucleotídeo. Combinações preferidas de células hospedeiras e vetores são delineadas 5 acima e a combinação adicional será prontamente aparente para alguém versado na técnica. Dependendo do uso posterior tencionado do peptídeo recuperado, um tipo celular adequado pode ser escolhido. Conforme delineado acima, células eucarióticas são preferivelmente escolhidas, se for desejado que as proteínas produzidas pelas células exibam um padrão essencialmente natural de glicosilação e células procarióticas são escolhidas se, por exemplo, glicosilação ou outras modificações, as quais são normalmente introduzidas nas proteínas somente em células eucarióticas, não forem desejadas ou necessárias.

É conhecido na técnica anterior que a farmacocinética dos fármacos de proteína pode ser significativamente alterada por modificação da proteína. Para EPO de comprimento total, foi descrito que a glicosilação, particularmente a presença de resíduos de ácido siálico no final das cadeias laterais de oligossacarídeo, atribui para o tempo de circulação (WO 95/05465) e que a remoção dos grupos de ácido siálico expõe os resíduos 15 de galactose, o que aumenta a depuração pelo fígado. Conseqüentemente, uma tentativa tomada para aumentar o tempo de circulação do EPO foi o aumento nos resíduos de ácido siálico. Várias tentativas, dessa forma, envolvem o fornecimento de sítios de glicosilação adicionais (ver, por exemplo, WO 91/05867, WO 94/09257 e WO 01/81405). Tais análogos de EPO modificados 20 podem ter pelo menos uma cadeia de carboidrato N-ligada ou O-ligada adicional. Outras tentativas de aumentar a meia-vida do EPO envolvem a adição de resíduos de polietilenoglicol (PEG) de comprimento de estrutura de aminoácido variada (ver, por exemplo, WO 00/32772, WO 01/02017, WO 03/029291). Outra tentativa usou a modificação de moléculas 25 EPO com pelo menos um oligossacarídeo N-ligado ou O-ligado, as quais foram ainda modificadas por oxidação, sulfatação, fosforilação PEGilação ou uma combinação destes (ver WO 2005/025606). Todas essas tentativas po-

dem ser igualmente empregadas para estender a meia vida das variantes EPO da presente invenção e, concordantemente, em uma modalidade preferida acima, o processo compreendendo ainda a etapa de modificação da variante EPO, em que a modificação é selecionada do grupo consistindo em 5 oxidação, sulfatação, fosforilação, adição de oligossacarídeos ou combinações destes. Se a adição de outros oligonucleotídeos N-ligados ou O-ligados for desejada, é possível introduzi-las pela introdução de sítios de glicosilação adicionais conforme tem sido descrito na técnica anterior, por exemplo, nas posições 30, 51, 57, 69, 88, 89, 136 e/ou 138, se a respectiva posição estiver 10 presente na variante da presente invenção (ver WO 01/81405).

Outro aspecto da invenção é um processo para produzir células capazes de expressar pelo menos uma das variantes EPO compreendendo células geneticamente projetadas *in vitro* com o vetor da reivindicação 3 ou 15 4, em que o(s) referido(s) polipeptídeo(s) variante(s) é(são) codificado(s) por um polinucleotídeo da presente invenção.

Outro aspecto da invenção é um polipeptídeo com a seqüência de aminoácidos codificada por um polinucleotídeo da invenção ou obtêvel pelo processo mencionado acima. Os polipeptídeos da invenção incluem todos aqueles descritos aqui e fragmentos desses polipeptídeos, os quais 20 carregam entre anulações 1 e 10N- e/ou C-terminais. Preferivelmente, as anulações são de menos de 10, menos de 9, menos de 8, menos de 7, menos de 6, menos de 5, menos de 4, menos de 3, menos de 2 ou menos de 1 aminoácido. Os polipeptídeos embarcados pela invenção também incluem proteínas de fusão que contêm ou a variante da porção EPO conforme indicado nas SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22 ou a versão 25 humanizada de 14, 16, 18, 20 e 22 ou um fragmento seu conforme definido acima fundido com uma seqüência de aminoácido não-relacionada. As seqüências não-relacionadas podem compreender domínios funcionais adicionais ou peptídeos de sinalização. Peptídeos de sinalização estão descritos 30 em maiores detalhes e exemplificados abaixo.

Os polipeptídeos podem ser qualquer um daqueles descritos acima, mas com não mais do que 10 (por exemplo, não mais do que: 10,

nove, oito, sete, seis, cinco, quatro, três, dois ou uma) substituições conservativas. Substituições conservativas são conhecidas na técnica e tipicamente incluem a substituição de, por exemplo, um aminoácido polar com outro aminoácido polar e um aminoácido ácido com outro aminoácido ácido. Contudo, substituições conservativas preferivelmente incluem substituições com os seguintes grupos de aminoácidos: glicina, alanina, valina, prolina, isoleucina e leucina (cadeia lateral alifática, não-polar); ácido aspártico e ácido glutâmico (cadeia lateral negativamente carregada); asparagina, glutamina, metionina, cisteína, serina e treonina (cadeia lateral polar não-carregada); lisina, histidina e arginina; e fenilalanina, triptofano e tirosina (cadeia lateral aromática); e lisina, arginina e histidina (cadeia lateral positivamente carregada). É bem-conhecido na técnica como determinar o efeito de uma dada substituição, por exemplo, no pK_1 , etc. Tudo o que é requerido de um polipeptídeo com uma ou mais substituições conservativas é que ele tenha pelo menos 50% (por exemplo, pelo menos: 55%; 60%; 65%, 70%; 75%; 80%; 85%; 90%; 95%; 98%; 99%; 99,5%; ou 100% ou mais) da capacidade da variante EPO inalterada de proteger os neurônios de dano/morte celular (por exemplo, por apoptose ou necrose), em que a morte celular é induzida por privação de oxigênio e/ou glicose, por exposição tóxica, química, física, mecânica, inflamatória ou de radiação ou por infecção viral ou bacteriana.

Tanto polipeptídeos quanto peptídeos podem ser produzidos por técnicas de DNA recombinante *in vitro* padrão e transgênese *in vivo*, usando seqüências de nucleotídeos codificando os polipeptídeos ou peptídeos apropriados. Métodos bem-conhecidos por aqueles versados na técnica podem ser usados para construir vetores de expressão contendo seqüências codificantes relevantes e sinais de controle de transcrição/tradução apropriados. Ver, por exemplo, as técnicas descritas em Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2^a Ed.) [Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y., 1989] e Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* [Green Publishing Associates e Wiley Interscience, N.Y., 1989].

Polipeptídeos e fragmentos da invenção também incluem aque-

les descritos acima, porém modificados para uso *in vivo* pela adição, nas extremidades amino- e/ou carbóxi-terminais, de agentes e bloqueio para facilitar a sobrevivência do polipeptídeo relevante *in vivo*. Isso pode ser útil naquelas situações nas quais o peptídeo terminal tende a ser degradado 5 pelas proteases antes da absorção celular. Tais agentes bloqueadores podem incluir, sem limitação, seqüências peptídicas relacionadas ou não-relacionadas adicionais que podem ser ligadas aos resíduos amino e carbóxi-terminais do peptídeo a ser administrado. Isso pode ser feito ou quimicamente durante a síntese do peptídeo ou por tecnologia do DNA recombinante 10 por métodos familiares aos artesãos de habilidade mediana.

Alternativamente, agentes bloqueadores, tais como ácido piroglutâmico ou outras moléculas conhecidas na técnica podem ser ligadas aos resíduos amino- e carbóxi-terminais, ou o grupo amino no amino terminal ou o grupo carboxila no carbóxi-terminal pode ser substituído com uma diferente 15 porção. Da mesma forma, os peptídeos podem ser covalentemente ou não-covalentemente acoplados a proteínas "carreadoras" farmaceuticamente aceitáveis antes da administração.

O termo fragmento de peptídeo ou polipeptídeo "isolado", conforme aqui utilizado, refere-se a um fragmento de peptídeo ou polipeptídeo o 20 qual ou não tem uma contraparte de ocorrência natural ou foi separado ou purificado de componentes os quais naturalmente o acompanham, por exemplo, em tecidos tais como língua, pâncreas, fígado, baço, ovário, testículo, músculo, tecido de articulação, tecido neural, tecido gastrointestinal ou tecido tumoral ou fluidos corporais tais como sangue, soro ou urina. Tipicamente, o fragmento de peptídeo ou polipeptídeo é considerado "isolado" 25 quando ele está pelo menos 70%, por peso seco, livre das proteínas e outras moléculas orgânicas de ocorrência natural com a qual ele está naturalmente associado. Preferivelmente, uma preparação de um polipeptídeo (ou fragmento de peptídeo seu) da invenção é pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 90% e mais preferivelmente pelo menos 99%, em peso seco, o polipeptídeo (ou o fragmento de peptídeo seu), respectivamente, da invenção. Dessa forma, por exemplo, uma preparação do polipeptídeo x é 30

pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 90%, e mais preferivelmente 99% em peso seco, de polipeptídeo x. Uma vez que um polipeptídeo que é quimicamente sintetizado é, por sua natureza, separado dos componentes que naturalmente o acompanham, o polipeptídeo sintético é "isolado".

5 Um polipeptídeo isolado (ou fragmento de peptídeo) da invenção pode ser obtido, por exemplo, pela extração de uma fonte natural (por exemplo, de fluidos de tecidos ou corporais); pela expressão de um ácido nucléico recombinante que codifica o polipeptídeo; ou por síntese química. Um polipeptídeo que é produzido em um sistema celular diferente da fonte da 10 qual ele naturalmente se origina é "isolado", porque será necessário ser livre de componentes os quais naturalmente o acompanham. O grau de isolamento ou pureza pode ser medido por um método apropriado, por exemplo, cromatografia em coluna, eletroforese em gel de poliacrilamida ou análise de HPLC.

15 Outro aspecto da invenção é um anticorpo, o qual especificamente se liga ao polipeptídeo variante EPO codificado por polinucleotídeos da invenção ou obteníveis pelo processo mencionado acima. O termo "anticorpo" compreende anticorpos monoclonais ou policlonais e seus fragmentos de ligação, particularmente fragmentos Fc assim como os chamados "anticorpos de cadeia individual" (Bird R. E. et al (1988) *Science* 242:423-6), 20 anticorpos quiméricos, humanizados, particularmente CDR-enxertados, e dia, por tetrácorpos (Holliger P. et al (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-8). São também compreendidas imunoglobulinas como proteínas que são selecionadas através de técnicas incluindo, por exemplo, exposição de fago para se ligar especificamente aos polipeptídeos da presente invenção. 25 Nesse contexto, o termo "ligação específica" refere-se a anticorpos promovidos contra peptídeos derivados de junções de união ou junções criadas por outros processos, por exemplo, ENIT | VGQQ de hS3, VGQQ | ALLV de h1-4, VNFY | ALLV de h1-5, KRME | PWEP de hS4, ITVP | GPVG de h1-1, LNEN | NHC de h2-1, KRME | KELM de mS, LLAN | FLRG de mG3, 30 DTFC | RRGD de mG5, KVNF | LRGK de m301 ou LSEA | VHGR de mK3. Tais peptídeos podem compreender mais ou menos aminoácidos N- ou C- terminais. Um anticorpo é considerado como sendo específico para a varian-

te EPO, se sua afinidade para a variante for pelo menos 50 vezes superior, preferivelmente 100 vezes superior, mais preferivelmente pelo menos 1000 vezes superior do que para o EPO humano ou de murino de comprimento total. Preferivelmente anticorpos específicos da presente invenção não se 5 ligam ou essencialmente não se ligam ao EPO humano ou de murino de comprimento total. É bem-conhecido na técnica como fazer anticorpos e selecionar anticorpos com uma dada especificidade.

Outro aspecto da presente invenção envolve o uso de um polinucleotídeo, um vetor, uma célula hospedeira ou um polipeptídeo da presente 10 invenção para a produção de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma condição associada com o dano tecidual devido à morte celular (por exemplo, apoptose e necrose). A apoptose ou necrose leva à destruição celular, a qual pode ser prevenida ou melhorada ao usar um polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira ou polipeptídeo da presente invenção. A 15 morte celular pode ser induzida por muitos estímulos internos e externos diferentes e incluem, preferivelmente, isquemia, hipóxia, infecção bacteriana ou viral, radiação, ou induzida por estímulos metabólicos, tóxicos, químicos, auto-imunológicos ou traumáticos. É bem-conhecido na técnica como detectar morte celular como, por exemplo, usando critérios morfológicos, um ensaio de TUNNEL, ensaio de MTT, ensaio de vida/morte por manchamento 20 (por exemplo, manchamento com brometo de etídio e laranja acridina), ensaio de caspase, microscopia eletrônica, corrida de DNA ou o ensaio de liberação de LDH descrito abaixo. Por exemplo, apoptose é caracterizada por fragmentação de cromatina, extravasamento dos conteúdos celulares e eventualmente morte da célula. Ela foi reconhecida por desempenhar um papel 25 em muitos processos patológicos agudos ou crônicos. Concordantemente, um uso preferido da presente invenção compreende a administração de polinucleotídeos, vetores, células hospedeiras ou polipeptídeos da presente invenção para prevenir, tratar ou melhorar distúrbios neurodegenerativos ou 30 neurinflamatórios agudos e crônicos, distúrbio agudo ou crônico do coração (por exemplo, enfarte do miocárdio), pulmão (por exemplo, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica), rim (por exemplo, glomerulonefrite), fígado (por

REIVINDICAÇÕES

1. Variante da eritropoietina (EPO), caracterizada pelo fato de que codifica um polinucleotídeo, selecionado do grupo consistindo em:
 - (a) polinucleotídeos que codificam pelo menos a forma madura dos polipeptídeos nomeados hs3, h1-4, h1-5, hs4, h1-1, h2-1, mS, mG3, mG5, m301 e mK3 com a seqüência de aminoácidos deduzida conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22, respectivamente;
 - 5 (b) polinucleotídeos com a seqüência codificante, conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21, codificando pelo menos a forma madura do polipeptídeo;
 - 10 (c) polinucleotídeo que codifica uma versão humanizada dos polipeptídeos mS, mG3, mG5, m301 e mK3 com a seqüência de aminoácidos deduzida conforme mostrado nas SEQ ID Nos: 14, 16, 18, 20 e 22,
 - 15 (d) polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo compreendendo uma fusão de uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo de seqüências de aminoácidos conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 24, 26, 28 e 30, no N-terminal de uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo de seqüências de aminoácidos conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 20 32, 34, 36 e 38;
 - 25 (e) polinucleotídeos compreendendo uma fusão de seqüências de polinucleotídeo selecionadas do grupo de seqüências de polinucleotídeo conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 23, 25, 27 e 29, 5' de uma seqüência de polinucleotídeo selecionada do grupo de seqüências de polinucleotídeo conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 31, 33, 35 e 37;
 - 30 (f) polinucleotídeos que codificam um derivado de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a) a (e), em que no referido derivado entre 1 e 10 resíduos de aminoácidos são conservativamente substituídos em comparação com o referido polipeptídeo, e o referido derivado tem atividade celular protetora e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoietica;
 - (g) polinucleotídeos que codificam um fragmento de um polipep-

tídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a) até (f), em que no referido fragmento entre 1 e 10 resíduos de aminoácidos são N- e/ou C-terminalmente anulados e/ou entre 1 e 10 aminoácidos são anulados N- e/ou C-terminalmente da junção em comparação com o referido polipeptídeo, e o referido fragmento tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente não tem atividade hematopoiética;

5 (h) polinucleotídeos os quais são pelo menos 50% idênticos a um polinucleotídeo conforme definido em qualquer um de (a) até (g) e os quais codificam para um polipeptídeo com atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética; e

10 15 (i) polinucleotídeos, o filamento complementar dos quais hibridiza sob condições estringentes em um polinucleotídeo conforme definido em qualquer um de (a) até (h) e o qual codifica para um polipeptídeo com atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;

ou o filamento complementar de tal polinucleotídeo.

2. Homólogo de uma variante de eritropoietina (EPO), caracterizado pelo fato de que codifica um polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, a partir de outra espécie eucariótica superior.

20 3. Variante de eritropoietina (EPO), caracterizada pelo fato de que codifica um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo em:

25 (a) polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo variante E-PO, os quais compreendem a parte N-terminal do EPO de comprimento total incluindo a hélice A, e os quais não têm pelo menos um dos seguintes:

(i) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos entre a hélice A e a hélice B;

(ii) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos de hélice B;

30 (iii) um fragmento de pelo menos 2 aminoácidos entre a hélice B e a hélice C;

(iv) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos de hélice C;

(v) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos entre as héli-

ces C e D; e/ou

- (vi) um fragmento de pelo menos 10 aminoácidos de hélice D; em que o referido variante tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;
- (b) polinucleotídeos que codificam um derivado de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a), em que no referido derivado entre 1 e 10 resíduos de aminoácidos são conservativamente substituídos em comparação com o referido polipeptídeo, e o referido derivado tem atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;
- (c) polinucleotídeos, o filamento complementar dos quais hibridiza sob condições estringentes em um polinucleotídeo conforme definido em qualquer um de (a) até (b) e o qual codifica para um polipeptídeo com atividade protetora celular e, particularmente, neuroprotetora, mas essencialmente sem atividade hematopoiética;
- ou o filamento complementar de tal polinucleotídeo.
4. Polinucleotídeo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que é DNA, RNA ou DNA genômico.
5. Vetor, caracterizado pelo fato de que contém o polinucleotídeo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.
6. Vetor de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo está operativamente ligado às seqüências de controle de expressão, permitindo a expressão nas células hospedeiras procarióticas e/ou eucarióticas.
7. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que é geneticamente projetada com o polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, ou ao vetor como definido na reivindicação 5 ou 6.
8. Animal não-humano transgênico, caracterizado pelo fato de que comprehende o polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, um vetor como definido na reivindicação 5 ou 6 e/ou uma célula hospedeira como definido na reivindicação 7.

9. Processo para produzir um polipeptídeo variante EPO codificado pelo polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que compreende: o cultivo da célula hospedeira como definido na reivindicação 7, e a recuperação do polipeptídeo codificado pelo referido polinucleotídeo.

10. Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de modificar a referida variante EPO, em que a modificação é selecionada de um grupo consistindo em oxidação, sulfatação, fosforilação, adição de oligossacarídeos ou combinações destes.

11. Processo para produzir células capazes de expressar pelo menos uma das variantes EPO, caracterizado pelo fato de que compreende células geneticamente projetadas *in vitro* com o vetor como definido na reivindicação 5 ou 6, em que o(s) referido(s) polipeptídeo(s) da variante EPO é/são codificados pelo polinucleotídeo como definido nas reivindicações 1 a 4.

12. Polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que tem a seqüência de aminoácidos codificada pelo polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou obtêvel pelo processo como definido na reivindicação 9 ou 10.

13. Anticorpo, caracterizado pelo fato de que se liga especificamente ao polipeptídeo como definido na reivindicação 12.

14. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, um vetor como definido na reivindicação 5 ou 6, uma célula hospedeira como definido na reivindicação 7, um polipeptídeo como definido na reivindicação 12, e/ou um anticorpo como definido na reivindicação 13, e um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis.

15. Uso do polinucleotídeo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, um vetor como definido na reivindicação 5 ou 6, uma célula hospedeira como definido na reivindicação 7, um polipeptídeo como definido na reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que é para a produ-

ção de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma condição associada com o dano tecidual devido à morte celular.

16. Uso de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a referida morte celular é induzida por isquemia, hipóxia, infecção bacteriana, infecção viral, auto-imunológica, traumática ou quimicamente induzida ou induzida por radiação.

17. Uso de acordo com a reivindicação 15 ou 16, caracterizado pelo fato de que a referida condição é um distúrbio neurodegenerativo e/ou neuroinflamatório agudo ou crônico, é um distúrbio agudo ou crônico do coração, pulmão, rim, fígado ou pâncreas ou a referida condição está associada com um transplante de órgão ou célula.

18. Uso de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o referido distúrbio neurodegenerativo e/ou neuroinflamatório agudo é selecionado do grupo consistindo em isquemia cerebral ou enfarte, incluindo oclusão embólica e oclusão trombótica, reperfusão após isquemia aguda, injúria isquêmica/hipóxica perinatal, parada cardíaca, hemorragia intracranial, hemorragia subaracnoidal e lesões intracraniais, lesões da corda espinal, lesões intravertebrais, síndrome infantil agitada por lesão em chicotada, encefalite infecciosa, meningite, dor de cabeça.

20 19. Uso de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o referido distúrbio neurodegenerativo e/ou neuroinflamatório crônico é selecionado do grupo consistindo em demências, doença de Pick, doença do corpo de Lewy difuso, paralisia supranuclear progressiva (síndrome de Steele-Richardson), esclerose múltipla, atrofia do sistema múltipla, condições epiléticas crônicas associadas com neurodegeneração, doenças neuronais motoras, ataxias degenerativas, degeneração basal cortical, complexo demência de ALS-Parkinson de Guam, panencefalite esclerosante subaguda, doença de Huntington, doença de Parkinson, sinucleinopatias, afasia progressiva primária, degeneração estriatonigral, doença de Machado-Joseph/ataxia espinocerebelar tipo 3 e degenerações olivopontocerebelares, doença de Gilles de La Tourette, paralisia bulbar e pseudobulbar, atrofia muscular espinal e espinobulbar (doença de Kennedy), esclerose lateral pri-

mária, paraplegia espástica familiar, doença de Werdnig-Hoffmann, doença de Kugelberg-Welander, doença de Tay-Sach, doença de Sandhoff, doença espástica familiar, paraparesse espástica, leucoencefalopatia multifocal progressiva, disautonomia familiar (síndrome de Riley-Day), polineuropatias, 5 doenças de prion, desejo compulsivo, distúrbios afetivos, distúrbios esquizofrênicos, síndrome da fadiga crônica, dor crônica.

20. Uso de acordo com a reivindicação 15 ou 16, caracterizado pelo fato de que a referida condição é o envelhecimento.
21. Uso de acordo com as reivindicações 15 a 20, caracterizado 10 pelo fato de que o medicamento é administrado antes de ou depois do início da referida condição.