

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 762**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2010 PCT/EP2010/003201**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.12.2010 WO10136192**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2010 E 10722005 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2435581**

54 Título: **Métodos de uso de un nuevo receptor de eritropoyetina protector de tejido (NEPOR)**

30 Prioridad:

**28.05.2009 US 474017**

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

**26.12.2017**

73 Titular/es:

**MOLECULAR HEALTH GMBH (100.0%)  
Kurfürstenanlage 21  
69115 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**JACKSON, DAVID B.;  
STEIN, MARTIN;  
VOSS, HARTMUT;  
BROCK, STEPHAN;  
DANES, CHRISTOPHER G. y  
SOOD, ANIL**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 647 762 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos de uso de un nuevo receptor de eritropoyetina protector de tejido (NEPOR)

### Información sobre aplicaciones relacionadas

#### Antecedentes

5 Aprobada por la FDA en 1993 para el tratamiento de la anemia, la eritropoyetina (EPO) es una hormona glucoproteica de 193 aminoácidos producida por los riñones para regular la producción de los glóbulos rojos (GR); un proceso que se suele denominar eritropoyesis. La EPO se identificó originalmente como una citocina que promueve la supervivencia y la diferenciación de los progenitores de eritrocitos, pero también se ha demostrado que posee funciones neuroprotectoras, en particular en respuesta a la lesión isquémica en el sistema nervioso central (SNC). El uso clínico de la EPO ha sido prevalente en el tratamiento de los pacientes anémicos con cáncer, mientras que los estudios en marcha están explorando las posibilidades de la EPO para el tratamiento de enfermedades neurológicas (p. ej., el accidente cerebrovascular). A pesar de todo, los estudios clínicos recientes en los pacientes con cáncer han comenzado a revelar acontecimientos adversos muy preocupantes que sugieren que la administración de la EPO recombinante de humano (rHuEPO) puede afectar de manera adversa a la supervivencia global del paciente. Así pues, en la oncología médica existe una necesidad urgente por conocer y predecir mejor la prevalencia o susceptibilidad a este efecto, para que se pueda contraindicar, continuar o mantener la administración de la rHuEPO.

15  
20 Henke et al. describen que la EPO podría afectar adversamente al pronóstico de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello si las células cancerosas expresan receptores de la eritropoyetina (*Journal of Clinical Oncology*, vol. 24, pág. 4708-13, 10 de octubre de 2006).

#### Compendio

25 La presente descripción describe miembros de la familia de la efrina (efrina A1 y EPH-B4) como mediadores de la señalización citoprotectora de la EPO, bien como homodímeros y/o como compañeros heterodiméricos del EPOR y/o entre sí. Nuestros datos inciden en la importancia de la EPH-B4 y de la efrina A1 a la hora de mediar esta función. Como tal, el NEPOR representa un nuevo receptor para la EPO procedente de una combinación única (a saber, a través de la homo- y/o heterodimerización) de los componentes procedentes de la biología de la efrina y, posiblemente, del receptor de la EPO. Véase la figura 3 para un resumen.

30 La presente descripción se basa en los datos de que la EPH-B4 y la efrina A1 son los componentes de un nuevo receptor de la EPO (NEPOR). Tenemos la capacidad de demostrar que la EPO estimula que se potencie el crecimiento tumoral en un sistema modelo de tumor en el ratón. La EPO estimula la vía de señalización de la Akt en las líneas celulares que no expresan el receptor de la EPO. Estas células expresan la EPH-B4, que es un receptor que estimula la señalización a través de la vía de la Akt. Además, en un modelo de tumor en ratón se puede demostrar que la EPO es capaz de estimular un crecimiento tumoral significativo. Tal actividad se inhibe a través del silenciamiento del receptor EPH-B4, lo que resalta que génesis tumoral mediada por la EPO es por naturaleza dependiente de EPH-B4. Como tal, el NEPOR se compone principalmente de EPH-B4 como un homodímero y/o en asociación heterodimérica con el EPOR o una efrina. Además, los análisis *in silico* apuntan a la complementariedad estructural entre la EPO y las moléculas de efrina, en particular de la efrina A1. Así pues, el NEPOR también podría estar compuesto por la efrina A1 como un homodímero y/o en asociación heterodimérica con la EPH-B4. En la figura 3 y en la tabla 5 se da a conocer un resumen de estas posibles especies de NEPOR.

40 La presente descripción da a conocer un método para valorar un tejido por la expresión del complejo receptor NEPOR protector de tejido y/o la EPH-B4 y/o la efrina A1. Al hacerlo así, la presente descripción da a conocer un método pronóstico para clasificar a los pacientes que tienen un tumor entre idóneos (NEPOR no está presente en el tumor, NEPOR-) o no idóneos (NEPOR está presente en el tumor; NEPOR+) para el tratamiento con la EPO. En concreto, el método para valorar el NEPOR del tejido tumoral y/o los componentes de la expresión génica comprende:

- 45
- (a) aislar una muestra de tejido de un individuo que está recibiendo o que habrá de recibir la eritropoyetina,
  - (b) determinar el nivel de expresión del transcrito o transcritos del gen o genes del NEPOR (a saber, ARNm de la EPH-B4 y/o de la efrina A1) y/o la presencia de los productos génicos del NEPOR (a saber, las proteínas EPH-B4 y/o efrina A1) a partir del tejido aislado, y
  - 50 (c) correlacionar la presencia de estos productos de expresión génica de los componentes del NEPOR con una respuesta fisiológica negativa al tratamiento con eritropoyetina.

En un aspecto, se dan a conocer métodos para determinar si un paciente es idóneo para el tratamiento con eritropoyetina (EPO), que comprende (A) el aislamiento de una muestra de tejido de dicho paciente; (B) la determinación del nivel de expresión de EPH-B4 en dicha muestra; y (C) la correlación de la presencia de expresión

de EPH-B4 con una respuesta fisiológica negativa al tratamiento con la EPO. En una realización, el nivel de expresión se determina con la medición de la cantidad de la proteína EPH-B4 (SEQ ID n.º 2) en dicha muestra. En otra realización, el nivel de expresión se determina con la medición de la cantidad de ARNm de EPH-B4 (SEQ ID n.º 6) en dicha muestra.

5 Tal y como se muestra en los ejemplos, los datos de la presente solicitud demuestran que los métodos reivindicados, que implican la valoración de los niveles de expresión de EPH-B4, son útiles a la hora de determinar la idoneidad de un paciente para el tratamiento con la EPO.

En otra realización, los métodos comprenden además la determinación del nivel de expresión en la muestra de al menos uno entre la proteína efrina A1 (SEQ ID n.º 3) o la proteína del EPOR (SEQ ID n.º 1). De igual forma, los  
10 métodos pueden comprender la determinación del nivel de expresión en la muestra de al menos uno entre el ARNm de la efrina A1 (SEQ ID n.º 7) o el ARNm del EPOR (SEQ ID n.º 5).

Los métodos para la determinación del nivel de expresión de EPH-B4 se explican a continuación con más detalle.

En una realización, la presencia de la expresión de EPH-B4 se define mediante el porcentaje de células de dicha muestra que presentan niveles detectables de la proteína EPH-B4 y de la concentración de la proteína EPH-B4 en  
15 dichas células. En un ejemplo, la presencia de expresión de EPH-B4 se define mediante la fórmula  $P \times C$ , donde P es el porcentaje de células de dicha muestra que presenta niveles detectables de proteína EPH-B4, y C es la concentración relativa de proteína EPH-B4 en dichas células, en donde se le asigna una puntuación de 0, 1, 2, 3 o 4 a una muestra que comprende un porcentaje de células que presentan niveles detectables de la proteína EPH-B4 de, respectivamente, 0%, <25%, 25-50%, 50-75% y 75-100%, en donde una puntuación de 1, 2 o 3 se asigna a  
20 concentraciones relativas de la proteína EPH-B4 de, respectivamente, escasa, moderada y espesa, y en donde un producto resultante de >3 denota la expresión de EPH-B4 en la muestra.

En otra realización, la presencia de la expresión de EPH-B4 se determina mediante la valoración semicuantitativa de la puntuación histológica,  $HSCORE = \sum Pi (i + 1)$ ; en donde i es la intensidad de la tinción, calculada sobre la base de estimaciones del porcentaje de células epiteliales teñidas positivamente en cada una de las 4 categorías de  
25 intensidad (0, 1+, 2+ y 3+). Pi es el porcentaje de células epiteliales teñidas para cada intensidad, que varía del 0 al 100%, y 1 es una corrección para la densidad óptica. En un aspecto, los portaobjetos teñidos los pueden puntuar dos investigadores basándose en la puntuación histoquímica (en donde una puntuación de >100 se define como expresión alta, y  $\leq 100$  como expresión baja), de acuerdo con el método descrito por McCarty et al. [PMID: 3893381 y 17532033], que considera tanto la intensidad de la tinción como el porcentaje de células teñidas.

30 En una realización de la presente descripción, se determina el nivel de expresión de EPH-B4, pero no de EPH-A1. Como alternativa, se determina el nivel de expresión de EPH-B4, pero no el de otros componentes del NEPOR. Esto incluye la posibilidad de que se determine la cantidad de otras proteínas que no forman parte del NEPOR.

En una realización más, solo se determina el nivel de expresión de EPH-B4.

En una realización, el nivel de expresión de EPH-B4 se determina por inmunohistoquímica. En otra realización, el  
35 nivel de expresión de EPH-B4 se determina por ELISA. En otra realización, el nivel de expresión de EPH-B4 se determina por RT-PCR. En otra realización, la expresión de EPH-B4 se determina mediante el uso del número de copias de *ephb4* por técnicas citogenéticas, tales como la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH, por su nombre en inglés), hibridación genómica comparativa (CGH, por su nombre en inglés), hibridación genómica comparativa en matrices, y mediante cariotipado virtual con matrices de SNP.

40 Preferiblemente, la expresión de los genes de componentes del NEPOR (a saber, los ARNm de EPH-B4, y/o efrina A1) se determina mediante una técnica de biología molecular seleccionada del grupo que consiste en PCR, qPCR, R-PCR, análisis de expresión génica con micromatrices, análisis por transferencia de tipo Northern, retrotranscripción y amplificación, zimografía, reacción en cadena de la ligasa, NASBA, ensayo de protección a la ARNasa (RPA, por su nombre en inglés), electroforesis capilar con fluorescencia inducida por láser (CE-LIF, por su  
45 nombre en inglés) y combinaciones de las mismas.

Preferiblemente, la determinación de la presencia de los productos génicos del NEPOR se hace mediante la detección de las proteínas correspondientes con un procedimiento de tipo inmunoensayo, en donde el procedimiento de tipo inmunoensayo se selecciona del grupo de inmunoprecipitación, enzimoimmunoensayo (EIA, por su nombre en inglés), radioinmunoensayo (RIA, por su nombre en inglés) o fluoroinmunoensayo, un ensayo quimioluminiscente,  
50 un ensayo de aglutinación, inmunonefelometría, inmunoturbidimetría, una transferencia de tipo Western, un inmunoensayo competitivo, un inmunoensayo no competitivo, un inmunoensayo homogéneo, un inmunoensayo heterogéneo, un bioensayo y un ensayo con delator, tal como un ensayo con luciferasa. El procedimiento de inmunoensayo está, lo más preferiblemente, basado en el ELISA.

55 Preferiblemente, el método para detectar el NEPOR y/o la EPH-B4, y/o la efrina A1, en un tejido tumoral también puede ser un método de imagen *in situ*, que comprende la administración de un anticuerpo anti-NEPOR o un péptido de fijación al NEPOR conectado a un radioligando o a otro radiomarcador, y medir la distribución y localización

5 tisular del radioligando o de otro radiomarcador. Preferiblemente, la muestra de tejido se selecciona de tejido canceroso o células circulantes procedentes del mismo, o de un grupo de tejidos y líquidos biológicos, tales como sangre, linfa, orina, líquido cefalorraquídeo. En concreto, el individuo es un paciente con cáncer que se va a tratar con eritropoyetina o que se está tratando con eritropoyetina. Preferiblemente, el efecto fisiológico negativo es el incremento de la progresión tumoral y/o la poca supervivencia del paciente. Preferiblemente, la presencia de los productos génicos del NEPOR y/o EPH-B4, y/o efrina A1, es indicativa de un incremento de la progresión tumoral y/o poca supervivencia del paciente tras el tratamiento con eritropoyetina. Preferiblemente, el cáncer es uno de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de intestino delgado, leucemia, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de endometrio, cáncer de estómago, linfoma no de Hodgkin, cáncer de riñón, carcinoma de células renales (CCR), melanoma maligno, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vejiga, cáncer de vulva, cáncer de pene, cáncer de testículo, cáncer de timo, sarcoma de Kaposi, cáncer de ojo, cáncer de glándula suprarrenal, cáncer de cerebro, cáncer de cuello de útero, cáncer de apéndice, cáncer adenoideo, cáncer del conducto colédoco, cáncer de uretra, cáncer raquídeo, familia de tumores de Ewing, cáncer extragonadal de célula reproductora, cáncer extrahepático del conducto colédoco, cáncer de la trompa de Falopio, cánceres de las partes blandas, cáncer de hueso, linfoma de Hodgkin, cáncer de ano, mesotelioma maligno, cáncer de vagina, cáncer de piel, cáncer del sistema nervioso central (craneofaringioma), blastoma pleuropulmonar, cáncer del seno paranasal y de la cavidad nasal, cáncer de célula transitoria de la pelvis renal y uretra, cáncer de hipófisis, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC), cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, y cáncer de glándula salivar. Es particularmente preferido que el cáncer se seleccione del grupo de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC), cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga y cáncer de mama.

La presente descripción da a conocer además un método para diseñar un tratamiento que modula la actividad de NEPOR y/o EPH-B4, y/o efrina A1, que comprende:

- 25 1) realizar un ensayo de cribado *in vitro* en busca de tratamientos específicos de NEPOR y/o EPH-B4, y/o efrina A1; mediante la medición de la fijación de los compuestos problema a un complejo receptor NEPOR protector de tejido y/o la EPH-B4 y/o la efrina A1 (también en comparación con complejos homodiméricos del EPOR), en donde el compuesto problema está marcado (fijación del compuesto problema marcado a los complejos del receptor detallados en la figura 10) y se mide mediante la detección del marcador unido al compuesto problema;
- 30 2) realizar una estrategia de cribado sin marcación, tal como la resonancia de plasmón superficial. En este caso, el compuesto problema no está marcado y su fijación a los complejos del receptor NEPOR (como se detalla en la figura 10) se mide mediante un método (óptico) independiente de la marcación.
- 35 3) analizar la actividad de NEPOR y/o EPH-B4, y/o efrina A1, (a) al poner en contacto un compuesto problema con un complejo receptor NEPOR protector de tejido (N) o una célula que expresa el complejo receptor NEPOR protector de tejido; medir el nivel de la actividad de (N) en la célula; identificar un compuesto problema que incrementa o disminuye el nivel de actividad de (N) en comparación con el nivel de actividad de (N) medido en ausencia del compuesto problema; y ensayar la actividad protectora de tejido del compuesto problema identificado;
- 40 4) analizar la modulación de la fijación entre NEPOR y ligando, y/o la fijación del ligando a la EPH-B4 y/o a la efrina A1 (a) al poner en contacto (N) con un ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido y/o el ligando de la EPH-B4, y/o de la efrina A1 unido a una primera marcación, y una cantidad equivalente de un compuesto problema unido a un segundo marcador en las condiciones que llevan a la fijación, retirada del material sin fijar de (N), y la detección del nivel de la primera y segunda marcación, donde si la segunda marcación está presente, el compuesto se fija (N) y si el nivel de la primera marcación disminuye con respecto al nivel de la primera marcación cuando el ligando marcado se pone en contacto con (N) en las condiciones que llevan a la fijación en ausencia de un compuesto problema después de la retirada del material sin fijar, entonces se identifica un compuesto que se fija a (N).
- 45 5) identificar un compuesto que modula una actividad protectora de tejido en un mamífero, que comprende: (a) administrar el compuesto a un primer animal inmediatamente después de infligirle una lesión, en donde el primer animal expresa de manera endógena un complejo receptor NEPOR protector de tejido; y (b) administrar el compuesto a un segundo animal inmediatamente después de infligirle la misma lesión que en la etapa (a), en donde el segundo animal no expresa un complejo receptor NEPOR protector de tejido y/o EPH-B4, y/o efrina A1, o componentes de los mismos; de tal manera que si la recuperación de la lesión difiere en el animal de la etapa (a) en comparación con el animal de la etapa (b), se identifica un compuesto que modula una actividad protectora de tejido.

55 La presente descripción da a conocer además métodos para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un humano, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que modula la actividad de un complejo receptor NEPOR protector de tejido a un humano que necesita tal tratamiento o prevención, siempre y cuando el compuesto no sea la EPO. El compuesto se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo específico contra el complejo receptor NEPOR protector de tejido, un anticuerpo que es específico contra un ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido, una molécula pequeña, un péptido, un mutante de la EPO, una

quimera de EPO: dominio de fijación de ligando de la efrina, un miembro de una colección, y una combinación de los mismos. Preferiblemente, tales compuestos modulan negativamente la función protectora de tejido que tiene el complejo receptor NEPOR en los cánceres mencionados más arriba. Preferiblemente, tales compuestos modulan positivamente la función protectora de tejido que tiene complejo receptor NEPOR, en donde la enfermedad o el trastorno está ocasionado por hipoxia, trastornos convulsivos, enfermedades neurodegenerativas, intoxicación por neurotoxinas, esclerosis múltiple, hipotensión, paro cardíaco, radiación o hipoglucemia.

La presente descripción da a conocer además un método para identificar compuestos que modulan la actividad de señalización protectora de tejido del NEPOR, que comprende (a) poner en contacto un compuesto problema con la célula que expresa el complejo receptor NEPOR; (b) medir el nivel de la actividad protectora de tejido iniciada por la activación del NEPOR en la célula; (c) identificar un compuesto problema que incrementa o disminuye el nivel de actividad del complejo NEPOR protector de tejido en una célula; (d) ensayar los compuestos identificados por su actividad protectora de tejido mediada por el NEPOR; y (e) ensayar los medicamentos identificados por su actividad inhibitoria de NEPOR. Preferiblemente, el ensayo de la etapa (d) es una actividad del complejo receptor NEPOR protector de tejido que se mide mediante un ensayo de proliferación o diferenciación celular. Más preferiblemente, las células del ensayo de proliferación o diferenciación celular se modifican genéticamente por recombinación para que expresen EPH-B4, y/o EPOR, y/o efrina A1. Más preferiblemente, las células expresan en su interior un receptor de EPO y se transforman con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que (i) está unida operativamente a un promotor, y (ii) codifica la EPH-B4 o bien la efrina A1, o ambas. Lo más preferiblemente, las células expresan en su interior la EPH-B4 y/o la efrina A1, y se transforman con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que (i) está operativamente unida a un promotor, y (ii) codifica un polipéptido del receptor de la EPO.

La presente descripción da a conocer además un método para identificar un compuesto que modula la interacción entre un complejo receptor NEPOR protector de tejido y un ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido, que comprende: (a) poner en contacto un complejo receptor NEPOR protector de tejido con uno o varios compuestos problema; y (b) medir la actividad del complejo receptor NEPOR protector de tejido, mediante lo cual, si la actividad medida en (b) difiere de la actividad del complejo receptor NEPOR protector de tejido en ausencia de uno o más compuestos problema, entonces se identifica un compuesto que modula la interacción entre el complejo receptor NEPOR protector de tejido y el ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido. Preferiblemente, la actividad del complejo receptor NEPOR protector de tejido se mide mediante la proliferación o la diferenciación celular. Preferiblemente, la actividad del complejo receptor NEPOR protector de tejido medida es la capacidad que tiene el complejo receptor NEPOR protector de tejido para interaccionar con un ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido. Preferiblemente, la etapa de ensayar el compuesto identificado por su actividad protectora de tejido comprende detectar la presencia de la nucleolina en la célula. Preferiblemente, la etapa de ensayar el compuesto identificado por su actividad protectora de tejido comprende detectar o medir un incremento del nivel de la actividad de la neuroglobina o de la citoglobina en una célula. Preferiblemente, el complejo receptor NEPOR protector de tejido está en solución. Preferiblemente, el complejo receptor NEPOR protector de tejido está en una célula. Preferiblemente, el compuesto inhibe la fijación de un ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido a un complejo receptor NEPOR protector de tejido. Preferiblemente, el compuesto realiza la fijación de un ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido a un complejo receptor NEPOR protector de tejido. Preferiblemente, el complejo receptor NEPOR protector de tejido puesto en contacto en la etapa (a) está en la superficie celular. Preferiblemente, el complejo receptor NEPOR protector de tejido está en una membrana celular aislada. Preferiblemente, la actividad del complejo receptor NEPOR protector de tejido se compara con la activación del receptor EPOR para identificar los compuestos específicos del NEPOR. Preferiblemente, el complejo receptor NEPOR protector de tejido está inmovilizado sobre una superficie sólida y, más preferiblemente, la superficie sólida es una placa de microtitulación o un chip.

La presente descripción da a conocer además un método para identificar un compuesto que se fija a un complejo receptor NEPOR protector de tejido, que comprende: (a) poner en contacto un compuesto problema con un fragmento del complejo receptor NEPOR protector de tejido que se fija a un ligando que comprende al menos un dominio extracelular del receptor de la EPO o del receptor EPH-B4 o del receptor efrina A1 y al menos un dominio extracelular del receptor de la EPO o del receptor EPH-B4 o del receptor efrina A1, el cual está fusionado a un fragmento Fc unido a un soporte sólido; y (b) poner en contacto un compuesto problema con un fragmento del complejo receptor EPOR de fijación al ligando que comprende al menos dos dominios extracelulares del receptor de la EPO fusionados a un fragmento Fc unido a un soporte sólido, (c) retirar los compuestos problema sin fijar de los soportes sólidos; (d) identificar el compuesto fijado al fragmento del complejo receptor NEPOR protector de tejido, pero no al complejo receptor EPOR (y viceversa), mediante lo cual se identifica un compuesto fijado al soporte sólido como un compuesto que se fija específicamente a un complejo receptor NEPOR protector de tejido, o un compuesto que se fija específicamente a un complejo receptor EPOR.

La presente descripción da a conocer además un método para identificar un compuesto que se fija a un complejo receptor NEPOR protector de tejido, que comprende: (a) poner en contacto un compuesto problema con un fragmento del complejo receptor NEPOR protector de tejido que se fija al ligando que comprende al menos un dominio extracelular del receptor de la EPO o del receptor EPH-B4 o del receptor efrina A1, el cual está fusionado a un fragmento Fc unido a un soporte sólido; (b) retirar los compuestos problema sin fijar desde los soportes sólidos; (c)

identificar el compuesto unido al fragmento del complejo receptor NEPOR protector de tejido, mediante lo cual se identifica un compuesto fijado al soporte sólido como un compuesto que se fija específicamente al complejo receptor NEPOR protector de tejido.

5 La presente descripción da a conocer además un método para identificar un compuesto que se fija a un complejo receptor NEPOR protector de tejido, que comprende: (a) poner en contacto un fragmento del complejo receptor NEPOR protector de tejido que comprende al menos un dominio extracelular del receptor de la EPO o del receptor EPH-B4 o del receptor efrina A1 y al menos un dominio extracelular del receptor de la EPO o del receptor EPH-B4 o del receptor efrina A1, el cual está fusionado a un fragmento Fc unido a un soporte sólido con (i) un ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido unido a un primer marcador y (ii) una cantidad equivalente de un compuesto problema unido a un segundo marcador en las condiciones que llevan a la fijación; (b) retirar el material sin fijar del complejo receptor NEPOR protector del tejido; y (c) detectar el nivel del primer y segundo marcador, en donde si el segundo marcador está presente, el compuesto se fija al complejo y si el nivel del primer marcador disminuye con respecto al nivel del primer marcador cuando el ligando marcado entra en contacto con un complejo receptor NEPOR protector de tejido en las condiciones que llevan a la fijación en ausencia de un compuesto problema después de la retirada del material sin fijar, entonces se identifica un compuesto que se fija a un complejo receptor NEPOR protector de tejido.

10 La presente descripción da a conocer además un método para identificar un compuesto que modula la fijación de un ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido a complejo receptor NEPOR protector de tejido, que comprende: (a) poner en contacto un ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido con un fragmento del complejo receptor NEPOR protector de tejido que comprende al menos un dominio extracelular del receptor de la EPO o del receptor EPH-B4 o del receptor efrina A1 y al menos un dominio extracelular del receptor de la EPO o del receptor EPH-B4 o del receptor efrina A1, el cual está fusionado a un fragmento Fc unido a un soporte sólido; en presencia de uno o varios compuestos problema en las condiciones que llevan a la fijación; y (b) medir la cantidad de complejo receptor NEPOR protector de tejido ligado que se fija al complejo receptor NEPOR protector de tejido; mediante lo cual, si la cantidad de ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido fijado medida en (b) difiere de la cantidad de ligando del complejo receptor NEPOR protector del tejido fijado medida en ausencia de uno o varios compuestos problema, entonces se identifica un compuesto que modula la fijación de un ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido al complejo receptor NEPOR protector de tejido.

20 Preferiblemente, la cantidad de ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido fijado se mide mediante el uso de un anticuerpo específico contra el ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido. Preferiblemente, se marca el ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido y se mide la fijación del ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido al complejo receptor NEPOR protector de tejido mediante la detección de la marcación unida al ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido. Preferiblemente, se marca el ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido y se mide la fijación del ligando marcado al complejo receptor NEPOR protector de tejido mediante la detección del marcador unido al ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido. Preferiblemente, la marcación es fluorescente. Preferiblemente, el compuesto problema es un anticuerpo específico contra el complejo receptor NEPOR protector de tejido. Preferiblemente, el compuesto problema es una molécula pequeña. Preferiblemente, el compuesto problema es un péptido o un miembro de una colección. Preferiblemente, el ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido es la EPO o derivados de la misma. Preferiblemente, el compuesto se fija al complejo receptor NEPOR protector de tejido o al ligando del mismo. Preferiblemente, se compara la actividad del complejo receptor NEPOR protector de tejido con la activación del receptor EPOR para identificar los compuestos específicos de NEPOR.

30 La presente descripción da a conocer además un método para identificar un compuesto que modula una actividad protectora de tejido en un mamífero, que comprende: (a) administrar el compuesto a un primer animal inmediatamente después de infligirle una lesión, en donde el primer animal expresa de forma endógena un complejo receptor NEPOR protector de tejido; y (b) administrar el compuesto a un segundo animal inmediatamente después de infligirle la misma lesión que en la etapa (a), en donde el segundo animal no expresa un complejo receptor NEPOR protector de tejido o componentes del mismo; de tal manera que si la recuperación de la lesión difiere en el animal de la etapa (a) en comparación con el animal de la etapa (b), se identifica un compuesto que modula una actividad protectora de tejido.

45 La presente descripción da a conocer además un método para diseñar un compuesto que interfiere con la actividad promotora de la supervivencia debida al NEPOR, que comprende:

- 50 (a) dar a conocer la estructura molecular de las especies de NEPOR y dar a conocer las secuencias aminoacídicas de los polipéptidos que componen el NEPOR;
- 55 (b) utilizar el programa informático que comprende un ordenador digital para diseñar un compuesto químico o construcción proteica que se predice que se fija al NEPOR; y
- (c) opcionalmente, diseñar construcciones de proteínas que imitan el NEPOR en su estado dimérico o multimérico (p. ej., construcciones de Fc).

La presente descripción da a conocer además un método para identificar compuestos que modulan la actividad de señalización protectora de tejido debida al NEPOR, que comprende (a) poner en contacto un compuesto problema con el complejo receptor NEPOR; (b) medir el nivel de actividad protectora de tejido iniciada por la activación del NEPOR; (c) identificar un compuesto problema que incrementa o disminuye el nivel de actividad del complejo receptor NEPOR protector de tejido; (d) ensayar los compuestos terapéuticos identificados por su actividad protectora de tejido mediada a través del NEPOR; y (e) ensayar los compuestos terapéuticos identificados por su actividad inhibidora del NEPOR. Preferiblemente, la actividad del complejo receptor NEPOR protector de tejido se mide mediante la medición de la fijación del compuesto problema al complejo receptor NEPOR. Más preferiblemente, se marca el compuesto problema y se mide la fijación del compuesto problema marcado al complejo receptor NEPOR protector de tejido mediante la detección del marcador unido al compuesto problema. Más preferiblemente, se mide la actividad del complejo receptor NEPOR protector de tejido mediante la medición de la fijación del compuesto problema al complejo receptor NEPOR protector de tejido.

La presente descripción da a conocer además un método para adquirir imágenes del tejido tumoral que es capaz de mejorar su supervivencia en respuesta al tratamiento con EPO, que comprende administrar un anticuerpo anti-NEPOR o un péptido de fijación a NEPOR conectado a un radioligando o a otro radiomarcador, y medir su distribución en el tejido y la localización del radioligando o de otro radiomarcador. Preferiblemente, el anticuerpo anti-NEPOR es un anticuerpo monoclonal o policlonal seleccionado del grupo de anticuerpos recogidos en la tabla 6.

La presente descripción da a conocer además un método para modular la supervivencia celular en el tejido que da positivo para el NEPOR, que comprende administrar mutantes de la EPO y péptidos seleccionados del grupo que consiste en los péptidos de la SEQ ID n.º 17 hasta la SEQ ID n.º 212.

La presente descripción da a conocer además un método para modular la supervivencia celular en tejido que da positivo para el NEPOR, que comprende administrar una cantidad eficaz de una quimera de EPO, que comprende un dominio de fijación de ligando del receptor efrina seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID n.º 215 y la SEQ ID n.º 216.

En otro aspecto, se dan a conocer métodos para realzar la eficacia del tratamiento con la EPO en un paciente, que comprenden administrar al paciente, junto con el tratamiento con la EPO, un siRNA específico de la EPH-B4. En una realización, el siRNA se selecciona del grupo de ácidos nucleicos bicatenarios que consiste en la SEQ ID n.º 242 y la SEQ ID n.º 243; SEQ ID n.º 244 y la SEQ ID n.º 245; SEQ ID n.º 246 y SEQ ID n.º 247; SEQ ID n.º 248 y SEQ ID n.º 249; SEQ ID n.º 250 y SEQ ID n.º 251; SEQ ID n.º 252 y SEQ ID n.º 253; SEQ ID n.º 254 y SEQ ID n.º 255; SEQ ID n.º 256 y SEQ ID n.º 257; SEQ ID n.º 258 y SEQ ID n.º 259; y SEQ ID n.º 260 y SEQ ID n.º 261.

En otra realización, el siRNA es una doble cadena de SEQ ID n.º 266 y SEQ ID n.º 267. En otra, el siRNA es una doble cadena de SEQ ID n.º 219 y SEQ ID n.º 220.

### Breve descripción de las figuras

En la figura 1 se muestra la localización genómica de los genes humanos del receptor Eph (EPH) y de la efrina (EFN) en los cromosomas humanos.

En la figura 2 se muestra la arquitectura de dominios de los receptores Eph y de las efrinas (subclases A y B).

En la figura 3 se muestran las combinaciones teóricas de los receptores que podrían tener capacidad de fijación a la EPO.

En la figura 4 se muestra un procedimiento para identificar posibles receptores transmembranarios que se fijen a la EPO. Se extrajeron todas las proteínas que contenían dos dominios membranarios FN3 proximales (84 en total) y se les valoraron los resultados de respuesta a la hipoxia. La EPH-B4 era una de las cuatro posibles proteínas extraídas. Además, es el único miembro de la familia de receptores de la efrina que es mortal para el embrión, pues la muerte del embrión ocurre antes que cuando se les elimina el EPOR.

En la figura 5 se muestra el locus de la EPO de humano que muestra el gen de EPH-B4 vecino.

En la figura 6 se muestra un esquema de los resultados del análisis de las UTR en 5' y 3' (y 500 pb adicionales a cada lado) de los genes de EPO, EPOR y EPH-B4 en busca de la presencia de sitios de fijación de factores de transcripción inducibles por hipoxia. Este estudio se realizó con el algoritmo «Match» de TRANSFAC (*Nucleic Acids Res.*, 1 de enero de 2003, 31 (1): 374-8) para analizar la composición de los sitios de fijación de HIF1. Resultó sorprendente el hallazgo de que sólo los genes de EPO y de EPH-B4 contenían tales sitios, lo que respaldaba la hipótesis de que la EPH-B4 induce realmente la hipoxia. La figura describe las secuencias de nucleótidos como SEQ ID n.º 225 a 233, respectivamente, en orden de aparición y las secuencias de las proteínas como SEQ ID n.º 268 a 273, respectivamente, en orden de aparición.

En la figura 7A se muestra un análisis estructural de la asociación entre la efrinaA5 y la EphB2 en comparación con la de EPO a EPOR. Este análisis estructural revela varios rasgos comunes coherentes con una propensión que tiene

la efrina A1 por fijarse a la EPO. En el panel superior se muestra la homología de la región de fijación a la EPO del EPOR para las moléculas de la efrina A de humano. En la figura 7B se comparan los aspectos estructurales de la efrina A con EPOR. En la figura se describen las SEQ ID n.º 234 a 240 en la primera caja, los restos 73 a 107 de la SEQ ID n.º 234, 75 a 109 de la SEQ ID n.º 235, 81 a 119 de la SEQ ID n.º 236, 85 a 123 de la SEQ ID n.º 237, 76 a 114 de la SEQ ID n.º 238, 79 a 117 de la SEQ ID n.º 239, y 76 a 105 de la SEQ ID n.º 240 en la segunda caja, los restos 31 a 34 de la SEQ ID n.º 234, 31 a 34 de la SEQ ID n.º 235, 33 a 36 de la SEQ ID n.º 236, 36 a 39 de la SEQ ID n.º 237, 30 a 33 de la SEQ ID n.º 238, 30 a 33 de la SEQ ID n.º 239, y 26 a 32 de la SEQ ID n.º 240 en la tercera caja, y los restos 45 a 53 de la SEQ ID n.º 234, 47 a 55 de la SEQ ID n.º 235, 50 a 58 de la SEQ ID n.º 236, 54 a 62 de la SEQ ID n.º 237, 47 a 55 de la SEQ ID n.º 238, 48 a 56 de la SEQ ID n.º 239, y 47 a 55 de la SEQ ID n.º 240 en la cuarta caja.

En la figura 8 se muestra la tinción del hipocampo con los anticuerpos anti-EPH-B4 y anti-EPOR. Se debe observar que hay una sorprendente coexpresión de ambas proteínas limitada sólo a determinadas células. Estos datos sugieren la existencia de acoplamiento funcional de la actividad de EPH-B4 y EPOR.

En la figura 9 se muestra la coimmunoprecipitación de EPH-B4 utilizando el EPOR etiquetado con FLAG. Este hallazgo es coherente con la noción de que EPH-B4 y EPOR podrían heterodimerizarse.

En la figura 10 se muestran las posibles especies diferentes de NEPOR (sin comprometerse con la teoría). En esta representación, las especies homo- o heterodiméricas de NEPOR se muestran como construcciones de Fc. Esto imita la dimerización de los monómeros independientes del receptor. Cualquier método que permite la producción de tales dímeros de NEPOR se puede emplear para cribar en busca de agonistas y antagonistas específicos del NEPOR, que incluyen moléculas pequeñas, péptidos, proteínas y variantes de la EPO.

En la figura 11 se muestra un alineamiento de los mutantes de la proteína EPO que se predice que se fijan al NEPOR más favorablemente que al EPOR. Tales mutantes se predice que son principalmente protectores de tejido en oposición a los hematopoyéticos, en particular las versiones que combinan las mutaciones descritas.

En la figura 12 se muestran los niveles de ARNm de líneas celulares de cáncer de ovario. El ARN se aisló de un panel de líneas celulares de cáncer de ovario y se retrotranscribió en ADNc. Se realizó la PCR con los cebadores específicos para el receptor de la EPO, EPH-B4, efrina A1 y actina.

En la figura 13 se muestra la expresión de la proteína en las líneas celulares de cáncer de ovario. Se aislaron los extractos de proteínas de un panel de líneas celulares de cáncer de ovario. Las muestras se separaron por electroforesis en gel de SDS-Page. Las inmunotransferencias realizadas con anticuerpos contra el receptor de la EPO (R&D Biosystems), EPH-B4 (obsequio de Prakash Gil), efrina A1 y actina (Sigma-Aldrich) se utilizaron para comparar la expresión de las proteínas.

En la figura 14 se muestra que los EE (estimulantes de la eritropoyesis) protegen de la apoptosis inducida por la quimioterapia. Las líneas celulares de cáncer de ovario HeyA8, SkoV3ip1 y HeyA8-MDR (quimiorresistente) se trataron con 50 U de eritropoyetina (EPO), docetaxel a 50 nM, o una combinación de EPO y docetaxel, durante 48 horas. A continuación, las células se fijaron y el ADN se tiñó con yoduro de propidio. A continuación, se cuantificó el porcentaje de células sub G1 con un citómetro de flujo (BD).

En la figura 15 se muestran las vías de señalización activadas en respuesta a la EPO en las líneas celulares de cáncer de ovario. Las líneas celulares previamente caracterizadas por los niveles de expresión de EPOR, EPH-B4 y efrina A1 se lavaron y se hicieron crecer en el medio libre de suero durante dos horas. A continuación, las células se trataron con 50 U de EPO, se recogieron y se designaron puntos temporales (0, 5 y 30 minutos). Se aislaron los extractos de proteínas y se analizaron por inmunotransferencia con anticuerpos contra fosfo-STAT5 (Invitrogen), fosfo-AKT, fosfo-ERK (Cell Signaling) y actina (Sigma-Aldrich).

En la figura 16 se muestra el crecimiento tumoral inducido por la eritropoyetina en las ratonas atímicas. A las ratonas se les inyectó por vía i.p.  $1 \times 10^6$  células de cáncer de ovario Hey MDR. El día 8 después de las inyecciones, se inyectó a las ratonas determinadas cantidades de EPO (10, 50, 100 U, tres ratonas por grupo) en días alternos. A) Las ratonas se sacrificaron el día 26 y se midió la masa tumoral. B) Se aislaron extractos de proteínas a partir de los tumores y se analizaron por inmunotransferencia con anticuerpos específicos contra fosfo-AKT ser 473, fosfo-ERK (Cell Signaling) y pSTAT5b (Invitrogen).

En la figura 17 se muestra que la expresión de EPH-B4 efectúa el efecto promotor del tumor de la EPO. A las ratonas hembra atímicas se les inyectaron por vía i.p.  $1 \times 10^6$  células HeyA8-MDR. A día 8 después de la inyección, las células se trataron con el siRNA de control-DOPC, siRNA de EPH-B4-DOPC, EPO, o EPO + control o siRNA de EPH-B4-DOPC (10 por grupo) (50 U de EPO dadas 3 veces a la semana, 5 µg de siRNA 2 veces a la semana). Las ratonas se sacrificaron el día 25 y se les midió la masa del tumor. Los análisis estadísticos se realizaron con la prueba de la *t* de Student. B) Distribución de la masa tumoral por grupo.

En la figura 18 se muestra la distribución de la masa tumoral.

En la figura 19 se muestra un análisis por inmunotransferencia de las células HeyA8-MDR y A2780cp20 expuestas a la EPO (50 U/ml) durante 15 y 30 minutos, o MG132 (10  $\mu$ M) durante 30 minutos, seguido de la coimmunoprecipitación con un anticuerpo anti-EpHB4.

5 En la figura 20 se muestra gráficamente el efecto de la inhibición de EphB4 y EpoR sobre la fijación de la EPO marcada con yodo 125 en las líneas celulares HeyA8, HeyA8-MDR y A2780cp20.

10 En la figura 21 se representa gráficamente el análisis inmunohistoquímico de la EpoR realizado sobre especímenes de cáncer de ovario epitelial de 4  $\mu$ m de grosor incluidos en parafina y fijados con formol. "O" designa a los pacientes que dan negativo para la EpoR, mientras que "1" designa a los pacientes que dan positivo para la EpoR. El símbolo "†" designa los puntos con censura estadística, es decir, el último seguimiento médico de los pacientes que no han muerto.

15 En la figura 22 se representa gráficamente el análisis inmunohistoquímico de la EphB4 realizado sobre especímenes de cáncer de ovario epitelial de 4  $\mu$ m de grosor incluidos en parafina y fijados con formol. "O" designa a los pacientes que dan negativo para la EphB4, mientras que "1" designa a los pacientes que dan positivo para la EphB4. El símbolo "†" designa los puntos con censura estadística, es decir, el último seguimiento médico de los pacientes que no han muerto.

20 En la figura 23 se representa gráficamente el análisis inmunohistoquímico de EphB4 y EpoR realizado sobre especímenes de cáncer de ovario epitelial de 4  $\mu$ m de grosor incluidos en parafina y fijados con formol. "O" designa a los pacientes que dan negativo para la EphB4 y para la EpoR; "1" designa a los pacientes que dan positivo para la EphB4 y negativo para la EpoR; "2" designa a los pacientes que dan negativo para la EphB4 y positivo para la EpoR; "3" designa a los pacientes que dan positivo para la EphB4 y positivo para la EpoR. El símbolo "†" designa los puntos con censura estadística, es decir, el último seguimiento médico de los pacientes que no han muerto.

En la figura 24 se muestra gráficamente que la inhibición de la EphB4, pero no de la EpoR, redujo la formación de metástasis inducida por la EPO en el cáncer de ovario A2780 *in vivo*.

25 En la figura 25 se muestra gráficamente que la inhibición de la EphB4, pero no de la EpoR, redujo el crecimiento tumoral basal y bloqueaba completamente el crecimiento del cáncer de ovario A2780 *in vivo* inducido por la EPO.

En la figura 26 se demuestra gráficamente que la inhibición selectiva con el siRNA de EphB4 elimina completamente el crecimiento *in vivo* de Skov3ip1 estimulado por la EPO.

En la figura 27 se muestra que la inhibición selectiva con el siRNA de EphB4 bloquea completamente el crecimiento *in vivo* del cáncer de ovario A2780 inducido por la EPO.

30 En la figura 28 se muestra un gel de electroforesis utilizado para determinar la expresión de EpoR (A) y EphB4 (B) por RT-PCR en clones transfectados estables obtenidos de las células A2780.

En la figura 29 se demuestra que EphB4 es el mediador preferido de la proliferación estimulada por la EPO en las células de cáncer de ovario A2780.

35 En la figura 30 se muestra que la fijación de la <sup>125</sup>I-EPO a las células de cáncer de ovario depende de la expresión de EpoR y de EphB4.

En la figura 31 se muestra la identificación de los mediadores activados con EPO a través de los receptores EphB4 y EpoR.

En la figura 32 se representa la evolución temporal de la activación de Stat3 inducida por la EPO en las células cancerosas, lo que incluye la cuantificación densitométrica de la activación de Stat3.

40 En la figura 33 se muestra la posible interacción entre EphB4 y Stat-3.

En la figura 34 se evalúa la interacción entre EphB4/src y EphB4/Jak-2.

En la figura 35 se da a conocer un análisis inmunohistoquímico de la expresión de EpoR (fila superior) y EphB4 (fila inferior) en los tumores de cáncer de ovario, que muestra ejemplos de niveles altos de expresión (HSCORE > 100) frente a niveles bajos de expresión (HSCORE  $\leq$  100).

45 En la figura 36 se da a conocer un análisis inmunohistoquímico de la expresión de EpoR (fila superior) y EphB4 (fila inferior) en los tumores de cáncer de mama, que muestra ejemplos de niveles altos de expresión (HSCORE > 100) frente a niveles bajos de expresión (HSCORE  $\leq$  100).

50 En la figura 37 se representa gráficamente el análisis inmunohistoquímico de EphB4 en las pacientes con tumores de cáncer de ovario. En la figura, una línea verde (a saber, EPOTX\_DX = 1) señala a las pacientes que recibieron el tratamiento con la EPO, mientras que una línea azul (a saber, EPOTX\_DX = 0) indica a las pacientes que no lo

recibieron. En el eje X se representa el seguimiento de las pacientes en años, mientras que en el eje Y se representa la supervivencia acumulada (número de pacientes vivas dividido por el tamaño original de la cohorte: p. ej., 0,5 = 50% vivas).

5 En la figura 38 se representa gráficamente el análisis inmunohistoquímico de EphB4 en las pacientes con tumores de cáncer de ovario. En la figura, una línea verde (a saber, EPOTX\_DX = 1) señala a las pacientes que recibieron el tratamiento con la EPO, mientras que una línea azul (a saber, EPOTX\_DX = 0) indica a las pacientes que no lo recibieron. En el eje X se representa el seguimiento de las pacientes en años, mientras que en el eje Y se representa la supervivencia acumulada (número de pacientes vivas dividido por el tamaño original de la cohorte: p. ej., 0,5 = 50% vivas).

10 En la figura 39 se representa gráficamente el análisis inmunohistoquímico de EphB4 en las pacientes con tumores de cáncer de ovario. Los datos se presentan como la supervivencia específica de la enfermedad por EphB4 bajo/alto.

En la figura 40 se representa gráficamente el análisis inmunohistoquímico de EpoR en las pacientes con tumores de cáncer de ovario. Los datos se presentan como la supervivencia específica de la enfermedad por EpoR alto/bajo.

15 En la figura 41 se representa gráficamente el análisis inmunohistoquímico de EphB4 y EpoR en las pacientes con tumores con cáncer de ovarios. Los datos se presentan como la supervivencia específica de la enfermedad por EphB4 y EpoR bajo/alto.

En la figura 42 se representa gráficamente el análisis inmunohistoquímico de las pacientes con tumores de cáncer de ovario. Los datos se presentan como la supervivencia específica de la enfermedad por tratamiento con EPO en todas las pacientes.

20 En la figura 43 se representa gráficamente el análisis inmunohistoquímico de las pacientes con tumores de cáncer de ovario. Los datos se presentan como la supervivencia específica de la enfermedad por tratamiento con EPO solo en las pacientes con EphB4 alto.

25 En la figura 44 se representa gráficamente el análisis inmunohistoquímico de las pacientes con tumores de cáncer de ovario. Los datos se presentan como la supervivencia específica de la enfermedad por tratamiento con EPO solo en las pacientes con EpoR alto.

### Descripción detallada

30 La presente descripción surge a raíz de la identificación de un nuevo receptor de EPO, de aquí en adelante denominado NEPOR. El NEPOR se identificó con un flujo de trabajo de bioinformática que abarca un análisis funcional y un análisis basado en secuencias del genoma/proteoma humano. El análisis de homología que implica una base de datos de proteínas extracelulares (denominada XtraCellIDB) se utilizó junto con la minería de texto y el análisis del contexto del genoma. Estas predicciones *in silico* se verificaron posteriormente en experimentos de laboratorio. Así pues, la presente descripción da a conocer pruebas genómicas, proteómicas y experimentales de que la proteína EPH-B4 (proteína B4 del hepatoma productor de eritropoyetina) y/o la efrina A1 actúan como receptores de la EPO.

35 EPO: función biológica

40 La eritropoyetina (EPO) es una citocina de tipo I de 193 aminoácidos que producen las células de la corteza renal para regular la producción de los glóbulos rojos (GR) en un proceso denominado eritropoyesis. La eritropoyesis tiene varias etapas por naturaleza, lo que implica la diferenciación de células madre hematopoyéticas pluripotentes a través de las células progenitoras de unidades formadoras de brotes de eritrocitos (BFU-E, por su nombre en inglés) y de unidades formadoras de colonias de eritrocitos (CFU-E, por su nombre en inglés), que dan lugar a una serie de eritroblastos tempranos y tardíos, lo que finalmente conduce a la formación de reticulocitos y eritrocitos maduros. Durante este procedimiento, la formación secuencial de proeritroblastos, eritroblastos basófilos, policromatófilos y ortocromáticos, está regulada positivamente por la EPO. La EPO induce numerosos efectos positivos en los primeros eritroblastos, lo que incluye un incremento de la proliferación, progresión a través de la maduración y

45 protección contra la muerte celular programada.

50 En términos del mecanismo molecular, la EPO se fija a dos receptores idénticos (EpoR), un suceso que activa varias vías de señalización intracelular. Estas incluyen cinasa Jano 2-transductor de señal y activador de la transcripción 5 (JAK2-STAT5), fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), proteína cinasa C (PKC) y Ras-Raf-MEK (cinasa de la proteína cinasa regulada por señal extracelular o activada por mitógenos)-ERK (proteína cinasa regulada por señal extracelular). Se piensa que las vías JAK2-STAT5 y RAS-RAF-MEK-ERK están asociadas a la acción mitógena de la EPO, mientras que la vía de la PI3K, que actúa a través de Akt (PI3K-Akt), se ve como un mediador de las actividades antiapoptóticas de la EPO.

EPO: uso clínico

La anemia (AmE) o anemia/anemia (BrE) del griego (ἀναιμία: an-haîma) que significa «carencia de sangre», es una

deficiencia de glóbulos rojos (GR) y/o hemoglobina. La afección se observa con frecuencia en los pacientes con enfermedades crónicas y es particularmente habitual en el cáncer, donde aproximadamente en el 50% de los pacientes se presenta con anemia y cerca del 70 al 90% desarrollan la afección durante el transcurso del tratamiento (típicamente denominada anemia inducida por la quimioterapia (AIQ)). En una revisión reciente del ECAS (estudio europeo sobre la anemia por cáncer), Ludwig et al. citaron una tasa de anemia basal del 50% (hemoglobina [Hb] < 12 g/dl) entre los 3.010 pacientes con neoplasias hemáticas y una tasa de anemia basal del 41% entre los 11.453 pacientes con tumores sólidos (*Blood*, 2002; 100: 234a-235a. Resumen 884). Otro análisis longitudinal reveló que el 72% de los 2.780 pacientes con neoplasias hemáticas y el 66% de los 10.067 pacientes con tumores sólidos sucumbieron a la AIQ. Otros estudios publicados han notificado diferentes tasas elevadas en los pacientes en las diferentes fases con diferentes tipos de tratamiento (tabla 1). No obstante, todos los estudios demuestran la prevalencia extremadamente alta de anemia entre los pacientes con cáncer.

Tabla 1. Prevalencia de la anemia en los pacientes con cáncer que están siendo tratados

Tipo de cáncer	Prevalencia de la anemia (Hb < 12 g/dl)
Cáncer de cuello uterino <sup>[3]</sup>	82%
Tumores sólidos <sup>[1]</sup>	66%
Cáncer colorrectal <sup>[3]</sup>	67%
Cáncer de pulmón <sup>[3]</sup>	63%
Neoplasias hemáticas	72%

Una serie de factores contribuyen a la elevada incidencia de la anemia entre los pacientes con cáncer, entre ellos no sólo la quimioterapia y la mielodepresión inducida por la radiación, sino también la anemia de enfermedad crónica mediada por citocinas, hemorragia, infiltración de la médula ósea por el tumor, hemólisis y deficiencias nutricionales. Sea cual sea el origen, la anemia da lugar a una reducción de la capacidad de la sangre para transferir oxígeno a los tejidos, lo que conduce a la hipoxia del tejido y a la asociación de un abanico de consecuencias clínicas, que afectan a todos los aspectos de la salud del paciente: estado fisiológico, bienestar psicosocial y calidad de vida. No es sorprendente que la anemia pueda afectar de forma negativa a la respuesta del paciente al tratamiento contra el cáncer, un hecho que destaca la importante función de soporte que tiene la rHuEPO para restaurar el recuento normal de GR.

EPO: seguridad clínica

Los EE se consideraron durante muchos años extremadamente seguros en sus indicaciones declaradas de nefropatía crónica y anemia inducida por la quimioterapia. Los primeros indicios de problemas de seguridad se produjeron en 2003, cuando los resultados de un par de estudios que examinaban la potenciación que la EPO provocaba sobre la radiación y sobre la quimioterapia dieron lugar a una reunión de la FDA en mayo de 2004. El primer estudio (el estudio ENHANCE: *Lancet* 2003; 362: 1255-1260) sugería que el riesgo relativo de la supervivencia libre de progresión era peor para los pacientes que recibían radioterapia más la epoyetina  $\beta$  NeoRecormon, de Roche, que para los pacientes que recibían placebo más radioterapia. Se llevó a cabo un ensayo aleatorizado, con doble anonimato y multicéntrico que incluía una población de estudio de 351 pacientes que recibieron radioterapia. Los pacientes se trataron 3 veces por semana con placebo o bien con EPO en forma de epoyetina  $\beta$ , comenzando de 10 a 14 días antes y a lo largo de todo el tratamiento de radiación. Aunque la cantidad de hemoglobina se incrementó en el 82% de los pacientes que recibieron la EPO, en comparación con el 15% en los pacientes que reciben el placebo, la tasa de supervivencia libre de progresión locorregional fue significativamente más baja. Además, el grupo con la EPO tenía un riesgo relativo más alto de progresión locorregional y de muerte.

En el segundo ensayo en el que participaron 939 pacientes con cáncer de mama que recibieron quimioterapia (el estudio BEST: *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 5960-5972; véase la tabla 2), las que recibieron la epoyetina  $\alpha$  Eprex de Johnson & Johnson tenía una tasa de mortalidad a los 4 meses más alta y una tasa de supervivencia a los 12 meses más baja que las que recibieron el placebo. Ambos estudios intentaron traspasar los límites de la concentración de hemoglobina más allá de lo permitido para su comercialización por la FDA: el objetivo recomendado de hemoglobina para Aranesp llegaba por entonces hasta 12 g/dl, mientras que lo declarado para Epogen y Procrit recomendaba de 10 a 12 g/dl. Henke trató a los hombres a una concentración deseada de al menos 15 g/dl, mientras que las mujeres se trataron hasta al menos 14 g/dl. El nivel deseado en el estudio BEST fue de 12 a 14 g/dl.

Tabla 2: Resumen de los resultados de Leyland-Jones et al. (*J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 5960-5972) que muestra que

el 8,7% de los pacientes del grupo de tratamiento con EPO murió al cabo de 4 meses del tratamiento, en comparación con el 3,4% en el grupo sin tratar. IDT = Intención de tratar.

Tabla 2: Causas de muerte entre los pacientes que murieron antes de 4 meses desde la asignación aleatoria (población con IDT, N = 939).

Resultado	Epoetinina $\alpha$ (n = 469)		Placebo (n = 470)	
	N.º de pacientes	%	N.º de pacientes	%
Vivos a los 4 meses	428	91,3	454	96,6
Muertos a los 4 meses	41	8,7	16	3,4

5 Johnson & Johnson (JNJ, New Brunswick, N. J.) han notificado desde entonces datos del ensayo CHOIR de fase IV (N. Engl. J. Med., 16 de noviembre de 2006; 355 (20): 2085-98) que comprobaban si el uso de la epoetinina  $\alpha$  Procrit para conseguir una concentración de hemoglobina de 13,5 g/dl mejoraría los resultados frente al tratamiento a 11,3 g/dl (dentro del margen de 10 a 12 g/dl de lo declarado para el fármaco). En los pacientes en el grupo con hemoglobina más alta se incrementó significativamente la incidencia de la mortalidad y los episodios cardiovasculares. Mientras que este estudio se llevó a cabo en el contexto de la enfermedad renal, las implicaciones de seguridad se resaltaron adicionalmente en un estudio más reciente: DAHANCA10. En febrero de 2007, Amgen describió que este estudio independiente se había detenido tres meses antes, después de que los datos provisionales demostraran que Aranesp más radiación no alcanzaran el criterio de valoración primario de control locorregional a los 3 años frente a la radiación sola. El estudio también mostró un incremento no significativo de muertes en el grupo con Aranesp. El estudio DAHANCA10 exploró si el uso de Aranesp para mantener una concentración de hemoglobina de 14 a 15,5 g/dl durante la radioterapia podría mejorar el control de la enfermedad locorregional en los pacientes con un carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello (CCECC).

Las señales de seguridad también emergieron del uso del Aranesp en el contexto AoC (estudio 103). En enero de 2007, Amgen describió que el perfil de riesgo/beneficio de Aranesp era «como mucho, neutro» en un ensayo de fase III con pacientes que tenían AoC que no recibían quimio- ni radioterapia. Aquí, los datos revelaron, significativamente, más muertes en los pacientes con Aranesp que en los pacientes con placebo. El ensayo, que trató a los pacientes a una concentración de hemoglobina de 12 a 13 g/dl, tampoco alcanzó su criterio de valoración primario de reducción significativa de la frecuencia de las transfusiones a las 16 semanas. En el estudio 103 participaron pacientes con diferentes cánceres, entre ellos el cáncer de pulmón no microcítico (CPNMC), el cáncer de mama y el cáncer de próstata. Unos investigadores canadienses han publicado hallazgos similares (J. Clin. Oncol. 20 de marzo de 2007, 25 (9): 1027-32). Aquí, los autores demostraron que de los 70 pacientes con CPNMC avanzado con AoC, los que recibían Procrit tenían una tasa de mortalidad significativamente más alta que los que recibían el placebo. En la tabla 3 que viene a continuación se da a conocer un resumen de cada uno de estos estudios:

30 Tabla 3: Resumen de los resultados de los estudios de seguridad de la EPO que destacan los problemas de supervivencia

ESTUDIO	Tipo de EPO	POBLACIÓN	DISEÑO	ESTADO
DAHANCA (SE20029001)	Aranesp	CCECC; Hb basal $\leq$ 14,5	Ensayo multicéntrico abierto radioterapia Aranesp	Lo detuvo prematuramente por el CVD y (después de que participaran 522 de los 600 de pacientes previstos) basándose en la tasa de $\pm$ LRC más baja y el incremento de las muertes en el grupo de EE en el análisis interno previsto; 522 de los 600 pacientes previstos; resumen de resultados del 12/06; CSR anticipado 9/08
EPO-CAN-20	Eprex/Procrit	CPNMC que no recibe quimio;	Doble anonimato, controlado con placebo, aleatorizado (1:1)	Lo detuvo prematuramente el CVDS por el incremento de las muertes en el grupo de EE; participaron 70 pacientes de los 300 previstos; resultados publicados en el resumen de 2004 y

ESTUDIO	Tipo de EPO	POBLACIÓN	DISEÑO	ESTADO
		basal $\leq$ 12	$\pm$ Eprex	en la revista de oncología clínica 3/07
BEST (EPO-INT-76)	<i>Eprex/Procrit</i>	Cáncer de mama metastásico	de Aleatorizado, con doble anonimato, controlado con placebo	Se detuvo en abril de 2002, después de que el SVD revisara los datos en los primeros 938 pacientes, debido a un evidente exceso de muertes en el grupo de Eprex.
RTOG 9903	<i>Eprex/Procrit</i>	CCECC; Hb basal de 9 a 12,5 (mujeres), de 9 a 13,5 (hombres)	Abierto, aleatorizado, (1:1), quimio/radiación $\pm$ Procrit	Lo detuvo prematuramente el CVDS por su tendencia a empeorar LRC y OS en el grupo con EPO. Participaron 148 de los 372 pacientes previstos. Resultados publicados en el resumen de 2004
Estudio 103 (Amgen)	<i>Aranesp</i>	CPNMC, cáncer de próstata, cáncer de mama	de de	

Estos hallazgos clínicos han conducido a que muchos investigadores sugieran una posible función para los EE relacionada con la promoción del crecimiento tumoral a través de la estimulación de la señalización de supervivencia del receptor de la EPO en las células tumorales, y a través de la estimulación de la angiogénesis. Está implícito en estas actividades propuestas la noción de que el receptor de la EPO puede conferir de algún modo una ventaja de supervivencia a las células neoplásicas, un efecto secundario negativo. Esto, a su vez, sugiere que el receptor de la EPO está presente y se activa por la fijación de la EPO en tales células. Mediante el uso de la RT-PCR cuantitativa en tiempo real, no sólo se ha demostrado que el gen del EPOR se expresa fuertemente en la médula ósea (que contiene los progenitores eritroides que responden a la EPO), sino también a niveles significativos en los tejidos normales (p. ej., riñón, corazón, cerebro, endotelio y músculo liso). Además, el nivel de los transcritos del EPOR en los tejidos de tumor de mama, colon, ovario, próstata, pulmón, linfoma, íleon, estómago y riñón, y en las líneas de células tumorales, no era más alto que el nivel observado en la contraparte de tejido normal. Estos hallazgos concuerdan con otros informes que demuestran que el nivel de los transcritos de EPOR es básicamente equivalente en las muestras emparejadas de tumor y no tumoral de pacientes con cáncer de pulmón, de colon y de próstata. Desde el punto de vista de estos datos, se cuestiona si el gen de EPOR podría proporcionar, de algún modo, una ventaja selectiva a las células tumorales, al menos por medio de niveles de expresión anormales.

Por lo tanto, hay una posible función para el EPOR en la mediación de la supervivencia de las células tumorales en respuesta a la EPO. Desde una perspectiva molecular, no sería sorprendente que las células cancerosas tuvieran la capacidad de subvertir el sistema EPO/EPOR. Una serie de estudios preclínicos han demostrado que la EPO activa la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI<sub>3</sub>K)-Akt, JAK-STAT (cinasa Jano-transductor de señal y activador de la transcripción), y las vías de señalización del factor nuclear kB (NFkB) en una serie de cánceres humanos. Cada una de estas cascadas de señalización se ha relacionado con las funciones celulares que promueven la progresión tumoral. La EPO estimuló no solo la quimiotaxia de las células endoteliales, junto con la migración y la invasión de las células del cáncer de mama y las células del CCECC, sino que también induce la proliferación de las células cancerosas e inhibe la apoptosis. Además, el tratamiento previo con rHuEPO protege algunas líneas de células neoplásicas de los efectos citotóxicos del quimioterápico cisplatino. Así pues, la señalización de EPO/EPOR contribuye a una amplia gama de funciones que promueven el tumor en diferentes tipos de cáncer.

A pesar de estas pruebas, la posible contribución de la señalización de EPO/EPOR para la progresión del cáncer es cualquier cosa menos sencilla. La influencia de EPO/EPOR en diferentes tipos de cáncer aparece bastante variable y seguimos sin conocerla del todo. Los estudios han demostrado que la EPO no influye en la proliferación de las líneas de células cancerosas. Rosti et al. (*Haematologica*, julio-agosto de 1993; 78 (4): 208-12), por ejemplo, investigaron el potencial proliferativo de rHuEPO mediante el análisis de los efectos de este factor sobre el crecimiento clonogénico y la síntesis del ADN en 10 líneas celulares diferentes procedentes de neoplasias malignas hemáticas y tumores sólidos. En este estudio se incluyeron las líneas celulares K-562 y HEL, las cuales expresan los receptores de la EPO. Los resultados demostraron que rHuEPO no tenía ningún efecto sobre el crecimiento de colonias ni sobre la síntesis del ADN (véase la tabla 4).

Tabla 4. Se muestra la ausencia de efecto de la rHuEPO sobre el porcentaje de células en la fase S en las líneas celulares humanas

## EPO (UI/ml)

## Línea celular

<b>K-562</b>	37,0 ± 2,0	37,1 ± 2,1	36,8 ± 1,7
<b>HEL</b>	27,3 ± 1,9	26,2 ± 1,3	25,8 ± 1,4
<b>HL-60</b>	26,4 ± 1,8	24,8 ± 2,1	25,6 ± 2,0
<b>PLB 985</b>	30,0 ± 1,7	27,8 ± 2,3	28,2 ± 2,5
<b>KG-1</b>	14,2 ± 1,3	14,0 ± 1,7	15,5 ± 1,8
<b>H69</b>	15,3 ± 1,5	15,8 ± 1,3	14,9 ± 1,6
<b>N417</b>	16,6 ± 1,8	17,0 ± 1,4	16,3 ± 2,2
<b>MCF-7</b>	20,0 ± 0,9	21,1 ± 1,2	19,7 ± 1,0
<b>OCUM-1</b>	16,1 ± 2,1	17,3 ± 2,4	15,3 ± 2,3
<b>GBL-HU12</b>	19,2 ± 1,5	20,9 ± 1,6	19,1 ± 2,0

En un estudio similar, Westphal et al. (*Tumori*, marzo-abril de 2002; 88 (2): 150-9) estudiaron los efectos de la EPO en más de 25 líneas celulares humanas benignas y malignas diferentes. La expresión del ARNm y de la proteína del receptor de la EPO se analizó por RT-PCR, transferencia de tipo Western e inmunohistoquímica. La respuesta celular a distintas concentraciones de la EPO se evaluó por la captación de timidina tritiada, el análisis de transferencia de tipo Northern de la expresión de *c-fos*, y el ensayo de la actividad tirosina cinasa. El ARNm y la proteína del receptor de la EPO se identificaron en la mayoría de las líneas de las células tumorales evaluadas. A pesar de estos hallazgos, el tratamiento con la rHuEPO no influyó de manera significativa en la tasa de proliferación de las líneas celulares de tumores que dan positivo para el receptor de la EPO. Además, el tratamiento con la EPO no afectó al ARNm del gen *c-fos* de las líneas celulares ni estimuló la activación de la tirosina cinasa. Basándose en estos hallazgos, los autores concluyeron que la expresión del receptor de la EPO en las células tumorales es esencial para el crecimiento y, por lo tanto, no debe tener un efecto perjudicial en los pacientes con cáncer.

Los resultados de Lu et al. (*J. Biol. Chem.*, vol. 281, número 11, 7002-7011, 2006) establecen que la activación del receptor no se consigue solamente al colocar muy juntos los dos receptores mediante enlaces disulfuro en los dominios transmembranarios o extracelulares. En su lugar, la orientación relativa de los dos dominios transmembranarios de un dímero de EpoR, y no su proximidad, determina el grado de la activación del receptor. Más en concreto, estos autores proponen que la fijación de la EPO al dímero de EpoR simétrico e inactivo ocasiona el reposicionamiento de los dos dominios de fibronectina III en una orientación relativa y asimétrica de 120°, lo que a su vez cambia la orientación de los dominios transmembranarios y de los dominios intracelulares, y yuxtapone las JAK2 añadidas para iniciar la cascada de fosforilación. Los mutantes de la EPO no se esperaba necesariamente que fueran capaces de iniciar la señalización de EPOR debido a su incapacidad para inducir la conformación relativa correcta de los dominios de fibronectina III. Resulta interesante que determinados aspectos de la función de la EPO se puedan desacoplar de la actividad de EPOR. Leist et al. (*Science* 305, 239-242) han demostrado que las actividades hematopoyéticas y protectoras de tejido de la EPO son diferentes y disjuntas, lo que demuestra, por ejemplo, que la EPO carbamoilada (CEpo) no estimula la eritropoyesis, mientras que sigue protegiendo de la lesión del tejido en una amplia gama de modelos *in vivo* e *in vitro*.

Se ha demostrado la eficacia de la EPO a la hora de tratar enfermedades del sistema nervioso en varios modelos experimentales de la lesión del cerebro y de la médula espinal. Como tal, la EPO se ha convertido en un candidato para la neuroprotección terapéutica. No obstante, el uso de la EPO como un neuroprotector plantea varios problemas de seguridad. Aunque la EPO recombinante parece ser potencialmente segura a las dosis neuroprotectoras probadas, se pueden producir acontecimientos adversos cardiovasculares o cerebrovasculares como resultado de su actividad estimulante de la médula ósea. Resulta interesantes que, tal y como se destacó más arriba, la función protectora de neuronas de la EPO aparezca separable desde el punto de vista molecular de la actividad hematopoyética, puesto que la EPO carbamoilada y determinados mutantes de la EPO son

neuroprotectores, pero no consiguen inducir la hematopoyesis. Tales mutantes no consiguen fijarse al EPOR (Leist et al. *Science* 305, 239-242).

Durante mucho tiempo se consideró que la EPO actuaba exclusivamente sobre las células hematopoyéticas, un hecho que condujo a su emergencia como tratamiento principal para la anemia inducida por la quimioterapia. Sin embargo, las pruebas aparecidas han demostrado que la EPO se expresa en una gran variedad de tejidos y tipos celulares, que incluyen las células cancerosas, las células del endotelio vascular y las neuronales. La expresión de la EPO se induce en respuesta a la hipoxia, un fenómeno mediado por el factor de transcripción HIF-1. La EPO se piensa prototípicamente que ejerce sus efectos biológicos a través de la fijación a su receptor en la superficie celular, el EPOR, lo que da lugar a la fosforilación de la tirosina del receptor y de otras proteínas intracelulares, entre ellas JAK2 y STAT5. La vía de JAK/STAT se utiliza tanto en las células hematopoyéticas como en las no hematopoyéticas (entre ellas las células del cerebro) después de la fijación de la EPO al receptor de la EPO. Los recientes hallazgos de la expresión del receptor de la EPO en las células de humano de cáncer de mama y de cáncer de riñón, así como en varias líneas de células tumorales, ha despertado importantes interrogantes en el contexto de la oncología sobre un posible efecto favorecedor del crecimiento tumoral que ejercería la rHuEPO sobre los tumores portadores del receptor de la EPO. Esta posibilidad se ha confirmado en varios ensayos clínicos. Resulta interesante que otros estudios hayan demostrado que determinados mutantes de la EPO que son citoprotectores, pero que han perdido la capacidad de inducir la hematopoyesis, funcionan con independencia del EPOR. Esto sugiere que podría existir otro receptor de la EPO sin que sea necesaria la confirmación estricta de fijación al EPOR.

La efrina y la biología del receptor de la efrina

Los receptores del carcinoma hepatocelular productor de eritropoyetina (Eph) forman la familia más grande de receptores con actividad tirosina cinasa. Los receptores Eph se dividen en dos grupos (el grupo Eph-A y el Eph-B) sobre la base de la similitud de las secuencias del dominio extracelular y las diferentes propiedades estructurales de los ligandos de la efrina (Comité de nomenclatura del Eph, 1997). Se han identificado cerca de 16 genes del receptor efrina (EphA1-10, EphB1-6) en el genoma de los vertebrados (Pasquale, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6 (2005), págs. 462 a 475), 14 de los cuales están presentes en los humanos (figura 1) y en otros mamíferos (EphA1-8, EphA10, EphB1-4, EphB6).

Los receptores Eph son proteínas transmembranarias que la atraviesan una sola vez, con dominios extracelulares e intracelulares muy conservados. Los primeros dominios consisten en el dominio de fijación al ligando en el extremo amino, una región de tipo EGF rica en cisteínas y dos repeticiones de fibronectina de tipo III (Yamaguchi y Pasquale, *Curr. Opin. Neurobiol.* 14 (2004), págs. 288 a 296). Del lado intracelular, la región yuxtamembranaria va seguida de un dominio tirosina cinasa, seguido por un motivo  $\alpha$  estéril (SAM, por su nombre en inglés) y un motivo de fijación de tipo II PSD-95/Disco grande/ZO-1 (PDZ) en el extremo carboxilo (Kullander y Klein, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3 (2002), págs. 475-486). El dominio tirosina cinasa de un receptor de cada clase (EphA10 y EphB6) carece de los restos que son esenciales para la actividad catalítica. Las variantes del receptor Eph se generan mediante el ajuste alternativo y sus estructuras difieren de la estructura de dominios prototípica. La arquitectura de los dominios de los receptores Eph y de las efrinas (subclases A y B) se muestran en la figura 2.

Los receptores Eph pueden heterodimerizarse así como homodimerizarse en orientación *cis* (Freywald et al., *J. Biol. Chem.* 277 (2002), págs. 3823-3828), lo que está mediado directamente por la región extracelular rica en cisteínas, las repeticiones de fibronectina de tipo III (Lackmann et al., *J. Biol. Chem.*, 273 (1998), págs. 20228-20237) y el motivo SAM (Stapleton et al., *Nat. Struct. Biol.* 6 (1999), págs. 44-49 y Thanos et al., *Science* 283 (1999), págs. 833-836), o indirectamente a través de las interacciones PDZ con las proteínas (Fanning y Anderson, *J. Clin. Invest.* 103 (1999), págs. 767-772). Las interacciones orientadas en *trans* se producen típicamente con determinadas moléculas de efrina sobre células enfrentadas. En común con sus receptores, las efrinas (llamadas así por proceder de la expresión en inglés *Eph family receptor interacting proteins* [proteínas que interaccionan con el receptor de la familia Eph] o *ephoros*) se dividen en dos subclases diferentes, A y B. Los ligandos efrina A son moléculas periféricas de la membrana ancladas con GPI. En cambio, los ligandos efrina B son moléculas transmembranarias cuyo pequeño dominio citoplasmático es capaz de participar en diferentes señalizaciones. En un principio, se describió que las moléculas de la efrina A y de la efrina B interaccionaban de manera selectiva con los receptores EphA y EphB, respectivamente. Sin embargo, podría darse una interferencia entre los miembros de la familia A y B. Por ejemplo, la efrina-A5 es capaz de fijarse a EphB2, mientras que EphA4 se fija a los miembros de la familia de la efrina-A y de la efrina-B. Aunque las interacciones entre clases son escasas, dentro de una clase son promiscuas, pues muchos receptores EphA se fijan a una efrina A determinada y viceversa.

Aunque ninguna clase de efrina posee una actividad catalítica, ambas pueden activar las vías de transducción de señales después de la interacción con los receptores Eph (señalización inversa). La señalización inversa activada por las efrinas transmembranarias incluye la fosforilación de tirosina de su cola citoplasmática, y la interacción con diferentes moléculas de señalización. Sigue sin estar claro el mecanismo mediante el cual las efrinas conectadas con GPI estimulan la señalización vía abajo.

Algunas veces, la señalización implica la formación de ensamblajes de señalización, un proceso que comienza con una interacción monovalente (afinidad nanomolar) entre un receptor Eph y una efrina sobre una célula yuxtapuesta.

El trabajo cristalográfico ha demostrado que el dominio globular de fijación a la efrina de EphB2 contiene una cavidad que alberga una protuberancia hidrófoba desde las efrinas. Los cambios estructurales se producen tras la fijación. Por ejemplo, el EphB2 sufre diferentes reorganizaciones estructurales tras la fijación a la efrina-B2 o a la efrina-A5.

5 También está presente una interfaz de fijación de afinidad más baja en el lado opuesto del dominio de fijación al ligando de EphB2 (Eph\_1b), con interfaces complementarias también presentes en el dominio de fijación de la efrina-B2 al receptor Eph. Aunque solo tiene una afinidad de fijación de orden micromolar, la segunda interfaz puede intervenir en la dimerización de dos dímeros Eph-efrina en un tetrámero que comprende dos receptores y dos moléculas de efrina que se extienden desde la superficie de células adyacentes. La interfaz de afinidad más baja  
10 contiene importantes determinantes de especificidad de subclase y no está comprometido en el complejo EphB2—efrina-A5.

La señalización se inicia tras la transfosforilación a través de los dominios cinasa orientados correctamente. Los receptores Eph se fosforilan con profusión tras la activación por las efrinas y a través de la asociación src-cinasa. La fosforilación promueve el orden conformacional sobre el segmento de activación del dominio cinasa que favorece la fijación del sustrato y también deshace las interacciones intramoleculares inhibitoras que se producen entre el segmento yuxtamembranario y el dominio cinasa. La fosforilación mediada por la familia Src de los receptores Eph también se ha demostrado que actúa de una manera parecida.  
15

#### Discusión

Al trabajar sobre la teoría de que los efectos adversos de la EPO observados en muchos pacientes con cáncer podrían estar mediados por un complejo receptor diferente del receptor homodimérico prototípico de la EPO (EPOR), iniciamos un proyecto de descubrimiento *in silico* para tratar de identificar un nuevo receptor de la EPO. Al existir tal nueva especie de receptor de la EPO, elaboramos la hipótesis de que será responsable de mediar la actividad de supervivencia de las células inducidas por la EPO, en lugar de la actividad hematopoyética mediada por la EPO. Así pues, propusimos la existencia de al menos dos especies del receptor de la EPO; el homodímero de EPOR prototípico, que es principalmente responsable de la actividad hematopoyética de la EPO, y un nuevo receptor de la EPO, denominado NEPOR, que es principalmente responsable de las actividades citoprotectoras de la EPO. La existencia de tal receptor nuevo de la EPO es convincente por tres razones principales. Primero, permite la predicción de la respuesta de los pacientes con cáncer a la EPO. La presencia del NEPOR sobre una célula tumoral implicaría una respuesta negativa a la EPO, ya que la fijación de la EPO al NEPOR induciría una cascada de señales de supervivencia dentro de las células y tejidos tumorales, lo que contribuiría a la progresión del cáncer y a una peor supervivencia del paciente. Así pues, la detección de la expresión del NEPOR en un tumor da a conocer un nuevo biomarcador para clasificar a los pacientes con cáncer como idóneos (a saber, el NEPOR no está presente) o no idóneos (a saber, el NEPOR está presente) para el tratamiento con EPO. Un corolario de este modelo es un segundo punto de vista interesante. Si el NEPOR es capaz de iniciar las señales de supervivencia en las células neoplásicas, entonces representa una excelente diana terapéutica para el tratamiento de los cánceres que expresan este receptor. Así pues, las moléculas terapéuticas que actúan selectivamente sobre la función protectora de tejido de este receptor y antagonizan con él deben ser antineoplásicos eficaces. Finalmente, en las condiciones en las que la inducción de la supervivencia celular es favorable, tal como en respuesta al accidente cerebrovascular isquémico, las moléculas terapéuticas capaces de activar las señales de supervivencia mediadas por el NEPOR proporcionan una vía eficaz para tratar una serie de enfermedades neurológicas. Por lo tanto, la definición de la composición molecular del NEPOR da a conocer la base molecular para diseñar tales tratamientos.  
20  
25  
30  
35  
40

Previamente, se había propuesto que la rHuEPO puede promover el crecimiento tumoral a través de la estimulación de la señalización del receptor de la EPO (EPOR) en las células tumorales y a través de la estimulación de la angiogénesis. La fijación de la EPO a los homodímeros de EPOR se supuso que, en cierto modo, confería una ventaja de supervivencia a las células cancerosas, lo que conduce a un incremento de la progresión locorregional y a peores tasas de supervivencia en los pacientes que tienen una forma de cáncer. Sin embargo, conscientes de la promiscuidad de fijación de los fármacos administrados por vía exógena, estábamos ansiosos por abordar la posibilidad de que otro receptor pudiera ser el responsable de los resultados negativos observados, bien solo o bien en interacción funcional con el EPOR.  
45

En un esfuerzo por identificar tal receptor de EPO nuevo y citoprotector, desarrollamos un análisis *in silico* diseñado específicamente para escudriñar el proteoma humano en busca de moléculas candidatas. Al combinar el poder de la minería de textos y el análisis bioinformático en profundidad, esta estrategia basada en numerosas pruebas identificó con éxito un posible receptor de EPO nuevo. La posterior validación en el laboratorio apoya estos hallazgos. Una vez confirmada su función fisiológica, propusimos que, al afectar la actividad de estos receptores, la EPO puede conferir una ventaja de supervivencia a determinadas células, entre ellas las células cancerosas y las neuronas. Como consecuencia, la expresión de esta proteína sobre las células cancerosas se puede utilizar para clasificar la idoneidad de los pacientes con cáncer para el tratamiento con la EPO. Los pacientes que expresan el NEPOR asociado al cáncer deben estar contraindicados para el tratamiento con la EPO. Sin embargo, un corolario de este hallazgo es que estos mismos individuos constituyen unos candidatos excelentes para el tratamiento con terapias antagonistas anti-NEPOR. Además, también propusimos que al mediar en la actividad citoprotectora de la  
50  
55  
60

EPO, el NEPOR representa una diana terapéutica excelente para una serie de enfermedades en las que se produce una isquemia del tejido (p. ej., accidente cerebrovascular).

Así pues, en el primer caso, la presente descripción da a conocer un método para valorar un tumor por la expresión del NEPOR. La descripción da a conocer un método para clasificar los pacientes que tienen un tumor como idóneo (a saber, el NEPOR no está presente) o no idóneo (a saber, el NEPOR está presente) para el tratamiento con la EPO. El método descrito comprende: (a) aislar una muestra de tejido de un individuo que recibe o debe recibir eritropoyetina, (b) determinar el nivel de expresión del gen o genes del NEPOR (ARNm) y/o la presencia del producto del gen del NEPOR (proteína) en el tejido aislado, y (c) correlacionar la presencia de un producto de expresión del gen del NEPOR o la presencia de la proteína del NEPOR con una respuesta fisiológica al tratamiento con la eritropoyetina. En un segundo caso, la presente descripción da a conocer un método para el tratamiento de los pacientes que poseen tumores que dan positivo para el NEPOR. Además, la presente descripción da a conocer un método para tratar el accidente cerebrovascular. Finalmente, al proporcionar medios para comparar las afinidades de fijación de los posibles fármacos por el NEPOR y por el EPOR, la presente descripción da a conocer un método para cribar fármacos específicos del NEPOR (tanto fármacos antagonistas del cáncer como fármacos agonistas para el tratamiento de la enfermedad asociada a la hipoxia, tal como el accidente cerebrovascular). Tales fármacos carecerán de la actividad hematopoyética asociada a la fijación y señalización del EPOR.

#### NEPOR: Definición molecular

Hemos identificado un nuevo receptor multimérico de la EPO, que denominamos NEPOR. El NEPOR comprende moléculas de EPHB4 y/o efrina A1 como homodímeros, o bien como heterodímeros. Sin comprometerse con la teoría, estos componentes podrían también heterodimerizarse con el receptor de la EPO. En la figura 3 se da a conocer una sinopsis de las posibles composiciones moleculares del NEPOR. A pesar de que quede sitio para la promiscuidad molecular en la que intervengan otros componentes de la biología de la efrina, la EPH-B4 y/o la efrina A1 son componentes de un nuevo receptor de EPO (NEPOR). Como tal, el NEPOR está compuesto principalmente por EPH-B4 y efrina A1, bien como homodímeros y/o en asociación heterodimérica entre ellos, o con el receptor de la EPO. Sin comprometerse con la teoría, dada la firme asociación funcional entre la EPH-B4 y la efrina B2, el NEPOR también podría comprender la efrina B2 descrita en la presente memoria como SEQ ID n.º 4 (secuencia de aminoácidos), SEQ ID n.º 8 (secuencia del ARNm) y SEQ ID n.º 12 (región de fijación).

En la tabla 5 se muestra, sin comprometerse con la teoría, la posible composición molecular de los receptores diméricos de la EPO. El receptor de la EPO (EPOR) hematopoyético y prototípico representa un homodímero de dos monómeros de EPOR (SEQ ID n.º 1) (1). Nuestros resultados sugieren que un nuevo receptor de la EPO dimérico y protector de tejido está compuesto por la efrina A1 (SEQ ID n.º 3) y la EPH-B4 (SEQ ID n.º 2). Los posibles escenarios se muestran en la tabla 5.

Tabla 5:

	Descripción	Monómero 1	Monómero 2
1	EPOR	SEQ ID n.º 1	SEQ ID n.º 1
2	NEPOR	SEQ ID n.º 1	SEQ ID n.º 2
3	NEPOR	SEQ ID n.º 1	SEQ ID n.º 3
4	NEPOR	SEQ ID n.º 2	SEQ ID n.º 2
5	NEPOR	SEQ ID n.º 2	SEQ ID n.º 3
6	NEPOR	SEQ ID n.º 3	SEQ ID n.º 3
7	NEPOR	SEQ ID n.º 1	SEQ ID n.º 4
8	NEPOR	SEQ ID n.º 2	SEQ ID n.º 4
9	NEPOR	SEQ ID n.º 3	SEQ ID n.º 4
10	NEPOR	SEQ ID n.º 4	SEQ ID n.º 4

SEQ ID n.º 1

> EPOR

MDHLGASLWPQVGSLLCLLLAGAAWAPPNLPDPKFESKAALLAARGPEELLCTERLEDL  
VCFWEEAASAGVGPNGYSFSYQLEDEPWKLCRLHQAPTARGAVRFWCSLPTADTSSSFVPL  
ELRVTAASGAPRYHRVIHINEVVLLDAPVGLVARLADES GHVVLRLWLPPEPETPMTSHIRY  
EVDVSAGNGAGSVQRVEILEGRTECVLSNLRGRTRYTFAVRARMAEPSFGGFWSAWSEPV  
SLLTPSDLDPLILTLSLILVVILVLLTVLALLSHRRALKQKIWP GIPSPSESEFEGFLTTH  
KGNFQLWLQNDGCLWWS PCTPFTEDPPASLEVLSERCWGTMQAVEPGTDDEGP LLEPVG  
SEHAQDTYLVLDKWLPRNPPSEDLPGPGGSVDIVAMDEGSEASSCSALASKPSPEGAS  
AASFEYTIIDPSSQLLRPWTLCPELPPTPPHLKYLYLVVSDSGISTDYSSGDSQGAQGGL  
SDGPYSNPYENSLIPAAEPLPPSYVACS

SEQ ID n.º 2

5 > EPH-B4

MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWVTFPQVDGQWEELSGLDEEQHSVRTYEV  
CDVQRAPGQAHWLRTGWVPRRGAVHVYATLRFMTLECLSLPRAGRSCKETFTVFYYESDA  
DTATALTPAWMENPYIKVDTVAAEHLTRKRPGAATGKVNKTLRLGPLSKAGFYLAQD  
QGACMALLSLHLFYKCAQLTVNLTRFPETVPRELVVPVAGSCVVDVAVPAPGSPSLYCR  
EDGQWAEQPVGTGCSCAPGEAAEGNTKCRACAQGTFKPLSGEGSCQPCPANSHSNTIGSA  
VCQCRVGYFRARTDPRGAPCTTPPSAPRSVVSRLNGSSLHLEWSAPLES GGREDLTYALR  
CRECRPGGSCAPCGDLTFDPPGRDLVEPVVVVRLRPDFTYTFEVTALNGVSSLATGPV

PFEPVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSSLSLAWAVPRAPSGAVLDYEVKYHEKGAEGPS  
SVRFLKTSENRAELRGLKRGASYLVQVRARSEAGYGPFGQEHHSQTQLDESEGWREQLAL  
IAGTAVVGVVLLVVIIVAVLCLRKQSNGREAEYS DKHGQYLIGHGTKVYIDPFTYEDPN  
EAVREFAKEIDVSYVKIEEVIGAGEFGVCRGRLKAPGKKECVAIKTLKGGYTERQRRE  
FLSEASIMGQFEHPNIIRLEGVVVNSMPVMILTEFMENGALDSFLRLNDGQFTVIQLVGM  
LRGIASGMRYLAEMSYVHRDLAARNILVNSNLVCKVSDFGLSRFLEENSSDPTYTSSLGG  
KIPIRWTAPEAIAFRKFTSASDAWSYGIWMWEVMSFGERP YWMSNQDVINAIEQDYRLP  
PPPDCPTSLHQLMLDCWQKDRNARPRFPQVVSALDKMIRNPASLKI VARENGGASHPLLD  
QRQPHYSAFGSVGEWLRAIKMGRYEE SFAAAGFGSFELVVSQISAEDLLRIGVTLAGHQKK  
ILASVQHMKSQAKPGTGGTGGPAPQY

SEQ ID n.º 3

> Efrina A1

MEFLWAPLLGLCCSLAAADRHTVFWNSSNPKFRNEDYTIHVQLNDYVDIICPHYEDHVA  
DAAMEQYILYLVEHEEYQLCQPQSKDQVRWQCNRP SAKHGPEKLSEKFQRTFPFTLGKEF  
KEGHSYYYISKPIHQHEDRCLRLKVTVSGKITHSPQAHNDPQEKRLAADDPEVRVLHSIG  
10 HSAAPRLFPLAWTVLLLPLLLLQTP

SEQ ID n.º 4

> Efrina B2

MAVRRDSVWKYCWGLMVLCRTAISKSI VLEPIYWNSSNSKFLPGQGLVLYPQIGDKLDI  
ICPKVDSKTVGQY EYYKVMVDKQADRCTIKKENTPLL NCAKPDQDIKFTIKFQEFSPN  
LWGLEFQKNKDYYIIISTNGSLEGLDNQEGGVCQTRAMKILMKVGDASSAGSTRNKDPT  
RRPELEAGTNGRSSTTSFVKPNPGSSTDGNSAGHSGNNILGSEVALFAGIASGCIIFIV  
IIITLVVLLLKYRRRHRKHSPQHTTTLSTLSTLATPKRSGNNGSEPSDII IPLRTADSVF  
CPHYEKVSGDYGHPVYIVQEMPPQSPANIYYKV

15 La presente descripción incluye cualquier variante de ajuste de los polipéptidos de los componentes de las SEQ ID n.ºs 1 a 4 que poseen la región extracelular de fijación a EPO (para EPH-B4, esta región se propone que abarca los dos dominios de fibronectina III; las estructuras elípticas adyacentes a EPO en la figura 3B, D y F) y la parte de señalización intracelular, también es capaz de mediar en el efecto citoprotector de la EPO (y de los derivados de la misma).

NEPOR: Implicaciones pronósticas

20 La citocina de tipo 1, la eritropoyetina (EPO), posee actividad hematopoyética y protectora de tejido. La presente

descripción da a conocer que la última funcionalidad está mediada por interacciones de la EPO con un nuevo receptor de la EPO, denominado NEPOR. El modelo da a conocer que la fijación de la EPO a complejos receptores NEPOR, en las células cancerosas que dan positivo para el NEPOR, confiere ventaja de supervivencia a tales células. El resultado fisiológico implícito para los pacientes que poseen cánceres que dan positivo para el NEPOR incrementa, por lo tanto, la progresión locoregional del cáncer y la peor supervivencia global.

Así pues, la presente descripción da a conocer una prueba diagnóstica o pronóstica que puede predecir, o no, si los pacientes con cáncer a los que se les administra la EPO responderán negativamente en términos de resultado de supervivencia. La prueba pronóstica comprende la determinación del NEPOR (a saber, EPH-B4 y/o efrina A1) en el tejido tumoral o, más en concreto, en las células cancerosas. En otra realización, los niveles de expresión del gen del componente del NEPOR en las células tumorales se puede comparar con el nivel basal o el nivel en las células o el tejido normales circundantes. Por lo tanto, un análisis comparativo que busque niveles de expresión elevados o basales normales de la expresión del componente del NEPOR, mediante los métodos estándares de análisis de la expresión génica (tal como q-PCR y análisis de micromatrices de ADN) proporciona una prueba diagnóstica que puede determinar o no si la administración de la EPO a los pacientes con cáncer potenciará involuntariamente la supervivencia de las células tumorales (un resultado negativo).

Como se mencionó, un método que se puede utilizar para comparar los niveles de la expresión génica de los componentes del NEPOR y/o de la EPH-B4, y/o de la efrina A1, es la reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa (qPCR, por su nombre en inglés *Quantitative polymerase chain reaction*). Esta es una modificación de la PCR o reacción en cadena de la polimerasa utilizada para medir con rapidez la cantidad de ADN presente en una muestra de tejido. Al igual que otras formas de reacción en cadena de la polimerasa, el procedimiento se utiliza para amplificar las muestras de ácido nucleico, a través de la enzima ADN polimerasa, que está mediada por la temperatura. La PCR amplifica el ADN exponencialmente, duplicando el número de moléculas presentes con cada ciclo de amplificación. El número de ciclos de amplificación y la cantidad de producto final de la PCR debe permitir calcular la cantidad inicial de material genético específico del NEPOR y/o el material genético de EPH-B4 y/o efrina A1, en concreto moléculas de ARNm, mediante el uso de secuencias de componentes específicos del NEPOR en particular, y/o secuencias de EPH-B4 y/o efrina A1, para los dos cebadores utilizados para la amplificación.

Además, el análisis de la expresión de genes de los componentes del NEPOR y/o EPH-B4 y/o efrina A1 se puede hacer con un análisis de micromatrices que contienen numerosas sondas de captura específicas para las secuencias del complejo NEPOR, en particular, y/o EPH-B4, y/o efrina A1. Al proponerse que la EPO estimula la supervivencia de células cancerosas que dan positivo para el NEPOR y/o células que dan positivo para la EPH-B4 y/o la efrina A1, es importante comprobar en todos los pacientes con cáncer el estado del NEPOR y/o el estado de la EPH-B4, y/o de la efrina A1, antes y durante la administración de la EPO. Esto se realiza mejor con un análisis de micromatrices para el estado de expresión de los genes de los componentes del NEPOR en el tejido tumoral y con muestras de ARNm tomadas del tejido tumoral. La comprobación de los niveles de expresión del NEPOR asociados al tumor endógeno (a saber, EPH-B4 y/o efrina A1) da a conocer correlaciones en cuanto al pronóstico o la tasa de supervivencia del paciente.

Así pues, la presente descripción da a conocer un método para clasificar los pacientes que tienen un tumor como idóneos (a saber, el NEPOR no está presente, y/o están presentes EPH-B4 y/o efrina A1) o no idóneos (a saber, el NEPOR está presente, y/o están presentes EPH-B4 y/o efrina A1) para el tratamiento con la EPO. El método descrito comprende: (a) aislar una muestra de tejido de un individuo que recibe o debería recibir eritropoyetina, (b) determinar el nivel de expresión de EPH-B4 y/o efrina A1 en el tejido aislado, y (c) correlacionar la presencia de estos productos de expresión de genes de los componentes con una respuesta fisiológica negativa al tratamiento con eritropoyetina.

SEQ ID n.º 5

> receptor de la eritropoyetina (EPOR), ARNm

ACTTAGAGGCGCCTGGTCGGGAAGGGCCTGGTCAGCTGCGTCCGGCGGAGGCAGCTGCTGACCCAGCTGT  
GGACTGTGCCGGGGCGGGGACGGAGGGGCAGGAGCCCTGGGCTCCCCGTGGCGGGGCTGTATCATGG  
ACCACCTCGGGCGTCCCTCTGGCCCCAGGTCGGTCCCTTTGTCTCCTGCTCGCTGGGGCCCGCCTGGGC  
GCCCCGCCTAACCTCCCGGACCCCAAGTTCGAGAGCAAAGCGGCCTTGCTGGCGGCCCGGGGGCCCCGAA

GAGCTTCTGTGCTTCACCGAGCGGTTGGAGGACTTGGTGTGTTTCTGGGAGGAAGCGGGCAGCGCTGGGG  
 TGGGCCCCGGGCAACTACAGCTTCTCCTACCAGCTCGAGGATGAGCCATGGAAGCTGTGTGCGCTGCACCA  
 GGCTCCCACGGCTCGTGGTGGTGGTGGCTTCTGGTGTTCGCTGCCTACAGCCGACACGTCGAGCTTCGTG  
 CCCCTAGAGTTGCGCGTACACAGCAGCTCCGGCGCTCCGCGATATCACCGTGTATCCACATCAATGAAG  
 TAGTGCTCCTAGACGCCCCGTGGGGCTGGTGGCGCGGTTGGCTGACGAGAGCGGCCACGTAGTGTGCG  
 CTGGTCCCCGCCCTGAGACACCCATGACGTCTCACATCCGCTACGAGGTGGACGTCTCGGCCGGCAAC  
 GGCGCAGGGAGCGTACAGAGGTTGGAGATCTTGGAGGGCCGACCGAGTGTGTGCTGAGCAACCTGCGGG  
 GCCGACGCGCTACACCTTCGCCGTCCGCGCGTATGGCTGAGCCGAGCTTCGGCGGCTTCGGAGCGC  
 CTGGTCGGAGCCTGTGTGCTGCTGACGCCTAGCGACCTGGACCCCTCATCCTGACGCTCTCCCTCATC  
 CTCGTGGTTCATCCTGGTGTGCTGACCGTGTGCGCGTGTCTCCCACCGCCGGGCTCTGAAGCAGAAGA  
 TCTGGCCTGGCATCCCAGCCAGAGAGCGAGTTTGAAGGCTCTTACCACCCACAAGGGTAACTTCCA  
 GCTGTGGCTGTACCAGAATGATGGCTGCCTGTGGTGGAGCCCTGCACCCCTTACGGAGGACCCACCT  
 GCTTCCCTGGAAGTCTCTCAGAGCGCTGCTGGGGGACGATGCAGGCAGTGGAGCCGGGGACAGATGATG  
 AGGGCCCCCTGCTGGAGCCAGTGGGCAGTGGCATGCCAGGATACCTATCTGGTGTGGACAAATGGTT  
 GCTGCCCGGAACCCGCCAGTGAGGACCTCCAGGGCTGGTGGCAGTGTGGACATAGTGGCCATGGAT  
 GAAGGCTCAGAAGCATCCTCCTGCTCATCTGCTTGGCCCTGAAGCCAGCCAGAGGGAGCCTCTGCTG  
 CCAGCTTTGAGTACACTATCCTGGACCCAGCTCCAGCTCTTGGCTCCATGGACACTGTGCCCTGAGCT  
 GCCCCTACCCACCCACCTAAAGTACCTGTACCTTGTGGTATCTGACTCTGGCATCTCAACTGACTAC  
 AGCTCAGGGGACTCCCAGGGAGCCAAAGGGGGCTTATCCGATGGCCCTACTCCAACCCTTATGAGAACA  
 GCCTTATCCAGCCGCTGAGCCTCTGCCCCCAGCTATGTGGCTTGTCTTAGGACACCAGGCTGCAGAT  
 GATCAGGGATCCAATATGACTCAGAGAACCAGTGCAGACTCAAGACTTATGGAACAGGGATGGCCAGGCC  
 TCTCTCAGGAGCAGGGGCAATTGCTGATTTTGTCTGCCAATCCATCCTGCTCAGGAAACCACAACCTTGC  
 AGTATTTTTAAATATGTATAGTTTTTTT

SEQ ID n.º 6

> receptor EPH B4 (EPHB4), ARNm

TTCCAGCGCAGCTCAGCCCTGCCCGGCCCGGCCCGCCGGCTCCGCGCCGAGTCTCCCTCCCTCCCGC  
 TCCGTCCCCGCTCGGGTCCCACCATCCCCGCCCGGAGGAGCACTCGGCCCGGGCGCGAGCAGAG  
 CCACTCCAGGGAGGGGGGAGACCGGAGCGGCCGGCTCAGCCCCGCCACCCGGGGCGGGACCCCGAGG  
 CCCCAGGGAGCCCAACTCCAGCCACGTCTTGGTGCAGCGCCCGCCCGCGCGGGCCACTGCCAGCACGT  
 CCGGGCCCGCCCGCCGCGCGCGCGGCACAGACCGGGGCCACACTTGGCGCCGCCCGCCGGTGCCCCGCA  
 CGCTCGCATGGGCCCGCGCTGAGGGCCCCGACGAGGAGTCCCGCGCGGAGTATCGGGCTCCACCCGCCCA  
 GGGAGAGTCAGACCTGGGGGGCGAGGGCCCCCAACTCAGTTCGGATCCTACCCGAGTGGGGCGGCGC  
 CATGGCTCCGGGTGCTGCTCTGCTGGGCTTCGTTGGCCGAGCTTTGGAAGAGACCCCTGCTGAACACA  
 AAATTGGAAGTCTGATCTGAAGTGGGTGACATTCCTCAGGTGGACGGCAGTGGGAGGAACTGAGCG  
 GCCTGGATGAGGAACAGCACAGCGTGCACACCTACGAAGTGTGTGACGTGCAGCGTGCCCCGGGCCAGGC  
 CCACTGGCTTCGCACAGGTTGGTCCCACGGCGGGGCGCCGTCCACGTGTACGCCACGCTGCGCTTACC  
 ATGCTCGAGTGCCTGTCCCTGCTCGGGCTGGGCGCTCCTGCAAGGAGACCTTACCCTTCTACTATG  
 AGAGCGATGCGGACACGGCCACGGCCCTCACGCCAGCCTGGATGGAGAACCCTACATCAAGGTGGACAC  
 GGTGGCCCGGGAGCATCTCACCCGGAAGCGCCCTGGGGCCGAGGCCACCGGGAAGGTGAATGTCAAGACG  
 CTGCGTCTGGGACCGCTCAGCAAGGCTGGCTTCTACCTGGCTTCCAGGACCAGGTTGCCCTGCATGGCCCC  
 TGCTATCCCTGACCTCTTACAAAAAGTGCAGCCAGCTGACTGTGAACCTGACTCGATTCOCGGAGAC  
 TGTGCTCGGGAGCTGGTTGTGCCCGTGGCCGGTAGCTGCGTGGTGGATGCCGTCCCCGCCCTTGGCCCC  
 AGCCCCAGCCTTACTGCCGTGAGGATGGCCAGTGGGCCGAACAGCCGGTACGGGCTGCAGCTGTGCTC  
 CGGGTTCGAGGCGAGTGGGGGAACACCAAGTCCGAGCCTGTGCCAGGGCACCTTCAAGCCCTGTG  
 AGGAGAAGGGTCCCTGCCAGCCATGCCAGCCAATAGCCACTCTAACACCATTGGATCAGCCGTCTGCCAG  
 TGCCCGCTCGGGTACTTCCGGGCACGCACAGACCCCGGGGTGCACCCTGCACCACCCCTCCTTCGGCTC  
 CGCGGAGCGTGGTTTCCCGCTGAACGGCTCCTCCTGCACCTGGAATGGAGTGCACCCCTGGAGTCTGG  
 TGGCCGAGAGGACCTCACCTACGCCCTCCGCTGCCGGAGTGGCGACCCGGAGGCTCCTGTGCGCCCTGC  
 GGGGAGACCTGACTTTTGACCCCGGCCCGCCGGACCTGGTGGAGCCTGGGTGGTGGTTCGAGGGCTAC  
 GTCCTGACTTACCTATACCTTTGAGGTCACTGCATTGAACGGGGTATCCTCCTTAGCCACGGGGCCGT  
 CCCATTTGAGCCTGTCAATGTCAACACTGACCGAGAGGTACCTCCTGCAGTGTCTGACATCCGGGTGACG  
 CGTCTCACCCAGCAGCTTGGCCTGGCCTGGGCTGTCCCCGGGCACCCAGTGGGGTGTGCTGGACT  
 ACGAGGTCAAATACCATGAGAAGGGCGCCGAGGGTCCAGCAGCGTGCAGGTTCTGAAGACGTGAGAAAA  
 CCGGGCAGAGCTGCGGGGGTGAAGCGGGGAGCCAGCTACCTGGTGCAGGTACGGGCGCGCTCTGAGGCC  
 GGCTACGGCCGTTCCGGCCAGGAACATCACAGCCAGACCCAACTGGATGAGAGCGAGGGCTGGCCGGAGC  
 AGCTGGCCCTGATTGGGGCACGGCAGTGTGGTGTGGTCTGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT  
 TCTCTGCTCAGGAAGCAGCAATGGGAGAGAAGCAGAATATTCGGACAAACACGGACAGTATCTCATC  
 GGACATGGTACTAAGGTCTACATCGACCCCTTACTTATGAAGACCCTAATGAGGCTGTGAGGGAAATTTG  
 CAAAAGAGATCGATGTCTCTACGTCAAGATTGAAGAGGTGATTGGTGCAGGTGAGTTTGGCGAGGTGTG  
 CCGGGGGCGGCTCAAGGCCCCAGGGAAGAAGGAGAGCTGTGTGGCAATCAAGACCCCTGAAGGGTGGCTAC  
 ACGGAGCGGCAGCGCGTGGTTCGAGCGAGGCTCCATCATGGGCCAGTTCGAGCACCCCAATATCA

TCCGCTGGAGGGCGTGGTCACCAACAGCATGCCCGTCATGATTCTCACAGAGTTCATGGAGAACGGCGC  
 CCTGGACTCCTTCTGCGGCTAAACGACGGACAGTTCACAGTCATCCAGCTCGTGGGCATGCTGCGGGGC  
 ATCGCCTCGGGCATGCGGTACCTTGCCGAGATGAGCTACGTCCACCGAGACCTGGCTGCTGCAACATCC  
 TAGTCAACAGCAACCTCGTCTGCAAAGTGTCTGACTTTGGCCTTTCCCGATTCTGGAGGAGAACTCTTC  
 CGATCCCACCTACACGAGCTCCCTGGGAGGAAAGATTCCCATCCGATGGACTGCCCCGGAGGCCATTGCC  
 TTCCGGAAGTTCACTTCCGCCAGTGATGCCTGGAGTTACGGGATTGTGATGTGGGAGGTGATGTCATTTG  
 GGGAGAGCCGCTACGGACATGAGCAATCAGGACGTGATCAATGCCATTGAACAGGACTACCCGGCTGCC  
 CCCGCCCCAGACTGTCCACCTCCCTCCACCAGCTCATGCTGGACTGTTGGCAGAAAGACCCGGAATGCC  
 CGGCCCGCTTCCCCAGGTGGTCAGCGCCCTGGACAAGATGATCCGGAACCCCGCCAGCCTCAAAATCG  
 TGGCCCGGGAGAAATGGCGGGGCTCACACCCTCTCTGGACCAGCGGCAGCCTCACTACTAGCTTTTGG  
 CTCTGTGGGCGAGTGGCTTCGGGCCATCAAATGGGAAGATACGAAGAAAGTTTCGACCGCTGGCTTT  
 GGCTCCTTCGAGCTGGTCAGCCAGATCTCTGCTGAGGACCTGCTCCGAATCGGAGTCACTCTGGCGGGAC  
 ACCAGAAGAAAATCTTGGCCAGTGTCCAGCACATGAAGTCCAGGCCAAGCCGGGAACCCCGGTGGGAC  
 AGGAGAGCCGCTACCGAGTACCTGACCTGCAGGAATCCCCACCCAGGGACACCGCTCCCCATTTTCC  
 GGGGAGAGTGGGACTCACAGAGGCCCCAGCCCTGTGCCCGCTGGATTGCACTTTGAGCCCGTGGGG  
 TGAGGAGTTGGCAATTTGGAGAGACAGGATTTGGGGTTCTGCCATAATAGGAGGGGAAAATCACCCCC  
 AGCCACCTCGGGAACTCCAGACCAAGGTGAGGGCGCCTTTCCCTCAGGACTGGGTGTGACCAGAGGAA  
 AAGGAAGTGCCAACATCTCCAGCCTCCCGAGGTGCCCCCTCACTTGATGGGTGCGTTCGCCGAGAC  
 CAAAGAGAGTGTGACTCCCTTGCAGCTCCAGAGTGGGGGGCTGTCCAGGGGGCAAGAAGGGGTGTCA  
 GGGCCAGTGACAAAATCTTGGGGTTGTAGTCCCAACTGCTGCTGTCAACCAAACTCAATCATT  
 TTTTCCCTTGTAATGCCCTCCCGAGCTGCTCCATATGAAGGTTTTTGTAGTTTTGTTTTGGT  
 CTTAATTTTTCTCCCGTTCCCTTTTTGTTCTTCTGTTTTGTTTTTCTACCGTCTTGTCAAACTTTGT  
 GTTGGAGGGAACCTGTTTCACTATGGCCCTTTGCCCAAGTTGAAAACAGGGGCCATCATCATGTCTGT  
 TTCCAGAACAGTGCCTTGGTCATCCACATCCCGGACCCCGCTGGGACCCCAAGCTGTGCTATGA  
 AGGGGTGTGGGTGAGGTAGTAAAAGGGCGGTAGTTGGTGGTGAACCCAGAAACGGACCCGGTGTCT  
 GGAGGGTTCTTAAATATATTTAAAAAGTAACTTTTTGTATAAATAAAAGAAAATGGGACGTGTCCCA  
 GCTCCAGGGGTAAAAA

SEQ ID n.º 7

> efrina A1 (EFNA1), ARNm

GCCAGATCTGTGAGCCAGCGCTGACTGCGCCGCGGAGAAAGCCAGTGGGAACCCAGACCCATAGGAGAC  
 CCGCGTCCCCGCTCGGCCTGGCCAGGCCCCGCGCTATGGAGTTCCTCTGGGCCCTCTCTTGGGTCTGTG  
 CTGCAGTCTGGCCGCTGCTGATCGCCACACCGTCTTCTGGAACAGTTCAAATCCCAAGTCCGGAATGAG  
 GACTACACCATACATGTGCAGCTGAATGACTACGTGGACATCATCTGTCCGCACTATGAAGATCACTCTG  
 TGGCAGACGCTGCCATGGAGCAGTACATACTGTACCTGGTGGAGCATGAGGAGTACCAGCTGTGCCAGCC  
 CCAGTCCAAGGACCAAGTCCGCTGGCAGTGAACCCGGCCAGTCCAAGCATGGCCCGGAGAAGCTGTCT  
 GAGAAGTCCAGCGCTTACACCTTTACCCCTGGGCAAGGAGTTCAAAGAAGGACACAGCTACTACTACA  
 TCTCAAACCCATCCACCAGCATGAAGACCGCTGCTTGGAGTTGAAGGTGACTGTGAGTGGCAAATCAC  
 TCACAGTCTCAGGCCATGACAATCCACAGGAGAAGAGACTTGCAGCAGATGACCCAGAGGTGCGGGTT  
 CTACATAGCATCGGTACAGTGTGCCCCACGCTCTTCCCACTTGCTGGACTGTGCTGCTCCTTCCAC  
 TTCTGCTGCTGCAAACCCCGTGAAGGTGTATGCCACACCTGGCCTTAAAGAGGGACAGCTGAAGAGAGG  
 GACAGGCACTCAAACCTGTCTTGGGGCCACTTTTCAGAGCCCCAGCCCTGGGAACCACTCCACCACAG  
 GCATAAGCTATCACCTAGCAGCTCAAAACGGGTGAGTATTAAGGTTTTCAACCGGAAGGAGGCCAACCA  
 GCCCAGAGTGCCATCCCCACCTCACCTCGGAGGGATGGAGAAAGAAGTGGAGACAGTCTTTCCACC  
 ATTCCTGCCTTAAAGCCAAAGAAACAAGCTGTGCAGGCATGTCCCTTAAAGGCACAGTGGGAGCTGAGCT  
 GGAAGGGGCCACGTGGATGGGCAAAGCTTGTCAAAGATGCCCCCTCCAGGAGAGAGCCAGGATGCCAGA  
 TGAAGTACTGAAGGAAAAGCAAGAAACAGTTTCTTGTGTTGGAAGCCAGGTACAGGAGAGGCAGCATGCT  
 TGGGCTGACCCAGCATCTCCAGCAAGACCTCATCTGTGGAGCTGCCACAGAGAAGTTGTAGCCAGGTA  
 CTGCATTCTCTCCATCCTGGGGCAGCACTCCCCAGAGCTGTGCCAGCAGGGGGGCTGTGCCAACCTGTT  
 CTTAGAGTGTAGCTGTAAGGGCAGTGCCCATGTGTACTTCTGCCTAGAGTGTAGCCTAAAGGGCAGGGC  
 CCACGTGTATAGTATCTGTATATAAGTTGCTGTGTCTGCTGCTGATTCTACAACCTGGAGTTTTTTTAT  
 ACAATGTTCTTGTCTCAAATAAAGCAATGTGTTTTTTCGACATGCTTTTCTGCCACTCCATATTA  
 ACATATGACCAATTGAGTCCCTGCTAAAAA

5 SEQ ID n.º 8

> efrina B2 (EFNB2), ARNm

GCGCGGAGCTGGGAGTGGCTTCGCCATGGCTGTGAGAAGGGACTCCGTGTGGAAGTACTGCTGGGGTGT  
TTGATGGTTTTATGCAGAACTGCGATTTCAAATCGATAGTTTTAGAGCCTATCTATTGGAATTCCTCGA  
ACTCAAATTTCTACCTGGACAAGGACTGGTACTATACCCACAGATAGGAGACAAATGGATATTATTTG  
CCCCAAAGTGGACTCTAAAAGTGTGGCCAGTATGAATATTATAAAGTTTATATGGTTGATAAAGACCAA  
GCAGACAGATGCACTATTAAGAAGGAAAATACCCCTCTCCTCAACTGTGCCAAACCAGACCAAGATATCA  
AATTCACCATCAAGTTTCAAGAATTCAGCCCTAACCTCTGGGGTCTAGAATTTAGAAAGAACAAAGATTA  
TTACATTATATCTACATCAAATGGGTCTTTGGAGGGCCTGGATAACCAGGAGGGGGTGTGCCAGACA

AGAGCCATGAAGATCCTCATGAAAGTTGGACAAGATGCAAGTTCTGCTGGATCAACCAGGAATAAAGATC  
CAACAAGACGTCCAGAACTAGAAGCTGGTACAAATGGAAGAAGTTCGACAACAAGTCCCTTTGTAAAACC  
AAATCCAGGTTCTAGCACAGACGGCAACAGCGCCGGACATTCGGGGAACAACATCCTCGGTTCCGAAGTG  
GCCTTATTTGCAGGGATTGCTTCAGGATGCATCATCTTCATCGTCATCATCATCACGCTGGTGGTCCCTCT  
TGCTGAAGTACCGGAGGAGACACAGGAAGCACTCGCCGACAGACACGACCAGCTGTGCTGCTCAGCACT  
GGCCACACCCAAGCGCAGCGGCAACAACAACGCTCAGAGCCAGTGACATTATCATCCCGCTAAGGACT  
GCGGACAGCGTCTTCTGCCCTCACTACGAGAAGTTCAGCGGGGACTACGGGCACCCGGTGTACATCGTCC  
AGGAGATGCCCCCGCAGAGCCCGGCAACATTTACTACAAGGTCTGAGAGGGACCCTGGTGGTACCTGTG  
CTTTCCAGAGGACACCTAATGTCCCGATGCCTCCCTTGAGGGTTTGAGAGCCCGCTGTGAGAAATTG  
ACTGAAGCACAGCACCGGGGAGAGGGGACTCCTCCTCGGAAGAGCCGCTCGCGCTGGACAGCTTACCT  
AGTCTTGTAGCATTCGGCCTTGGTGAACACACAGCTCCCTGGAAGCTGGAAGACTGTGCAGAAGACGCC  
CATTCCGACTGCTGTGCCGCTCCCACGCTCCTCCTCGAAGCCATGTGCTGCGGTCACTCAGGCCCTGTG  
CAGAAGCCAAGGGAAGACAGTGGTTTGTGGACGAGAGGGTGTGAGCATCCTGGCAGGTGCCCCAGGATG  
CCACGCCTGGAAGGGCCGGCTTCTGCTGGGTGAGTTTCCCCCGCAGTGCATACCGGACTTGTACACG  
GACCTCGGGCTAGTTAAGGTGTGCAAAGATCTCTAGAGTTTAGTCTTACTGTCTCACTCGTCTGTGTAC  
CCAGGGCTCTGCAGCACCTCACCTGAGACCTCCACTCCACATCTGCATCACTCATGGAACACTCATGTCT  
GGAGTCCCCTCCTCCAGCCGCTGGCAACAACAGTTCAGTCCATGGGTAATCCGTTTCATAGAAATTGTGT  
TTGCTAACAAGGTGCCCTTTAGCCAGATGCTAGGCTGTCTGCGAAGAAGGCTAGGAGTTTCATAGAGGGA  
GTGGGGCTGGGAAAGGGCTGGCTGCAATTGCAGCTCACTGCTGCTGCCCTGAAACAGAAAGTTGGAAA  
GGAAAAAGAAAAAGCAATTAGGTAGCACAGCACTTTGGTTTTGCTGAGATCGAAGAGGCCAGTAGGAG  
ACACGCAGCACACAGTGGATTCCAGTGCATGGGGAGGCACTCGCTGTTATCAAATAGCGATGTGCAG  
GAAGAAAAGCCCCCTTCATTCCGGGGAACAAAGACGGGTATTGTTGGGAAAGGAACAGGCTTGGAGGGA  
AGGGAGAAAGTAGGCCGCTGATGATATATTCGGGCAGGACTGTTGTGGTACTGGCAATAAGATACACAGC  
TCCGAGCTGTAGGAGAGTCCGCTGCTTTGGATGATTTTTTAAGCAGACTCAGCTGCTATACTTATCACA  
TTTTATTAACACAGGAAAGCATTAGGAGAAATAGCAGAGAGCCAAATCTGACCTAAAAGTTGAAAAGC  
CAAAGGTCAAACAGGCTGTAATTCATCATCATCGTTGTTATTAAGAATCCTTATCTATAAAAGGTAGG  
TCAGATCCCCCTCCCCCAGGTTCCCTCCTCCCCCTCCCGATTGAGCCTTACGACACTTTGGTTTTATGCGG  
TGCTGTCCGCTCCAGGCTGCAGGGTCCGTTACTGATGGAGGCTGCAGCGCCCGGTGCTCTGTGCAAG  
GTGAAGCACATACGGCAGACCTCTTAGAGTCCCTTAAGACGGAAGTAAATTTATGATGTCCAGGGGAGAAG  
GAAGATAGGACGTATTTATAATAGGTATATAGAACAAGGGATATAAAATGAAAGATTTTTACTAATAT  
ATATTTAAGGTTGCACACAGTACACACCAGAAGATGTGAAATTCATTTGTGGCAATTAAGTGGTCCCAA  
TGCTCAGCGCTTAAAAAACAAATTTGGACAGTACTTCTGGGAAAAACAACATCATTCCAAAAAGAACAA  
TAATGAGAGCAAATGCAAAAATAACCAAGTCCCTCCGAAGGCATCTCACGGAACCGTAGACTAGGAAGTAC  
GAGCCCCACAGAGCAGGAAGCCGATGTGACTGCATCATATATTTAACAATGACAAGATGTTCCGGCGTTT  
ATTTCTGCGTTGGTTTTCCCTTGCTTATGGGTGAAGTGTCTCTAGAATCCAGCAGGTCACTGAGGG  
GGCTTCAGGTGACGATTTAGCTGTGGCTCCCTCCTGCTCCTCCCGCACCCCTCCCTCTGGGAAA  
CAAGAAGAGTAAACAGGAAACCTACTTTTTATGTGCTATGCAAAATAGACATCTTTAACATAGTCTGTT  
ACTATGGTAACACTTTGCTTTCTGAATTGGAAGGGAAAAAAAATGTAGCGACAGCATTTTTAAGGTTCTCA  
GACCTCCAGTGAGTACCTGCAAAAATGAGTTGTCACAGAAATTATGATCCTCTATTTCCCTGAACCTGGAA  
ATGATGTTGGTCCAAAGTGCCTGTGTGTATGTGTGAGTGGGTGCGTGGTATACATGTGTACATATATGTA  
TAATATATATCTACAATATATATATATATATCTATATCATATTTCTGTGGAGGGTTGCCATGGTAACCA  
GCCACAGTACATATGTAATTTCTTCCATCACCCCAACCTCTCCTTCTGTGCATTCATGCAAGAGTTTCT  
TGTAAGCCATCAGAAGTACTTTTAGGATGGGGGAGAGGGGCGAGAAGGGGAAAAATGGGAAATAGTCTG  
ATTTTAATGAAATCAAATGTATGTATCATCAGTTGGCTACGTTTTGGTTCTATGCTAAACTGTGAAAAAT  
CAGATGAATTGATAAAAAGAGTTCCCTGCAACCAATTGAAAAGTGTCTGTGCGTCTGTTTTGTGCTGGT  
GCAGAATATGACAATCTACCAACTGTCCCTTTGTTTGAAGTTGGTTTAGCTTTGGAAAGTTACTGTAAT  
GCCTTGCTTGTATGATCGTCCCTGGTCACCCGACTTTGGAATTTGCACCATCATGTTTCAGTGAAGATGC  
TGTAATAGGTTTCAGATTTTACTGTCTATGGATTTGGGGTGTACAGTAGCCTTATTCACCTTTTTAATA  
AAAAATACACATGAAAACAAGAAAGAAATGGCTTTTCTTACCCAGATTGTGTACATAGAGCAATGTTGGTT  
TTTTATAAAGTCTAAGCAAGATGTTTTGTATAAAATCTGAATTTTGAATGTATTTAGCTACAGCTGTT  
TAACGGCAGTGTCTATCCCTTTGCACTGTAATGAGGAAAAAATGGTATAAAAGTTGCAAAATGCTGTC  
ATATTTGTGCCGTAATTTATGTACCATGAATATTTATTTAAAATTTGTTGTCCAATTTGTAAGTAAACACA  
GTATTATGCCTGAGTTATAAATATTTTTTTCTTTGTTTTATTTAATAGCCTGTCATAGGTTTTAA  
ATCTGCTTTAGTTTCACATTGCAGTTAGCCCCAGAAAATGAAATCCGTGAAGTACATTCCACATCTGTT  
TCAAACCTGAATTTGTCTTAAAAAATAAAATATTTTTTCTATGGAAAAAATAAAAAAAAAA

La detección de ARNm de componentes del NEPOR (SEQ ID n.º 5 a 8) se debe realizar preferiblemente con sondas complementarias a la subregión de las SEQ ID n.º 5 a 8, que codifican el dominio de fijación a la EPO y es en particular la SEQ ID n.º 6 y/o 7 que codifica EPH-B4 y efrina A1. Esto implica, para EPH-B4, sondas complementarias a la SEQ ID n.º 10; para la efrina A1, sondas complementarias a la SEQ ID n.º 11.

5 SEQ ID n.º 9

> región codificante de la fijación de epo en epor

```
AGCAAAGCGGCCTTGCTGGCGGCCCGGGGGCCCGAAGAGCTTCTGTGCTTCACCGAGCGGTTGGAGGACTTGGTGTG
TTTCTGGGAGGAAGCGGCAGCGCTGGGGTGGGCCCGGGCAACTACAGCTTCTCTACCAGCTCGAGGATGAGCCAT
GGAAGCTGTGTGCCTGCACCAGGCTCCACCGGCTCGTGGTGGCGGTGCGCTTCTGGTGTTCGCTGCCTACAGCCGAC
ACGTGAGCTTCGTGCCCTAGAGTTGCGCGTCACAGCAGCTCCGGCGCTCCGCGATATCACCGTGTATCCACAT
CAATGAAGTAGTCTCTAGACGCCCCGTGGGGTGGTGGCGCGGTTGGCTGACGAGAGCGGCCACGTAGTGTGTC
GCTGGCTCCCGCCGCTGAGACCCATGACGTCTCACATCCGCTACGAGGTGGACGTCTCGGCCGGCAACGGCGCA
GGGAGCGTACAGAGGTTGAGATCCTGGAGGGCCGACCGAGTGTGTGCTGAGCAACCTGCGGGCCGGACGCGCTA
CACCTTCGCCGTCGCGCGCTATGGCTGAGCCGAGCTTCGCGCGCTTCTGGAGCGCCTGGTGGAGCCTGTGTGCG
TGCTGACGCCTAGCGACCTGGACCCC
```

SEQ ID n.º 10

> región codificante de la fijación de epo en ephb4

```
CCTTCGGCTCCGCGGAGCGTGGTTTCCCGCCTGAACGGCTCCTCCTGCACCTGGAATGGAGTGCCCCCTGGAGTC
TGGTGGCCGAGAGGACCTCACCTACGCCCTCCGCTGCCGGGAGTGCCGACCCGGAGGCTCCTGTGCGCCCTGC
GGGGGAGACCTGACTTTTGACCCCGGCCCGGGACCTGGTGGAGCCCTGGGTGGTGGTTCGAGGGCTACGTCCTGA
CTTCACCTATACCTTTGAGGTCACCTGATTGAACGGGGTATCCTCCTTAGCCACGGGGCCCGTCCCATTTGAGCCTG
TCAATGTCACTGACCGAGAGGTACCTCCTGCAGTGTCTGACATCCGGGTGACGCGGTCTCACCCAGCAGCTTG
AGCCTGGCCTGGGCTGTTCCCGGGCACCCAGTGGGGCTGTGCTGGACTACGAGGTCAAATACCATGAGAAGGGCGC
CGAGGGTCCCAGCAGCGTGCGGTTCCCTGAAGACGTCAGAAAACCGGGCAGAGCTGCGGGGGCTGAAGCGGGGAGCCA
GCTACCTGGTGCAGGTACGGGCGCGCTCTGAGGCCGGTACGGGGCCCTTCGGCCAGGAACATCACAGCCAGACCCAA
10 CTGGATGAGAGCGAGGGCTGGCGGGAGCAGCTGGCCCTG
```

SEQ ID n.º 11

> región codificante de la fijación de epo en efrina a1

```
CTGGCCGCTGCTGATCGCCAACCGTCTTCTGGAACAGTTCAAATCCCAAGTTCGGGAATGAGGACTACACCATACA
TGTGCAGCTGAATGACTACGTGGACATCATCTGTCCGCACTATGAAGATCACTCTGTGGCAGACGCTGCCATGGAGC
AGTACATACTGTACCTGGTGGAGCATGAGGAGTACCAGCTGTGCCAGCCCCAGTCCAAGGACCAAGTCCGCTGGCAG
TGCAACCGGCCAGTGCCAAGCATGGCCCGGAGAAGTGTCTGAGAAGTTCAGCGCTTACACCTTTCACCTTGGG
CAAGGAGTTCAAAGAAGGACACAGCTACTACTACTCTCAAACCCATCCACCAGCATGAAGACCGCTGCTTGAGGT
TGAAGGTGACTGTCAGTGGCAAAATCACTCAC
```

SEQ ID n.º 12

15 > región codificante de la fijación de epo en efrina b2

```
TCCAAATCGATAGTTTTAGAGCCTATCTATTGGAATTCCTCGAACTCCAAATTTCTACCTGGACAAGGACTGGTACT
ATACCACAGATAGGAGACAAATTGGATATTATTTGCCCAAAGTGGACTCTAAAACCTGTTGGCCAGTATGAATATT
ATAAAGTTTATATGTTGATAAAGACCAAGCAGACAGATGCACTATTAAGAAGGAAAATACCCCTCTCCTCACTGT
GCCAAACCAGACCAAGATATCAAATTCACCATCAAGTTTCAAGAATTCAGCCCTAACCTCTGGGGTCTAGAATTTCA
GAAGAACAAGATTATTACATTATATCTACATCAAATGGGTCTTTGGAGGGCCTGGATAACCAGGAGGGGAGGGTGT
GCCAGACAAGAGCCATGAAGATCCTCATGAAAGTTGGACAA
```

La determinación de la presencia de la efrina A1 y/o la determinación de la presencia del producto génico de EPH-B4 (ARNm) se podría hacer mediante el uso de una técnica de hibridación o una técnica de amplificación. Se prefiere que la técnica se seleccione del grupo de PCR en tiempo real, análisis de transferencia de tipo Northern, transcripción inversa y amplificación, zimografía, reacción en cadena de la ligasa, NASBA, ensayo de protección a la ARNasa (RPA, por su nombre en inglés), electroforesis capilar con fluorescencia inducida con láser (CE-LIF, por su nombre en inglés) y combinaciones de las mismas.

En concreto, el individuo es un paciente con cáncer que se ha de tratar o que se está tratando con eritropoyetina. Preferiblemente, el efecto fisiológico negativo es la peor supervivencia del paciente debido a que se favorece la progresión del tumor. Preferiblemente, la presencia de un nivel más alto de genes componentes del NEPOR (ARNm) y/o la presencia de los productos (proteínas) de la expresión de genes componentes del NEPOR y/o EPH-B4 y/o efrina A1 en los tejidos tumorales es indicativa del peor pronóstico de supervivencia tras el tratamiento con eritropoyetina.

Preferiblemente, la determinación de la presencia del complejo dimérico del NEPOR se hace por detección de las

correspondientes proteínas del NEPOR con un inmunoensayo. De igual forma, se podrían detectar los péptidos del mismo. El inmunoensayo se selecciona del grupo de inmunoprecipitación, una matriz de proteínas o la fijación a un instrumento de microequilibrio de masas (por ejemplo, Q-Sense o Attana), inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA) o fluoroinmunoensayo, un ensayo quimioluminiscente, un ensayo de aglutinación, una inmunofluorimetría, una inmunoturbidimetría, una transferencia de tipo Western, un inmunoensayo competitivo, un inmunoensayo no competitivo, un inmunoensayo homogéneo, un inmunoensayo heterogéneo, un bioensayo y un ensayo con delator, tal como un ensayo con luciferasa. Preferiblemente, el inmunoensayo es un ELISA. Preferiblemente, el anticuerpo anti-NEPOR y/o el anticuerpo contra EPH-B4 y/o efrina A1 es un anticuerpo monoclonal o policlonal, por ejemplo, seleccionado de, o similar a, los anticuerpos recogidos en la tabla 6.

- 10 Preferiblemente, la detección de las proteínas de los componentes del NEPOR debe realizarse preferiblemente mediante el uso de anticuerpos que detectan las subregiones de las SEQ ID n.ºs 6 y 7, que representan el dominio de fijación a la EPO. Esto implica para la EPH-B4 que los anticuerpos sean específicos contra la SEQ ID n.º 14; para la efrina A1, que los anticuerpos sean específicos contra la SEQ ID n.º 15.

SEQ ID n.º 13

- 15 > región de fijación a epo en epor

SKAALLAARGPEELLCFTERLEDLVCFWEEAASAGVGPNGYSFSYQLEDEFPWKLRLHQAPTARGAVRFWCSLPTAD  
TSSFVPLELRVTAASGAPRYHRVHIHNEVVLLDAPVGLVARLADESGHVLRWLPPEPMTSHIRYEVDSAGNGA  
GSVQRVEILEGRTECVLSNLRGRTRYTFAVRARMAEPSFGGFWSAWSEPVSLTTPSDLDP

SEQ ID n.º 14

- > región de fijación a epo en ephb4

PSAPRSVVSRLNGSSSLHLEWSAPLES GGREDLTYALRCRECRPGGSCAPCGDLTFDPGPRDLVEPWVVVRGLRPFDF  
TYTFEVTALNGVSSSLATGPVFPFEPVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSSLSLAWAVPRAPSGAVLDYEVKYHEKGAE  
GPSSVRFLKTSENRAELRGLKRGASYLVQVRARSEAGYGFQGEHHSQTQLDESEGWREQLAL

- 20 SEQ ID n.º 15

- > región de fijación a epo en efrina a1

LAAADRHTVFWNSSNPKFRNEDYTIHVQLNDYVVDIICPHYEDHSVADAAMEQYILYLVEHEEYQLCQPQSKDQVRWQ  
CNRPSAKHGPEKLESEKQRFPTFTLGEKFEKHSYYYISKPIHQHEDRCLRLKVTVSGKITH

SEQ ID n.º 16

- > región de fijación a epo en efrina b2

- 25 SKSIVLEPIYWNSSNSKFLPGQGLVLYPQIGDKLDIICPKVDSKTVGQYEEYKVMVDKQADRCTIKKENTPLLNC  
AKPDQDIKFTIKFQEFSPNLWGLEFQKNKDYIIISTSNGLSLEGLDNQEGGVCQTRAMKILMKVGQ

Preferiblemente, el individuo es un paciente con cáncer que se ha de tratar con eritropoyetina o que se está tratando con eritropoyetina. La muestra de tejido se podría seleccionar del grupo de tejidos y líquidos biológicos, tales como sangre, linfa, orina, líquido cefálico. La muestra de tejido también podría ser una muestra de biopsia tumoral. Se prefiere que la muestra de tejido sea de tejido de cáncer o de las células circulantes procedentes del mismo.

- 30 Se prefiere que el cáncer del paciente con cáncer se seleccione del grupo de cáncer de la cabeza y el cuello, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer del intestino delgado, leucemia, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de endometrio, cáncer de estómago, linfoma no de Hodgkin, cáncer de riñón, carcinoma de células renales (CCR), melanoma maligno, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de la vejiga, cáncer de vulva, cáncer de pene, cáncer de testículo, cáncer de timo, sarcoma de Kaposi,  
35 cáncer de ojo, cáncer de la glándula suprarrenal, cáncer de cerebro, cáncer cervical, cáncer del apéndice, cáncer adenoideo, cáncer del conducto colédoco, cáncer de uretra, cáncer raquídeo, familia de tumores de Ewing, cáncer de células germinales extragonadal, cáncer del conducto colédoco extrahepático, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer de las partes blandas, cáncer de hueso, linfoma de Hodgkin, cáncer de ano, mesotelioma maligno, cáncer de vagina, cáncer de piel, cáncer del sistema nervioso central (craneofaringioma), blastoma pleuropulmonar, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, cáncer de las células transicionales de la pelvis renal y de la uretra, cáncer de hipófisis, carcinoma de las células escamosas de la cabeza y el cuello (CCECC), cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga y cáncer de glándula salival. Resulta particularmente preferido que el cáncer se seleccione del grupo de carcinoma de las células escamosas de la cabeza y el cuello (CCECC), cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de  
45 cerebro y cáncer de vejiga.

NEPOR e intervención de la enfermedad y cribado/diseño del tratamiento

Sin comprometerse con la teoría, se propone que el NEPOR interviene en los efectos citoprotectores de la EPO y sus variantes. Así pues, se ha demostrado que la EPO y sus variantes poseen actividad citoprotectora (pero no hematopoyética) pueden afectar a la función del NEPOR. Por lo tanto, la presente descripción ofrece el conocimiento de la composición del NEPOR que se puede utilizar para optimizar la estructura y eficacia de tales moléculas terapéuticas (esto es, gestionar mejor la relación la estructura y la actividad, o REA, del farmacóforo de la EPO). Además, la presente descripción ofrece el conocimiento de la composición del NEPOR que se puede utilizar para identificar nuevos compuestos reguladores del NEPOR. Por ejemplo, en las enfermedades asociadas a afecciones hipóxicas (p. ej., accidente cerebrovascular, infarto de miocardio), se pueden desarrollar compuestos de fijación al NEPOR de eficacia mejorada para imitar los efectos de la EPO sobre el NEPOR. De igual forma, los antagonistas específicos del NEPOR (tales como las moléculas que se fijan al sitio activo de NEPOR) aunque no sean transmisoras de señales, son antagonistas de la función de la EPO. Tales antagonistas de la EPO, cuando se administran a la vez que la EPO, pueden permitir que los efectos de la EPO mejoren la hematopoyesis (es decir, traten la anemia) toda vez que se impide el efecto secundario de promoción del crecimiento de las células tumorales, la supervivencia y la angiogénesis en los cánceres que dan positivo para el NEPOR, tales como el CCECC. Además, al confrontar la actividad relativa de los compuestos con el complejo receptor NEPOR protector de tejido en comparación con el receptor de EPOR homodimérico, se da a conocer la generación de terapias específicas o dirigidas contra el NEPOR.

La definición de NEPOR da a conocer métodos para identificar moléculas terapéuticas que modulan la actividad de señalización protectora de tejido del NEPOR. Esto comprende: (a) poner en contacto un compuesto problema con el complejo receptor NEPOR y/o EPH-B4 y/o efrina A1 y un complejo homodimérico de EPOR; (b) medir y comparar el nivel de la actividad protectora de tejido iniciada por la activación del NEPOR con la activación de la señalización del homodímero de EPOR; (c) identificar un compuesto problema que incrementa o disminuye el nivel de la actividad del complejo NEPOR protector de tejido en comparación con el nivel de la activación del complejo EPOR; y (d) ensayar en los fármacos identificados su actividad protectora de tejido mediada a través del NEPOR, pero sin activación del EPOR, y (e) ensayar en los fármacos identificados su actividad inhibidora del NEPOR. El método es útil para identificar los fármacos que modulan la interacción entre un complejo NEPOR protector de tejido y/o EPH-B4 y/o efrina A1 y el ligando EPO. Además, el método es útil para identificar tratamientos con los que tratar enfermedades del sistema nervioso central o del sistema nervioso periférico que tienen síntomas principalmente neurológicos o psiquiátricos, enfermedades oftálmicas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cardiopulmonares, enfermedades respiratorias, enfermedades del riñón, urinarias y reproductivas, enfermedades óseas, enfermedades cutáneas, enfermedades digestivas y anomalías endocrinas y metabólicas, y cáncer.

Más en concreto, la identificación del NEPOR da a conocer un método que identifica (I1) un compuesto que modula la actividad protectora de tejido del NEPOR, que comprende:

(a) poner en contacto un compuesto problema con un complejo receptor NEPOR protector de tejido (N) y/o EPH-B4 y/o efrina A1 o una célula que expresa el complejo receptor de la citocina protector de tejido; medir el nivel de actividad de (N) en la célula; identificar un compuesto problema que incrementa o disminuye el nivel de actividad de (N) en comparación con el nivel de actividad de (N) medido en ausencia del compuesto problema; y ensayar en el compuesto problema identificado su actividad protectora de tejido;

(b) poner en contacto un compuesto problema con una célula que está modificada por recombinación para expresar (N), en donde la célula o la célula recombinante se transforma con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que está funcionalmente unida a un promotor y que codifica los polipéptidos EPH-B4 y/o efrina A1; medir el nivel de actividad de (N) en la célula; y

(c) poner en contacto un compuesto problema con una célula que expresa el complejo receptor NEPOR protector de tejido, en donde la célula se transforma con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un gen delator funcionalmente unido al elemento regulador asociado a la actividad de (N); identificar un compuesto problema que incrementa o disminuye el nivel de expresión del gen delator con respecto al nivel de expresión del gen delator medido en ausencia del compuesto problema; y ensayar en el compuesto problema identificado su actividad protectora de tejido.

La presente descripción da a conocer además un método para identificar (I2) un compuesto que se fija a (N), que comprende:

(a) poner en contacto (N) con un ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido y/o ligando de EPH-B4 y/o efrina A1 unido a un primer marcador, y una cantidad equivalente de un compuesto problema unido a un segundo marcador en las condiciones que llevan a la fijación, retirar el material sin fijar de (N) y detectar el nivel del primer y segundo marcadores, en donde si el segundo marcador está presente, el compuesto se fija a (N), y si el nivel del primer marcador disminuye con respecto al nivel del primer marcador cuando el ligando marcado entra en contacto con (N) en las condiciones que llevan a la fijación en ausencia de un compuesto problema después de la retirada del material sin fijar, entonces se identifica un compuesto que se fija a (N); o

(b) poner en contacto un compuesto problema con un fragmento del complejo receptor NEPOR protector de tejido

que se fija al ligando que comprende al menos un dominio extracelular del receptor EPH-B4 o del receptor efrina A1, el cual está fusionado a un fragmento Fc unido a un soporte sólido, retirar los compuestos problema sin fijar del soporte sólido, e identificar el compuesto unido al fragmento del complejo receptor NEPOR protector de tejido, de tal manera que un compuesto fijado al soporte sólido se identifica como un compuesto que se fija a un complejo receptor NEPOR protector de tejido; e identificar (I3) un compuesto que modula la fijación de un ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido a (N), o compuesto que modula la interacción entre (N) y el ligando del complejo receptor de citocina protector de tejido, implica (i) poner en contacto un ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido con (N) en presencia de uno o varios compuestos problema en las condiciones que llevan a la fijación y medir la cantidad de ligando del complejo receptor de citocina protector de tejido fijado a (N).

La presente descripción da a conocer además nuevos complejos receptores NEPOR protectores de tejido, en particular complejos que contienen EPH-B4 y/o efrina A1, que se pueden utilizar para dar a conocer un ensayo de cribado *in vitro* para los tratamientos específicos del NEPOR; al medir la fijación de los compuestos problema al complejo receptor NEPOR protector de tejido en comparación con los complejos homodiméricos de EPOR. Se marca el compuesto problema, y la fijación del compuesto problema marcado a los complejos receptores detallados en la figura 10 se mide mediante la detección del marcador unido al compuesto problema. Como alternativa, se podría emplear una estrategia de detección sin marcador, tal como la resonancia de plasmones superficiales. Tal estrategia puede dar a conocer nuevos tratamientos neuroprotectores (a saber, agonistas del NEPOR) que carecen de actividad hematopoyética. Tal estrategia también puede dar a conocer nuevas oncoterapias (a saber, antagonistas de NEPOR, a saber, al menos un y/o agonista de EPH-B4 y/o efrina A1) que no inhibe la hematopoyesis. En la figura 10 se muestra la naturaleza de tales matrices de cribado que implican construcciones recombinantes de receptores (en el caso del ejemplo, como construcciones de Fc).

#### Uso

(I1) es útil para identificar un compuesto que modula la actividad protectora de tejido del NEPOR. (I2) es útil para identificar un compuesto que se fija al NEPOR. (I3) es útil para identificar un compuesto que modula la fijación de un ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido a (N), o compuesto que modula la interacción entre (N) y el ligando del complejo receptor de citocina protector de tejido (reivindicado). Los compuestos identificados con el uso de (I1)-(I3) son útiles para tratar diferentes afecciones del sistema nervioso periférico y del central (p. ej., hipoxia, y/o isquemia, epilepsia, trastornos convulsivos crónicos, intoxicación por neurotoxinas, choque septicémico, choque anafiláctico), trastornos neuropsicológicos (demencia senil, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, demencia, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Huntington), enfermedades inflamatorias (p. ej., bronquitis crónica, artritis reumatoide, glomerulonefritis, encefalitis, meningitis, polimiositis), enfermedades oftálmicas (p. ej., angitis, isquemia retiniana), enfermedades cardiovasculares (p. ej., infarto de miocardio, miocarditis), enfermedades cardiopulmonares (p. ej., asma, trombosis pulmonar), enfermedades respiratorias, enfermedades del riñón, urinarias y reproductivas (p. ej., miastenia grave, diabetes, enfermedades autoinmunitarias), enfermedades óseas (p. ej., osteopenia, enfermedad de Paget), enfermedades digestivas y anomalías endocrinas y metabólicas.

Los compuestos identificados con el uso de (I1)-(I3) también son útiles para tratar cánceres que dan positivo para el NEPOR, en concreto, y/o cánceres que dan positivo para EPH-B4 y/o efrina A1, entre ellos, cáncer de la cabeza y el cuello, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer del intestino delgado, leucemia, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de endometrio, cáncer de estómago, linfoma no de Hodgkin, cáncer de riñón, carcinoma de células renales (CCR), melanoma maligno, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de vejiga, cáncer de vulva, cáncer de pene, cáncer de testículo, cáncer de timo, sarcoma de Kaposi, cáncer de ojo, cáncer de glándula suprarrenal, cáncer de cerebro, cáncer de cuello uterino, cáncer del apéndice, cáncer adenoideo, cáncer del conducto colédoco, cáncer de uretra, cáncer raquídeo, familia de tumores de Ewing, cáncer de las células germinales extragonadal, cáncer del conducto colédoco extrahepático, cáncer de la trompa de Falopio, cánceres de las partes blandas, cáncer de hueso, linfoma de Hodgkin, cáncer de ano, mesotelioma maligno, cáncer de vagina, cáncer de piel, cáncer del sistema nervioso central (craneofaringioma), blastoma pleuropulmonar, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, cáncer de las células transitorias de la pelvis renal y la uretra, cáncer de hipófisis, carcinoma de las células escamosas de la cabeza y el cuello (CCECC), cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga y cáncer de glándula salival. Resulta particularmente preferido que el cáncer se seleccione del grupo de carcinoma de las células escamosas de la cabeza y el cuello (CCECC), cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de cerebro y cáncer de vejiga.

#### NEPOR en los tratamientos de oncología

La hipótesis de la presente descripción es que la EPO da lugar a peores resultados de supervivencia (al menos en algunos cánceres) debido a sus efectos sobre la actividad del NEPOR, a saber, en particular la actividad de EPH-B4 y/o efrina A1. Por lo tanto, el tratamiento de estos pacientes que dan positivo para el NEPOR con una terapia que actúa selectivamente sobre el NEPOR es un camino prudente para la intervención de la enfermedad. Las estrategias específicas para antagonizar con las señales de supervivencia mediadas por el NEPOR incluyen, por ejemplo:

- a) anticuerpos antagonistas específicos contra el NEPOR. Tales anticuerpos bloquean y antagonizan las regiones extracelulares de la molécula específicamente asociada a la mediación de la actividad citoprotectora del NEPOR.
- b) moléculas pequeñas específicas del NEPOR. Tales moléculas pequeñas bloquean y antagonizan con las regiones extracelulares de la molécula específicamente asociada a la mediación de la actividad citoprotectora del NEPOR.
- c) péptidos de alta afinidad que son específicos por su acción selectiva sobre el NEPOR para bloquear y antagonizar la mediación de la actividad citoprotectora de la EPO.
- d) moléculas pequeñas que actúan selectivamente sobre el dominio tirosina cinasa intracelular de EPH-B4 (p. ej., Dasatinib), que incluyen:
- 1: CID: 1095868, AKI-STT-00166305; ZINC00818264; BAS 09636496 IUPAC: *N*-[5-[(3-clorofenil)metil]-1,3-tiazol-2-il]-2-(4,6-dimetilpirimidín-2-il)sulfanilacetamida. MM: 404,93678 | FM: C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S. (MM es la masa molecular y FM es la fórmula molecular)
- 2: CID: 1465558, IUPAC: 2-[(3-clorobenzoil)amino]-4-metil-*N*-piridín-3-il-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 372,82872 | FM: C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S.
- 3: CID: 1468201, IUPAC: *N*-[5-(2-clorofenil)carbamoil]-4-metil-1,3-tiazol-2-il]piridina-4-carboxamida, MM: 372,82872 | FM: C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S.
- 4: CID: 3062316, Dasatinib; Sprycel; BMS Dasatinib, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 488,00554 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 5: CID: 3072360, 142287-40-9; pirimido(4,5-d)pirimidín-4(1*H*)-ona, 7-metil-1-fenil-2-((3-(4-(2-tiazolil)-1-piperazinil)propil)tio)- IUPAC: 2-metil-8-fenil-7-[3-[4-(1,3-tiazol-2-il)piperazín-1-il]propilsulfanil]pirimido[6,5-d]pirimidín-5-ona, MM: 479,6209 | FM: C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 6: CID: 5041467, STK154706; ZINC04687922, IUPAC: [2-[(2-metilfenil)amino]-1,3-tiazol-4-il]-(4-pirimidín-2-il)piperazín-1-il)metanona, MM: 380,4667 | FM: C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S.
- 7: CID: 9822929, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[(6-imidazol-1-ilpiridazín-3-il)amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 411,869 | FM: C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 8: CID: 9927718, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-(ciclopropanocarbonilamino)-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 335,809 | FM: C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S.
- 9: CID: 10006113, IUPAC: hidrocloreuro de *N*-[4-cloro-2-[(5-cloropiridín-2-il)carbamoil]fenil]-5-metil-6,7-dihidro-4*H*-[1,3]tiazolo[5,4-*c*]piridina-2-carboxamida, MM: 498,81322 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 10: CID: 10006114, IUPAC: *N*-[4-cloro-2-[(5-cloropiridín-2-il)carbamoil]fenil]-5-metil-6,7-dihidro-4*H*-[1,3]tiazolo[5,4-*c*]piridina-2-carboxamida, MM: 462,35228 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 11: CID: 10052635, IUPAC: 2-[[2-metil-5-[[6-[4-metilpiperazín-1-il]metil]piridín-2-il]amino]fenil]amino]-*N*-(2-metilfenil)-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 527,68362 | FM: C<sub>29</sub>H<sub>33</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 12: CID: 10195898, IUPAC: *N*-[(4-clorofenil)metil]-2-[[[(2*S*)-2-hidroxi-2-pirimidín-2-iletil]-metilamino]metil]-4-metil-7-oxotieno[3,2-*e*]piridina-6-carboxamida, MM: 497,99706 | FM: C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S.
- 13: CID: 10206276, IUPAC: *N*-[4-[(5-cloropiridín-2-il)carbamoil]-2-fenil-1,3-tiazol-5-il]-1-propán-2-ilpiperidina-4-carboxamida, MM: 484,01354 | FM: C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 14: CID: 10252208, IUPAC: 2-[4-(5-amino-1,3-tiazol-2-il)fenil]-3-(5-cloropiridín-2-il)quinazolín-4-ona, MM: 431,89746 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 15: CID: 10253695, IUPAC: 2-[4-[3-(5-cloropiridín-2-il)-4-oxoquinazolín-2-il]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 459,90756 | FM: C<sub>23</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 16: CID: 10301604, IUPAC: *N*-[4-[(5-cloropiridín-2-il)carbamoil]-2-(3,4-difluorofenil)-1,3-tiazol-5-il]-1-propán-2-ilpiperidina-4-carboxamida, MM: 519,994466 | FM: C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 17: CID: 10344807, IUPAC: *N*-[2-[4-[3-(5-cloropiridín-2-il)-4-oxoquinazolín-2-il]fenil]-1,3-tiazol-4-il]acetamida, MM: 473,93414 | FM: C<sub>24</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 18: CID: 10368624, IUPAC: *N*-[(4-clorofenil)metil]-2-[[[(2-hidroxi-2-pirimidín-2-iletil)-metilamino]metil]-7-metil-4-oxotieno[3,2-*e*]piridina-5-carboxamida, MM: 497,99706 | FM: C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S.

- 19: CID: 10370949, IUPAC: (3Z)-4-[[[(2S)-2-(3-clorofenil)-2-hidroxi-etil]amino]-3-[6-metil-2-[4-(1,3-tiazol-2-iletetil)piperazín-1-il]-7,9-dihidropurín-8-ilideno]piridín-2-ona, MM: 578,08832 | FM: C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>9</sub>O<sub>2</sub>S.
- 20: CID: 10412586, IUPAC: N-[2-[4-[3-(5-cloropiridín-2-il)-4-oxoquinazolín-2-il]fenil]-1,3-tiazol-5-il]acetamida, MM: 473,93414 | FM: C<sub>24</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 5 21: CID: 10413555, IUPAC: N-[(4-clorofenil)metil]-2-[[[(2R)-2-hidroxi-2-pirimidín-2-iletetil]metilamino]metil]-7-metil-4-oxotieno[3,2-e]piridina-5-carboxamida, MM: 497,99706 | FM: C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S.
- 22: CID: 10456156, IUPAC: 4-[(3-clorotiofén-2-il)metilamino]-2-[(4-morfolín-4-ilfenil)amino]pirimidina-5-carboxamida, MM: 444,93774 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S.
- 10 23: CID: 10458706, IUPAC: N-[5-[2-(4-clorofenil)amino]pirimidín-4-il]-4-metil-1,3-tiazol-2-il]-3-(2-morfolín-4-iletetilamino)propanamida, MM: 502,03212 | FM: C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 24: CID: 11153014, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[(2,6-dimetilpirimidín-4-il)amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 373,85984 | FM: C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 25: CID: 11167695, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[2-metil-6-(2-morfolín-4-iletetilamino)pirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 488,00554 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 15 26: CID: 11168231, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[(6-cloro-2-metilpirimidín-4-il)amino]-N-[(4-metoxifenil)metil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 514,42684 | FM: C<sub>24</sub>H<sub>21</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 27: CID: 11200510, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(2-hidroxi-etilamino)piridín-2-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 403,88582 | FM: C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 20 28: CID: 11247793, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(metil-(3-metilaminopropil)amino)piridín-2-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 444,9808 | FM: C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S.
- 29: CID: 11260009, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(hidroximetil)piperidín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 472,9909 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S.
- 30: CID: 11269410, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[(6-cloro-2-metilpirimidín-4-il)amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 394,27832 | C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 25 31: CID: 11282881, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(2-morfolín-4-iletetilamino)pirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 473,97896 | FM: C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 32: CID: 11283174, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(3-morfolín-4-ilpropilamino)piridín-2-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 487,01748 | FM: C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S.
- 30 33: CID: 11328827, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(3-imidazol-1-ilpropilamino)piridín-2-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 467,97438 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 34: CID: 11407465, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(2-hidroxi-etilamino)-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 418,90046 | FM: C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S.
- 35: CID: 11466196, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[2-metil-6-(3-morfolín-4-ilpropilamino)pirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 502,03212 | FM: C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 35 36: CID: 11466607, IUPAC: hidrocloreto de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 524,46648 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 37: CID: 11487256, IUPAC: N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[(6-morfolín-4-ilpirimidín-4-il)amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 430,91116 | FM: C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S.
- 40 38: CID: 11505502, IUPAC: 2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazín-1-il]pirimidín-4-il]amino]-N-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 626,65257 | FM: C<sub>29</sub>H<sub>29</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>3</sub>S.
- 39: CID: 11512538, IUPAC: 2,2-dimetilpropanoato de 2-[4-[6-[[5-[(2-cloro-6-metilfenil)carbamoil]-1,3-tiazol-2-il]amino]-2-metilpirimidín-4-il]piperazín-1-il]etilo, MM: 572,12196 | FM: C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.
- 40: CID: 11539665, IUPAC: (3-cloro-2-fluorofenil)-[4-[[6-[(5-fluoro-1,3-tiazol-2-il)amino]piridín-2-il]metil]piperazín-1-il]metanona, MM: 449,904626 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 45 41: CID: 11540687, IUPAC: hidrato de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 506,02082 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.

- 42: CID: 11569328, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[3-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-5-metilfenil]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 486,02942 | FM: C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 43: CID: 11570976, IUPAC: 2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-*N*-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)fenil]carbamoíl]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 640,67915 | FM: C<sub>30</sub>H<sub>31</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>3</sub>S.
- 5 44: CID: 11577776, IUPAC: 2-[[6-(2-hidroxietyl-amino)-2-metilpirimidín-4-il]amino]-*N*-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoíl]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 571,57407 | FM: C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.
- 45: CID: 11590089, IUPAC: (3-cloro-2-fluorofenil)-[4-[5-metil-6-(1,3-tiazol-2-il-amino)piridín-2-il]piperazín-1-il]metanona, MM: 431,914163 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>ClFN<sub>5</sub>OS.
- 10 46: CID: 11606973, IUPAC: *N*-[5-[[3-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-5-(trifluorometil)benzoíl]amino]-2-metilfenil]-2-(piridín-2-il-amino)-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 625,66451 | FM: C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.
- 47: CID: 11650098, IUPAC: 2-[[6-(4-metilpiperazín-1-il)pirimidín-4-il]amino]-*N*-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoíl]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 596,62659 | FM: C<sub>28</sub>H<sub>27</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>S.
- 48: CID: 11650132, IUPAC: *N*-[5-[(2-cloro-6-metilfenil)carbamoíl]-1,3-tiazol-2-il]-*N*-[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]carbamoíl de pentilo, MM: 602,14794 | FM: C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>4</sub>S.
- 15 49: CID: 11650511, IUPAC: *N*-[5-[[3-(4-etilpiperazín-1-il)-5-(trifluorometil)benzoíl]amino]-2-metilfenil]-2-[[6-(2-hidroxietyl-amino)-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 683,74695 | FM: C<sub>32</sub>H<sub>36</sub>F<sub>3</sub>N<sub>9</sub>O<sub>3</sub>S.
- 50: CID: 11664355, IUPAC: 2-[(2-metil-6-morfolín-4-il)pirimidín-4-il]amino]-*N*-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoíl]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 597,61135 | FM: C<sub>28</sub>H<sub>26</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.
- 20 51: CID: 11664511, IUPAC: 2-[[4-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]piridín-2-il]amino]-*N*-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoíl]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 625,66451 | FM: C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.
- 52: CID: 11669430, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[(2-metil-6-piperazín-1-il)pirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 443,95298 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 53: CID: 11676373, IUPAC: (3-cloro-2-fluorofenil)-[4-[[6-(1,3-tiazol-2-il-amino)piridín-2-il]metil]piperazín-1-il]metanona, MM: 431,914163 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>ClFN<sub>5</sub>OS.
- 25 54: CID: 11684148, IUPAC: (3-cloro-2-fluorofenil)-[4-[[6-[(5-cloro-1,3-tiazol-2-il)amino]piridín-2-il]metil]piperazín-1-il]metanona, MM: 466,359223 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>5</sub>OS.
- 55: CID: 11700117, IUPAC: 2-[[6-(4-etilpiperazín-1-il)-2-metilpirimidín-4-il]amino]-*N*-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoíl]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 624,67975 | FM: C<sub>30</sub>H<sub>31</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>S.
- 30 56: CID: 11707091, IUPAC: 2-[[2-metil-6-(4-metilpiperazín-1-il)pirimidín-4-il]amino]-*N*-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoíl]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 610,65317 | FM: C<sub>29</sub>H<sub>29</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>S.
- 57: CID: 11714286, IUPAC: 2-[[5-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]piridín-2-il]amino]-*N*-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoíl]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 625,66451 | FM: C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.
- 58: CID: 11714353, IUPAC: 2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-*N*-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoíl]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 640,67915 | FM: C<sub>30</sub>H<sub>31</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>3</sub>S.
- 35 59: CID: 11752136, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[5-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 488,00554 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 60: CID: 11772766, IUPAC: 4-[2-(3-clorofenil)etil-amino]-2-piridín-4-il-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 358,8452 | FM: C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S.
- 40 61: CID: 11775143, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[(2-metil-6-morfolín-4-il)pirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 444,93774 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S.
- 62: CID: 11854012, IUPAC: ácido 2-[4-[6-[[5-[2-cloro-6-metilfenil]carbamoíl]-1,3-tiazol-2-il]amino]-2-metilpirimidín-4-il]piperazín-1-il]acético, MM: 501,98906 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.
- 63: CID: 11854269, IUPAC: hidrogenosulfato de 2-[4-[6-[[5-[(2-cloro-6-metilfenil)carbamoíl]-1,3-tiazol-2-il]amino]-2-metilpirimidín-4-il]piperazín-1-il]etilico, MM: 568,06874 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>.
- 45 64: CID: 11854270, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[2-(2-hidroxietyl-amino)etil-amino]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 461,96826 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.

- 65: CID: 11854271, IUPAC: 2-[[6-(2-aminoetilamino)-2-metilpirimidín-4-il]amino]-*N*-(2-cloro-6-metilfenil)-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 417,9157 | FM: C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>7</sub>OS.
- 66: CID: 11854272, IUPAC: ácido 2-[[2-[4-[6-[[5-[(2-cloro-6-metilfenil)carbamoi]l]-1,3-tiazol-2-il]amino]-2-metilpirimidín-4-il]piperazín-1-il]acetil]amino]jetanosulfónico, MM: 609,12066 | FM: C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>.
- 5 67: CID: 11854533, IUPAC: *N*-(2-cloro-4-hidroxi-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 504,00494 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.
- 68: CID: 11854534, IUPAC: *N*-[2-cloro-6-(hidroximetil)fenil]-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 504,00494 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.
- 69: CID: 11854535, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)-4-oxidopiperazín-4-io-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 504,00494 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.
- 10 70: CID: 11854536, IUPAC: ácido 2-[4-[6-[[5-[(2-cloro-6-metilfenil)carbamoi]l]-1,3-tiazol-2-il]amino]-2-metilpirimidín-4-il]-1-oxidopiperazín-1-io-1-il]acético, MM: 517,98846 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>4</sub>S.
- 71: CID: 11949914, IUPAC: 4-[[2-(5-cloro-2-fluorofenil)-5-dimetilaminopirimidín-4-il]amino]-*N*-[2-(2-hidroxietylamino)etil]piridina-3-carboxamida, MM: 473,931003 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>.
- 15 72: CID: 11951866, IUPAC: 4-[[2-(5-cloro-2-fluorofenil)-5-pirrolidín-1-ilpirimidín-4-il]amino]-*N*-(2-hidroxietyl)piridina-3-carboxamida, MM: 456,900483 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>.
- 73: CID: 11952045, IUPAC: 4-[[2-(5-cloro-2-fluorofenil)-5-pirrolidín-1-ilpirimidín-4-il]amino]-*N*-[(2*S*)-2-hidroxiopropil]piridina-3-carboxamida, MM: 470,927063 | FM: C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>.
- 74: CID: 15979866, IUPAC: 5-[2-[[4-(4-acetilpiperazín-1-il)piridín-2-il]amino]-1,3-tiazol-5-il]-*N*-metilpiridina-3-carboxamida, MM: 437,51802 | FM: C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 20 75: CID: 15980109, IUPAC: *N*-(2-aminoetyl)-5-[2-[(4-morfolín-4-ilpiridín-2-il)amino]-1,3-tiazol-5-il]piridina-3-carboxamida, MM: 425,50732 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 76: CID: 15980233, IUPAC: *N*-(2-hidroxietyl)-5-[2-[(4-morfolín-4-ilpiridín-2-il)amino]-1,3-tiazol-5-il]piridina-3-carboxamida, MM: 426,49208 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S.
- 25 77: CID: 15980347, IUPAC: *N*-(2-metilaminoetyl)-5-[2-[(4-morfolín-4-ilpiridín-2-il)amino]-1,3-tiazol-5-il]piridina-3-carboxamida, MM: 439,5339 | FM: C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 78: CID: 15980351, IUPAC: 5-[2-[[4-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]piridín-2-il]amino]-1,3-tiazol-5-il]-*N*-(2,2,2-trifluoroetyl)piridina-3-carboxamida, MM: 521,51539 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.
- 79: CID: 15982537, IUPAC: (3-cloro-2-fluorofenil)-[4-[6-[[5-fluoro-1,3-tiazol-2-il]amino]-5-metilpiridín-2-il]piperazín-1-il]metanona, MM: 449,904626 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>OS.
- 30 80: CID: 16034848, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido 2,3-dihidroxibutanodioico, MM: 638,09238 | FM: C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>8</sub>S.
- 81: CID: 16037977, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-5-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 488,00554 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 35 82: CID: 16061431, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; 4-[4-metilpiperazín-1-il]metil]-*N*-[4-metil-3-[(4-piridín-3-ilpirimidín-2-il)amino]fenil]benzamida, MM: 981,60828 | FM: C<sub>51</sub>H<sub>57</sub>ClN<sub>14</sub>O<sub>3</sub>S.
- 83: CID: 16223227, IUPAC: ácido but-2-enodioico; *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 604,0777 | FM: C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>6</sub>S.
- 40 84: CID: 16223228, IUPAC: hidrobromuro de *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 568,91748 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>BrClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 85: CID: 16223229, IUPAC: ácido but-2-enodioico; *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 604,0777 | FM: C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>6</sub>S.
- 45 86: CID: 16223316, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido metanosulfónico, MM: 584,1112 | FM: C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>.
- 87: CID: 16223317, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido fosfórico, MM: 586,000721 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>6</sub>PS.

- 88: CID: 16223318, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido 2-hidroxibenzoico, MM: 626,12628 | FM: C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>5</sub>S.
- 89: CID: 16223319, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido sulfúrico, MM: 586,08402 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>.
- 5 90: CID: 16223320, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido 4-metilbencenosulfónico, MM: 660,20716 | FM: C<sub>29</sub>H<sub>34</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>.
- 91: CID: 16584134, AKE-PB223730486, IUPAC: *N*-(4-clorofenil)-2-[(4,5-dimetil-1,3-tiazol-2-il)amino]-4-metilpirimidina-5-carboxamida, MM: 373,85984 | FM: C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>5</sub>OS.
- 10 92: CID: 16584137, AKE-PB223730492, IUPAC: *N*-(3-clorofenil)-2-[(4,5-dimetil-1,3-tiazol-2-il)amino]-4-metilpirimidina-5-carboxamida, MM: 373,85984 | FM: C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>5</sub>OS.
- 93: CID: 16584139, AKE-PB223730496, IUPAC: 2-[(4,5-dimetil-1,3-tiazol-2-il)amino]-4-metil-*N*-(2-metilfenil)pirimidina-5-carboxamida, MM: 353,44136 | FM: C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S.
- 94: CID: 16655683, IUPAC: 2-[(6-cloro-2-metilpirimidín-4-il)amino]-*N*-(2,6-diclorofenil)-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 414,6968 | FM: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S.
- 15 95: CID: 16655839, IUPAC: *N*-(2,6-diclorofenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 508,42402 | FM: C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 96: CID: 16660745, IUPAC: *N*-(4-fluorofenil)-4-(2-hidroxi-etilamino)-6-metilsulfanil-2-piridín-4-ilpirimidina-5-carboxamida, MM: 399,441923 | FM: C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 20 97: CID: 16660747, IUPAC: *N*-(4-etilfenil)-4-(2-hidroxi-etilamino)-6-metilsulfanil-2-piridín-4-ilpirimidina-5-carboxamida, MM: 409,50462 | FM: C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 98: CID: 16660907, IUPAC: 4-(2-hidroxi-etilamino)-*N*-(4-metilfenil)-6-metilsulfanil-2-piridín-4-ilpirimidina-5-carboxamida, MM: 395,47804 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 99: CID: 16661063, IUPAC: *N*-(4-clorofenil)-4-(2-hidroxi-etilamino)-6-metilsulfanil-2-piridín-4-ilpirimidina-5-carboxamida, MM: 415,89652 | FM: C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 25 100: CID: 16661212, IUPAC: *N*-(2,4-dimetilfenil)-4-(2-hidroxi-etilamino)-6-metilsulfanil-2-piridín-4-ilpirimidina-5-carboxamida, MM: 409,50462 | FM: C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 101: CID: 16661214, IUPAC: 4-(1-hidroxi-bután-2-ilamino)-*N*-(4-metilfenil)-6-metilsulfanil-2-piridín-4-ilpirimidina-5-carboxamida, MM: 423,5312 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.

En la presente memoria, el CID es el identificador del compuesto tal y como está definido en Pubchem.

- 30 e) Moléculas pequeñas que actúan selectivamente y antagonizan vía abajo con los componentes de la vía de señalización del NEPOR, en particular los inhibidores de la tirosina cinasa de EPH-B4.

f) Politerapias en las que intervienen una o varias de las estrategias a-e.

- 35 g) La presente descripción también da a conocer una politerapia. Se propone la coadministración de EPO con un inhibidor intracelular de la señalización del NEPOR (p. ej., Dasatinib) para mantener la señalización de la EPO a través del EPOR (y así promover la hematopoyesis) al mismo tiempo que se inhibe la supervivencia de las células tumorales que son positivas para el NEPOR.

Fármacos contra el NEPOR con los que tratar lesiones neuronales

- 40 Sin comprometerse con la teoría, la presente descripción da a conocer que la EPO es neuroprotectora debido a sus efectos sobre la actividad del NEPOR, a saber, en particular, y/o la actividad de EPH-B4 y/o efrina A1. Por lo tanto, la presente descripción da a conocer un método para tratar el accidente cerebrovascular isquémico, traumatismo, epilepsia, enfermedades neurodegenerativas, y disfunción cognitiva, con un tratamiento agonista que actúa selectivamente sobre el NEPOR. Las estrategias específicas para mejorar positivamente las señales de supervivencia mediadas por el NEPOR incluyen:

- 45 a) Anticuerpos específicos contra el NEPOR. Tales anticuerpos se fijan e inician/refuerzan la mediación de la actividad citoprotectora del NEPOR.

b) Moléculas pequeñas específicas del NEPOR. Tales moléculas pequeñas se fijan e inician/refuerzan la mediación de la actividad citoprotectora del NEPOR.

c) Mutantes de EPO que actúan selectivamente sobre el NEPOR y versiones glucosiladas del mismo. Debido a los requisitos conformacionales estrictos del EPOR para mediar la señalización en respuesta a la EPO, los siguientes mutantes de EPOR (SEQ ID n.º 17 a SEQ ID n.º 212) favorecen la fijación al NEPOR en oposición al EPOR, y así pues, actúan principalmente como protectores de tejido.

SEQ ID NO.17

APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITRVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSL  
TLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.18

APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQALLVNSSQPWEPLQLHVD  
KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.19

APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLT  
TLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.20

APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTL  
LRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.21

APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPPGVGQLFPAVGAPAAACG

SEQ ID NO.22

APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENHC

SEQ ID NO.23

APPRLICDSRVLERYLEAKEAENIT

SEQ ID NO.24

APPRLICDSRVLEAYLLEAKEAENIT

SEQ ID NO.25

APPRLICDSRVLEEYLLLEAKEAENIT

SEQ ID NO.26

APPRLICDSRVLERYL

SEQ ID NO.27

APPRLI

SEQ ID NO.28

APPRLICDSRVLERYILEAKEAENVMTGCAEGPRLSENITVPDTKVNIFYAWKRMEKELMSPDTPPAPLRTLTVD  
TFCCKLFVYANFLRGKCLKLYTGEVCRGDR

5

Deleciones de los sitios de interacción del EPOR hWT4

SEQ ID NO.29

APPRLICEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWE  
PLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.30

APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALL  
VNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKCLKLYT  
GEACRTGDR

SEQ ID NO.31

APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDLTTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKCLKLYTGEAC  
RTGDR

SEQ ID NO.32

APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKCLKLYTGEAC  
RTGDR

Deleciones desde el extremo C que comienzan en el último puente de cisteína C161

ES 2 647 762 T3

SEQ ID NO.33

APPRLICDSRVFLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLGK  
LYTG

SEQ ID NO.34

APPRLICDSRVFLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLGK  
LYTGE

SEQ ID NO.35

APPRLICDSRVFLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLGK  
LYTG

SEQ ID NO.36

APPRLICDSRVFLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLGK  
LYT

SEQ ID NO.37

APPRLICDSRVFLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLGK  
LY

SEQ ID NO.38

APPRLICDSRVFLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLGK  
L

SEQ ID NO.39

APPRLICDSRVFLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLGK

SEQ ID NO.40

APPRLICDSRVFLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLGK

SEQ ID NO.41

APPRLICDSRVFLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLALGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLGK

# ES 2 647 762 T3

SEQ ID NO.42  
APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRG

SEQ ID NO.43  
APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLR

SEQ ID NO.44  
APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFL

SEQ ID NO.45  
APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFL

SEQ ID NO.46  
APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSN

SEQ ID NO.47  
APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYS

SEQ ID NO.48  
APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLFVY

SEQ ID NO.49  
APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLFV

SEQ ID NO.50  
APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLF

SEQ ID NO.51  
APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLF

SEQ ID NO.52  
APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKL

SEQ ID NO.53  
APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRK

SEQ ID NO.54  
APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFR

SEQ ID NO.55  
APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTF

SEQ ID NO.56  
APPRLICDSRVLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLGAQKEAISPDAASAAPLRTITADT

SEQ ID NO.57

# ES 2 647 762 T3

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITV PDKVNFYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITAD

SEQ ID NO.58

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITV PDKVNFYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITA

SEQ ID NO.59

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITV PDKVNFYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTIT

SEQ ID NO.60

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITV PDKVNFYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTI

SEQ ID NO.61

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITV PDKVNFYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRT

SEQ ID NO.62

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITV PDKVNFYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLR

SEQ ID NO.63

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITV PDKVNFYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPL

SEQ ID NO.64

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITV PDKVNFYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAP

SEQ ID NO.65

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITV PDKVNFYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAA

SEQ ID NO.66

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITV PDKVNFYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASA

SEQ ID NO.67

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITV PDKVNFYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAAS

SEQ ID NO.68

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITV PDKVNFYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAA

SEQ ID NO.69

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITV PDKVNFYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDA

SEQ ID NO.70

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITV PDKVNFYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPD

SEQ ID NO.71

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITV PDKVNFYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP

SEQ ID NO.72

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITV PDKVNFYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP

# ES 2 647 762 T3

SEQ ID NO.73

APPRICDSRVLERYLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLGAQKEAIS

SEQ ID NO.74

APPRICDSRVLERYLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLGAQKEAI

SEQ ID NO.75

APPRICDSRVLERYLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLGAQKEA

SEQ ID NO.76

APPRICDSRVLERYLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLGAQKE

SEQ ID NO.77

APPRICDSRVLERYLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLGAQK

SEQ ID NO.78

APPRICDSRVLERYLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLGAQ

SEQ ID NO.79

APPRICDSRVLERYLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLGA

SEQ ID NO.80

APPRICDSRVLERYLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLG

SEQ ID NO.81

APPRICDSRVLERYLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRL

SEQ ID NO.82

APPRICDSRVLERYLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRA

SEQ ID NO.83

APPRICDSRVLERYLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLR

SEQ ID NO.84

APPRICDSRVLERYLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTL

SEQ ID NO.85

APPRICDSRVLERYLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTL

SEQ ID NO.86

APPRICDSRVLERYLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTT

SEQ ID NO.87

APPRICDSRVLERYLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLT

SEQ ID NO.88

ES 2 647 762 T3

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLRSL

SEQ ID NO.89

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLR S

SEQ ID NO.90

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLR

SEQ ID NO.91

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGL

SEQ ID NO.92

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSG

SEQ ID NO.93

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA V S

SEQ ID NO.94

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA V

SEQ ID NO.95

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA

SEQ ID NO.96

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DK

SEQ ID NO.97

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV D

SEQ ID NO.98

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV

SEQ ID NO.99

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLH

SEQ ID NO.100

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQL

SEQ ID NO.101

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQ

SEQ ID NO.102

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPL

SEQ ID NO.103

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEP

ES 2 647 762 T3

SEQ ID NO.104  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWE

SEQ ID NO.105  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPW

SEQ ID NO.106  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQP

SEQ ID NO.107  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQ

SEQ ID NO.108  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSS

SEQ ID NO.109  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNS

SEQ ID NO.110  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVN

SEQ ID NO.111  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLV

SEQ ID NO.112  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALL

SEQ ID NO.113  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QAL

SEQ ID NO.114  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QA

SEQ ID NO.115  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
Q

SEQ ID NO.116  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG

SEQ ID NO.117  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR

SEQ ID NO.118  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVL

SEQ ID NO.119  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAV

SEQ ID NO.120

ES 2 647 762 T3

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSEA

SEQ ID NO.121

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLSE

SEQ ID NO.122

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALLS

SEQ ID NO.123

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAVEVWQGLALL

SEQ ID NO.124

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAVEVWQGLAL

SEQ ID NO.125

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAVEVWQGLA

SEQ ID NO.126

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAVEVWQGL

SEQ ID NO.127

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAVEVWQG

SEQ ID NO.128

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAVEVWQ

SEQ ID NO.129

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAVEVW

SEQ ID NO.130

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAVEV

SEQ ID NO.131

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAVE

SEQ ID NO.132

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAV

SEQ ID NO.133

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQA

SEQ ID NO.134

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQ

SEQ ID NO.135

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQ

SEQ ID NO.136

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV G

SEQ ID NO.137

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV

SEQ ID NO.138

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRME

SEQ ID NO.139

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRM

SEQ ID NO.140

APPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKR

SEQ ID NO.141  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWK

SEQ ID NO.142  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAW

SEQ ID NO.143  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYA

SEQ ID NO.144  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFY

SEQ ID NO.145  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIF

SEQ ID NO.146  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVN

SEQ ID NO.147  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKV

SEQ ID NO.148  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTK

SEQ ID NO.149  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDT

SEQ ID NO.150  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPD

SEQ ID NO.151  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVP

SEQ ID NO.152  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITV

SEQ ID NO.153  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENIT

SEQ ID NO.154  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENI

SEQ ID NO.155  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNEN

SEQ ID NO.156  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNE

SEQ ID NO.157  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLN

SEQ ID NO.158  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSL

SEQ ID NO.159  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCS

SEQ ID NO.160  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCS

SEQ ID NO.161  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEH

SEQ ID NO.162  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAE

SEQ ID NO.163  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCA

SEQ ID NO.164  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGC

SEQ ID NO.165  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITG

SEQ ID NO.166  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITT

SEQ ID NO.167  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENIT

SEQ ID NO.168  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENI

SEQ ID NO.169  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAEN

SEQ ID NO.170  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAE

SEQ ID NO.171  
APPRLICDSRVLERYLLEAKEA

SEQ ID NO.172  
APPRLICDSRVLERYLLEAKE

SEQ ID NO.173  
APPRLICDSRVLERYLLEAK

SEQ ID NO.174  
APPRLICDSRVLERYLLEA

SEQ ID NO.175  
APPRLICDSRVLERYLLE

SEQ ID NO.176  
APPRLICDSRVLERYLL

SEQ ID NO.177  
APPRLICDSRVLERYL

SEQ ID NO.178  
APPRLICDSRVLERY

SEQ ID NO.179  
APPRLICDSRVLER

SEQ ID NO.180  
APPRLICDSRVLE

SEQ ID NO.181  
APPRLICDSRVL

SEQ ID NO.182

# ES 2 647 762 T3

APPRLICDSRV

SEQ ID NO.183  
APPRLICDSR

SEQ ID NO.184  
APPRLICDS

SEQ ID NO.185  
APPRLICD

SEQ ID NO.186  
APPRLIC

Las mutaciones de un único aminoácido (Ala/conversiones) y todas las combinaciones/permutaciones de los mismos y todas las versiones glucosiladas de las mismas. Todas las posibles combinaciones/permutaciones de mutaciones contenidas en una mutación simple de SEQ ID n.<sup>os</sup> 187 a 208 y las versiones glucosiladas de las mismas.

SEQ ID NO.187  
APPRLICASRVLEAYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.188  
APPRLICRSRVLEAYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.189  
APPRLICDSRVLEAYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.190  
APPRLICDSRVLEEYLLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.191  
APPRLICDSRVLEAYLLEAAEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.192  
APPRLICDSRVLEAYLLEAAEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.193  
APPRLICDSRVLEAYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDAKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.194  
APPRLICDSRVLEAYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTAVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.195

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTEVNFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLRSLT TLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGK LK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.196

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKANFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLRSLT TLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGK LK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.197

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVAFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLRSLT TLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGK LK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.198

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DAAVSGLRSLT TLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGK LK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.199

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLRSLT TLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGK LK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.200

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VAGLRSLT TLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGK LK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.201

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLASLT TLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGK LK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.202

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLESLT TLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGK LK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.203

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLRAL T TLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGK LK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.204

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLRSLT TLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK LFAVYSNFLRGK LK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.205

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLRSLT TLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK LFEVYSNFLRGK LK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.206

APPR LICDSRV LERYLLEAKEAENIT TGCAEHCSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHV DKA VSGLRSLT TLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK LFRVYSAFLRGK LK  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.207

APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLAGLKL  
LYTGEACRTGDR

SEQ ID NO.208

APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG  
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLEGKLL  
LYTGEACRTGDR

Regiones de interacción que solapan con los péptidos de la EPO

SEQ ID NO.209

APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITT

SEQ ID NO.210

NENITVPDTKVNIFYAWKRMEV

SEQ ID NO.211

NSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLL

SEQ ID NO.212

FRKLFRVYSNFLAGLKL

5 d) Quimeras de la EPO que actúan selectivamente sobre el NEPOR. Tales mutantes se fijan e inician/refuerzan la  
mediación de la actividad citoprotectora del NEPOR. Por ejemplo, en un contexto donde el NEPOR constituye una  
molécula de efrina A1 (bien como un homodímero o en asociación heterodimérica con el EPOR), entonces las  
proteínas quiméricas que implican fusiones de la parte del dominio de fijación al ligando efrina de EPH-B4 y parte de  
la molécula de EPO se podría desarrollar como compañeros de fijación optimizados. Esto implica fusionar una  
10 porción del extremo amino de la EPO (procedente de la SEQ ID n.º 213) a una porción del extremo carboxilo del  
dominio de fijación del ligando efrina de EPH-B4 (SEQ ID n.º 214), lo que da una secuencia similar a la SEQ ID n.º  
215, o fusionar una porción del extremo amino del dominio de fijación del ligando efrina de EPH-B4 (procedente de  
la SEQ ID n.º 214) con una porción del extremo carboxilo de la EPO (SEQ ID n.º 213), lo que da una secuencia  
similar a la SEQ ID n.º 216.

15 e) Péptidos de alta afinidad que actúan selectivamente y de forma específica sobre el NEPOR para iniciar/realzar la  
mediación de la actividad citoprotectora de la EPO.

f) Moléculas pequeñas que actúan selectivamente y realzan la actividad de los componentes vía abajo del NEPOR.

g) Politerapias que implican una o varias de las estrategias a-f.

SEQ ID n.º 213

>P01588|EPO\_HUMAN Eritropoyetina - *Homo sapiens* (humano)

20 MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHC  
SLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQL  
HVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLAGLKL  
KLYTGEACRTGDR

SEQ ID n.º 214

>dominio de fijación del ligando efrina de EPH-B4

EETLLNTKLETADLKWVTFPQVDGQWEELSGLDDEEQHSVRYEVCQVQAPGQAHWLRGTG  
WVPRRGAVHVYATLRFMTLECLSLPRAGRSCKETFTVFYYESDADTATALTPAWMENPYI  
KVDTVAAEHLTRKRPGAEATGKVNKTLRLGPLSKAGFYLAQDQGACMALLSLHLFYK  
C

SEQ ID n.º 215

>NtermEPO\_CtermEPHB4LBD

25 APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQA  
VEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAIS  
PPDAASALTPAWMENPYIKVDTVAAEHLTRKRPGAEATGKVNKTLRLGPLSKAGFYLA  
QDQGACMALLSLHLFYKCC

SEQ ID n.º 216

&gt;NtermEPHB4LBD\_CtermEPO

EETLLNNTKLETADLKWVTFPQVDGQWEELSGLDDEEQHSVRTYEVC DVQRAPGQAHWLRTG  
 WVPRRGAVHVYATLRFMTLECLSLPRAGRCKETFTVFYYESDADTATALSEAVLRGQAL  
 LVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRK  
 LFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR

Compuestos en combinación con la EPO

5 Tales compuestos, en combinación con la EPO, inhiben la actividad tirosina cinasa de EPH-B4 al mismo tiempo que permiten la señalización/hematopoyesis mediada por el EPOR. Los siguientes 101 compuestos, solos o en combinación, inhiben la actividad tirosina cinasa de los NEPOR diméricos que contienen EPH-B4. Por lo tanto, la presente descripción da a conocer una politerapia de un inhibidor de la tirosina cinasa en combinación con la EPO para dar a conocer las propiedades hematopoyéticas de la EPO además de impedir la señalización del NEPOR para bloquear el efecto secundario potencialmente mortal de la EPO al promover la supervivencia tumoral y la angiogénesis.

1: CID: 1095868, AKI-STT-00166305; ZINC00818264; BAS 09636496 IUPAC: *N*-[5-[(3-clorofenil)metil]-1,3-tiazol-2-il]-2-(4,6-dimetilpirimidín-2-il)sulfanilacetamida. MM: 404,93678 | FM: C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S. (MM es la masa molecular y FM es la fórmula molecular).

15 2: CID: 1465558, IUPAC: 2-[(3-clorobenzoil)amino]-4-metil-*N*-piridín-3-il-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 372,82872 | FM: C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S.

3: CID: 1468201, IUPAC: *N*-[5-[(2-clorofenil)carbamoil]-4-metil-1,3-tiazol-2-il]piridina-4-carboxamida, MM: 372,82872 | FM: C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S.

4: CID: 3062316, Dasatinib; Sprycel; BMS Dasatinib, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 488,00554 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.

20 5: CID: 3072360, 142287-40-9; Pirimido(4,5-d)pirimidín-4(1*H*)-ona, 7-metil-1-fenil-2-((3-(4-(2-tiazolil)-1-piperazínil)propil)tio)- IUPAC: 2-metil-8-fenil-7-[3-[4-(1,3-tiazol-2-il)piperazín-1-il]propilsulfanil]pirimido[6,5-d]pirimidín-5-ona, MM: 479,6209 | FM: C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.

6: CID: 5041467, STK154706; ZINC04687922, IUPAC: [2-[(2-metilfenil)amino]-1,3-tiazol-4-il]-(4-pirimidín-2-il)piperazín-1-il)metanona, MM: 380,4667 | FM: C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S.

25 7: CID: 9822929, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[(6-imidazol-1-ilpiridazín-3-il)amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 411,869 | FM: C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.

8: CID: 9927718, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-(ciclopropanocarbonilamino)-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 335,809 | FM: C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S.

30 9: CID: 10006113, IUPAC: hidrocloreuro de *N*-[4-cloro-2-[(5-cloropiridín-2-il)carbamoil]fenil]-5-metil-6,7-dihidro-4*H*-[1,3]tiazolo[5,4-*c*]piridina-2-carboxamida, MM: 498,81322 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.

10: CID: 10006114, IUPAC: *N*-[4-cloro-2-[(5-cloropiridín-2-il)carbamoil]fenil]-5-metil-6,7-dihidro-4*H*-[1,3]tiazolo[5,4-*c*]piridina-2-carboxamida, MM: 462,35228 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.

11: CID: 10052635, IUPAC: 2-[[2-metil-5-[[6-[(4-metilpiperazín-1-il)metil]piridín-2-il]amino]fenil]amino]-*N*-(2-metilfenil)-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 527,68362 | FM: C<sub>29</sub>H<sub>33</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.

35 12: CID: 10195898, IUPAC: *N*-[(4-clorofenil)metil]-2-[[[(2*S*)-2-hidroxi-2-pirimidín-2-iletil]metilamino]metil]-4-metil-7-oxotieno[2,3-*e*]piridina-6-carboxamida, MM: 497,99706 | FM: C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S.

13: CID: 10206276, IUPAC: *N*-[4-[(5-cloropiridín-2-il)carbamoil]-2-fenil-1,3-tiazol-5-il]-1-propán-2-ilpiperidina-4-carboxamida, MM: 484,01354 | FM: C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.

40 14: CID: 10252208, IUPAC: 2-[4-(5-amino-1,3-tiazol-2-il)fenil]-3-(5-cloropiridín-2-il)quinazolín-4-ona, MM: 431,89746 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.

15: CID: 10253695, IUPAC: 2-[4-[3-(5-cloropiridín-2-il)-4-oxoquinazolín-2-il]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 459,90756 | FM: C<sub>23</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.

16: CID: 10301604, IUPAC: *N*-[4-[(5-cloropiridín-2-il)carbamoil]-2-(3,4-difluorofenil)-1,3-tiazol-5-il]-1-propán-2-ilpiperidina-4-carboxamida, MM: 519,994466 | FM: C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.

- 17: CID: 10344807, IUPAC: *N*-[2-[4-[3-(5-cloropiridín-2-il)-4-oxoquinazolín-2-il]fenil]-1,3-tiazol-4-il]acetamida, MM: 473,93414 | FM: C<sub>24</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 18: CID: 10368624, IUPAC: *N*-[(4-clorofenil)metil]-2-[[2-hidroxi-2-pirimidín-2-iletíl]metilamino]metil]-7-metil-4-oxotieno[3,2-*e*]piridina-5-carboxamida, MM: 497,99706 | FM: C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S.
- 5 19: CID: 10370949, IUPAC: (3*Z*)-4-[[2*S*]-2-(3-clorofenil)-2-hidroxietyl]amino]-3-[6-metil-2-[4-(1,3-tiazol-2-ilmetil)piperazín-1-il]-7,9-dihidropurín-8-ilideno]piridín-2-ona, MM: 578,08832 | FM: C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>9</sub>O<sub>2</sub>S.
- 20: CID: 10412586, IUPAC: *N*-[2-[4-[3-(5-cloropiridín-2-il)-4-oxoquinazolín-2-il]fenil]-1,3-tiazol-5-il]acetamida, MM: 473,93414 | FM: C<sub>24</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 10 21: CID: 10413555, IUPAC: *N*-[(4-clorofenil)metil]-2-[[2*R*]-2-hidroxi-2-pirimidín-2-iletíl]metilamino]metil]-7-metil-4-oxotieno[3,2-*e*]piridina-5-carboxamida, MM: 497,99706 | FM: C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S.
- 22: CID: 10456156, IUPAC: 4-[(3-clorotiofén-2-il)metilamino]-2-[(4-morfolín-4-ilfenil)amino]pirimidina-5-carboxamida, MM: 444,93774 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S.
- 23: CID: 10458706, IUPAC: *N*-[5-[2-[(4-clorofenil)amino]pirimidín-4-il]-4-metil-1,3-tiazol-2-il]-3-(2-morfolín-4-iletíl)amino]propanamida, MM: 502,03212 | FM: C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 15 24: CID: 11153014, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[(2,6-dimetilpirimidín-4-il)amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 373,85984 | FM: C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 25: CID: 11167695, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[2-metil-6-(2-morfolín-4-iletíl)amino]pirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 488,00554 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 20 26: CID: 11168231, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[(6-cloro-2-metilpirimidín-4-il)amino]-*N*-[(4-metoxifenil)metil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 514,42684 | FM: C<sub>24</sub>H<sub>21</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 27: CID: 11200510, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(2-hidroxietyl)amino]piridín-2-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 403,88582 | FM: C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 28: CID: 11247793, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(metil-(3-metilaminopropil)amino)piridín-2-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 444,9808 | FM: C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>6</sub>OS.
- 25 29: CID: 11260009, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(hidroximetil)piperidín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 472,9909 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S.
- 30: CID: 11269410, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[(6-cloro-2-metilpirimidín-4-il)amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 394,27832 | FM: C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>OS.
- 30 31: CID: 11282881, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(2-morfolín-4-iletíl)amino]pirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 473,97896 | FM: C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 32: CID: 11283174, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(3-morfolín-4-ilpropilamino)piridín-2-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 487,01748 | FM: C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S.
- 33: CID: 11328827, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(3-imidazol-1-ilpropilamino)piridín-2-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 467,97438 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>7</sub>OS.
- 35 34: CID: 11407465, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-(2-hidroxietyl)amino]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 418,90046 | FM: C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S.
- 35: CID: 11466196, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[2-metil-6-(3-morfolín-4-ilpropilamino)pirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida. MM: 502,03212 | FM: C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 40 36: CID: 11466607, IUPAC: hidrocloruro de *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 524,46648 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 37: CID: 11487256, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[(6-morfolín-4-ilpirimidín-4-il)amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 430,91116 | FM: C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S.
- 38: CID: 11505502, IUPAC: 2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]pirimidín-4-il]amino]-*N*-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoíl]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida. MM: 626,65257 | FM: C<sub>29</sub>H<sub>29</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>3</sub>S.
- 45 39: CID: 11512538, IUPAC: 2,2-dimetilpropanoato de 2-[4-[6-[[5-[(2-cloro-6-metilfenil)carbamoíl]-1,3-tiazol-2-il]amino]-2-metilpirimidín-4-il]piperazín-1-il]etilo, MM: 572,12196 | FM: C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.

- 40: CID: 11539665, IUPAC: (3-cloro-2-fluorofenil)-[4-[[6-[5-fluoro-1,3-tiazol-2-il]amino]piridín-2-il]metil]piperazín-1-il]metanona, MM: 449,904626 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>.
- 41: CID: 11540687, IUPAC: hidrato de *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 506,02082 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.
- 5 42: CID: 11569328, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[3-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-5-metilfenil]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 486,02942 | FM: C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 43: CID: 11570976, IUPAC: 2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-*N*-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)fenil]carbamoil]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 640,67915 | FM: C<sub>30</sub>H<sub>31</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>3</sub>S.
- 10 44: CID: 11577776, IUPAC: 2-[[6-(2-hidroxietyl)amino]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-*N*-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 571,57407 | FM: C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.
- 45: CID: 11590089, IUPAC: (3-cloro-2-fluorofenil)-[4-[5-metil-6-(1,3-tiazol-2-il)amino]piridín-2-il]piperazín-1-il]metanona, MM: 431,914163 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>ClFN<sub>5</sub>O<sub>5</sub>.
- 46: CID: 11606973, IUPAC: *N*-[5-[[3-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-5-(trifluorometil)benzoil]amino]-2-metilfenil]-2-(piridín-2-il)amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 625,66451 | FM: C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.
- 15 47: CID: 11650098, IUPAC: 2-[[6-(4-metilpiperazín-1-il)pirimidín-4-il]amino]-*N*-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 596,62659 | FM: C<sub>28</sub>H<sub>27</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>S.
- 48: CID: 11650132, IUPAC: *N*-[5-[[2-cloro-6-metilfenil]carbamoil]-1,3-tiazol-2-il]-*N*-[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]carbamoil]de pentilo, MM: 602,14794 | FM: C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>4</sub>S.
- 20 49: CID: 11650511, IUPAC: *N*-[5-[[3-(4-etyl)piperazín-1-il]-5-(trifluorometil)benzoil]amino]-2-metilfenil]-2-[[6-(2-hidroxietyl)amino]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 683,74695 | FM: C<sub>32</sub>H<sub>36</sub>F<sub>3</sub>N<sub>9</sub>O<sub>3</sub>S.
- 50: CID: 11664355, IUPAC: 2-[[2-metil-6-morfolín-4-il]pirimidín-4-il]amino]-*N*-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 597,61135 | FM: C<sub>28</sub>H<sub>26</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.
- 51: CID: 11664511, IUPAC: 2-[[4-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]piridín-2-il]amino]-*N*-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 625,66451 | FM: C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.
- 25 52: CID: 11669430, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[(2-metil-6-piperazín-1-il)pirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 443,95298 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>5</sub>.
- 53: CID: 11676373, IUPAC: (3-cloro-2-fluorofenil)-[4-[[6-(1,3-tiazol-2-il)amino]piridín-2-il]metil]piperazín-1-il]metanona, MM: 431,914163 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>ClFN<sub>5</sub>O<sub>5</sub>.
- 30 54: CID: 11684148, IUPAC: (3-cloro-2-fluorofenil)-[4-[[6-[[5-cloro-1,3-tiazol-2-il]amino]piridín-2-il]metil]piperazín-1-il]metanona, MM: 466,359223 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>5</sub>.
- 55: CID: 11700117, IUPAC: 2-[[6-(4-etyl)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-*N*-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 624,67975 | FM: C<sub>30</sub>H<sub>31</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>S.
- 56: CID: 11707091, IUPAC: 2-[[2-metil-6-(4-metilpiperazín-1-il)pirimidín-4-il]amino]-*N*-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 610,65317 | FM: C<sub>29</sub>H<sub>29</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>S.
- 35 57: CID: 11714286, IUPAC: 2-[[5-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]piridín-2-il]amino]-*N*-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 625,66451 | FM: C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.
- 58: CID: 11714353, IUPAC: 2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-*N*-[2-metil-5-[[3-(trifluorometil)benzoil]amino]fenil]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 640,67915 | FM: C<sub>30</sub>H<sub>31</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>3</sub>S.
- 40 59: CID: 11752136, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[5-[4-(2-hidroxietyl)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 488,00554 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 60: CID: 11772766, IUPAC: 4-[2-(3-clorofenil)etyl)amino]-2-piridín-4-il]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 358,8452 | FM: C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>5</sub>.
- 61: CID: 11775143, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[2-metil-6-morfolín-4-il]pirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 444,93774 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S.
- 45 62: CID: 11854012, IUPAC: ácido 2-[4-[6-[[5-[[2-cloro-6-metilfenil]carbamoil]-1,3-tiazol-2-il]amino]-2-metilpirimidín-4-il]piperazín-1-il]acético, MM: 501,98906 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.

- 63: CID: 11854269, IUPAC: hidrógenosulfato de 2-[4-[6-[[5-[(2-cloro-6-metilfenil)carbamoil]-1,3-tiazol-2-il]amino]-2-metilpirimidin-4-il]piperazin-1-il]etilato, MM: 568,06874 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>.
- 64: CID: 11854270, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[2-(2-hidroxi-etilamino)etilamino]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 461,96826 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 5 65: CID: 11854271, IUPAC: 2-[[6-(2-aminoetilamino)-2-metilpirimidin-4-il]amino]-*N*-(2-cloro-6-metilfenil)-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 417,9157 | FM: C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>5</sub>S.
- 66: CID: 11854272, IUPAC: ácido 2-[[2-[4-[6-[[5-[(2-cloro-6-metilfenil)carbamoil]-1,3-tiazol-2-il]amino]-2-metilpirimidin-4-il]piperazin-1-il]acetil]amino]etanosulfónico, MM: 609,12066 | FM: C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>.
- 67: CID: 11854533, IUPAC: *N*-(2-cloro-4-hidroxi-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 504,00494 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.
- 10 68: CID: 11854534, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-(hidroximetil)fenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 504,00494 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.
- 69: CID: 11854535, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-4-oxidopiperazin-4-io-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 504,00494 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.
- 15 70: CID: 11854536, IUPAC: ácido 2-[4-[6-[[5-[(2-cloro-6-metilfenil)carbamoil]-1,3-tiazol-2-il]amino]-2-metilpirimidin-4-il]-1-oxidopiperazin-1-io-1-il]acético, MM: 517,98846 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>4</sub>S.
- 71: CID: 11949914, IUPAC: 4-[[2-(5-cloro-2-fluorofenil)-5-dimetilaminopirimidin-4-il]amino]-*N*-[2-(2-hidroxi-etilamino)etil]piridina-3-carboxamida, MM: 473,931003 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>ClFN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>.
- 72: CID: 11951866, IUPAC: 4-[[2-(5-cloro-2-fluorofenil)-5-pirrolidin-1-ilpirimidin-4-il]amino]-*N*-(2-hidroxi-etil)piridina-3-carboxamida, MM: 456,900483 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>ClFN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>.
- 20 73: CID: 11952045, IUPAC: 4-[[2-(5-cloro-2-fluorofenil)-5-pirrolidin-1-ilpirimidin-4-il]amino]-*N*-[(2*S*)-2-hidroxi-propil]piridina-3-carboxamida, MM: 470,927063 | FM: C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>ClFN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>.
- 74: CID: 15979866, IUPAC: 5-[2-[[4-(4-acetilpiperazin-1-il)piridin-2-il]amino]-1,3-tiazol-5-il]-*N*-metilpiridina-3-carboxamida, MM: 437,51802 | FM: C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 25 75: CID: 15980109, IUPAC: *N*-(2-aminoetil)-5-[2-[(4-morfolin-4-ilpiridin-2-il)amino]-1,3-tiazol-5-il]piridina-3-carboxamida, MM: 425,50732 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 76: CID: 15980233, IUPAC: *N*-(2-hidroxi-etil)-5-[2-[(4-morfolin-4-ilpiridin-2-il)amino]-1,3-tiazol-5-il]piridina-3-carboxamida, MM: 426,49208 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S.
- 30 77: CID: 15980347, IUPAC: *N*-(2-metilaminoetil)-5-[2-[(4-morfolin-4-ilpiridin-2-il)amino]-1,3-tiazol-5-il]piridina-3-carboxamida, MM: 439,5339 | FM: C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 78: CID: 15980351, IUPAC: 5-[2-[[4-[4-(2-hidroxiacetil)piperazin-1-il]piridin-2-il]amino]-1,3-tiazol-5-il]-*N*-(2,2,2-trifluoroetil)piridina-3-carboxamida, MM: 521,51539 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S.
- 79: CID: 15982537, IUPAC: (3-cloro-2-fluorofenil)-[4-[6-[[5-fluoro-1,3-tiazol-2-il]amino]-5-metilpiridin-2-il]piperazin-1-il]metanona, MM: 449,904626 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S.
- 35 80: CID: 16034848, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido 2,3-dihidroxi-butanodioico, MM: 638,09238 | FM: C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>8</sub>S.
- 81: CID: 16037977, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]-5-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 488,00554 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 82: CID: 16061431, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; 4-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-*N*-[4-metil-3-[(4-piridin-3-ilpirimidin-2-il)amino]fenil]benzamida, MM: 981,60828 | FM: C<sub>51</sub>H<sub>57</sub>ClN<sub>14</sub>O<sub>3</sub>S.
- 40 83: CID: 16223227, IUPAC: ácido but-2-enodioico; *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 604,0777 | FM: C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>6</sub>S.
- 84: CID: 16223228, IUPAC: hidrobromuro de *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 568,91748 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>BrClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 45 85: CID: 16223229, IUPAC: ácido but-2-enodioico; *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 604,0777 | FM: C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>6</sub>S.

## ES 2 647 762 T3

- 86: CID: 16223316, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido metanosulfónico, MM: 584,1112 | FM: C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>.
- 87: CID: 16223317, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido fosfórico, MM: 586,000721 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>6</sub>PS.
- 5 88: CID: 16223318, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido 2-hidroxibenzoico, MM: 626,12628 | FM: C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>5</sub>S.
- 89: CID: 16223319, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido sulfúrico, MM: 586,08402 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>.
- 90: CID: 16223320, IUPAC: *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida; ácido 4-metilbencenosulfónico, MM: 660,20716 | FM: C<sub>29</sub>H<sub>34</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>.
- 10 91: CID: 16584134, AKE-PB223730486, IUPAC: *N*-(4-clorofenil)-2-[(4,5-dimetil-1,3-tiazol-2-il)amino]-4-metilpirimidina-5-carboxamida, MM: 373,85984 | FM: C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>5</sub>OS.
- 92: CID: 16584137, AKE-PB223730492, IUPAC: *N*-(3-clorofenil)-2-[(4,5-dimetil-1,3-tiazol-2-il)amino]-4-metilpirimidina-5-carboxamida, MM: 373,85984 | FM: C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>5</sub>OS.
- 15 93: CID: 16584139, AKE-PB223730496, IUPAC: 2-[(4,5-dimetil-1,3-tiazol-2-il)amino]-4-metil-*N*-(2-metilfenil)pirimidina-5-carboxamida, MM: 353,44136 | FM: C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S.
- 94: CID: 16655683, IUPAC: 2-[(6-cloro-2-metilpirimidín-4-il)amino]-*N*-(2,6-diclorofenil)-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 414,6968 | FM: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S.
- 95: CID: 16655839, IUPAC: *N*-(2,6-diclorofenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazín-1-il]-2-metilpirimidín-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida, MM: 508,42402 | FM: C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S.
- 20 96: CID: 16660745, IUPAC: *N*-(4-fluorofenil)-4-(2-hidroxi-etilamino)-6-metilsulfanil-2-piridín-4-ilpirimidina-5-carboxamida, MM: 399,441923 | FM: C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 97: CID: 16660747, IUPAC: *N*-(4-etilfenil)-4-(2-hidroxi-etilamino)-6-metilsulfanil-2-piridín-4-ilpirimidina-5-carboxamida, MM: 409,50462 | FM: C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 25 98: CID: 16660907, IUPAC: 4-(2-hidroxi-etilamino)-*N*-(4-metilfenil)-6-metilsulfanil-2-piridín-4-ilpirimidina-5-carboxamida, MM: 395,47804 | FM: C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 99: CID: 16661063, IUPAC: *N*-(4-clorofenil)-4-(2-hidroxi-etilamino)-6-metilsulfanil-2-piridín-4-ilpirimidina-5-carboxamida, MM: 415,89652 | FM: C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 30 100: CID: 16661212, IUPAC: *N*-(2,4-dimetilfenil)-4-(2-hidroxi-etilamino)-6-metilsulfanil-2-piridín-4-ilpirimidina-5-carboxamida, MM: 409,50462 | FM: C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 101: CID: 16661214, IUPAC: 4-(1-hidroxi-bután-2-ilamino)-*N*-(4-metilfenil)-6-metilsulfanil-2-piridín-4-ilpirimidina-5-carboxamida, MM: 423,5312 | FM: C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.
- 102: 1: CID: 644241 Nilotinib; Tassigna; nilotinibum ... IUPAC: 4-metil-*N*-[3-(4-metilimidazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil]-3-[(4-piridín-3-ilpirimidín-2-il)amino]benzamida. MM: 529,515790 g/mol | FM: C<sub>28</sub>H<sub>22</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O.
- 35 103: CID: 16757572 Tassigna; AMN-107; hidrocloreuro de nilotinib, monohidrato IUPAC: hidrocloreuro de hidrato de 4-metil-*N*-[3-(4-metilimidazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil]-3-[(4-piridín-3-ilpirimidín-2-il)amino]benzamida. MM: 583,992010 g/mol | FM: C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>.

Otros ejemplos incluyen:

Fármaco	Estado de desarrollo	Compañía	Tipo
CGI-879	Descubrimiento	CGI Pharmaceuticals	Molécula pequeña
Derivados de la xantina	Descubrimiento	Universidad de Zurich	Molécula pequeña
Ureas diarílicas de imidazo[1,2-a]pirazina	Descubrimiento	CGI Therapeutics	Molécula pequeña

40 NEPOR: Valor pronóstico y terapéutico combinado en el tratamiento contra el cáncer

Sin comprometerse con la teoría, la observación de que los pacientes tratados con la EPO a menudo tienen peores

5 resultados de supervivencia (al menos en algunos cánceres) significa que el tratamiento de estos pacientes con una terapia que actúa selectivamente sobre el NEPOR proporciona una estrategia farmacogenética para el tratamiento antineoplásico dirigido, siempre y cuando se pueda valorar la expresión del NEPOR en el tejido tumoral. Tal perspectiva terapéutica cambia el equilibrio a favor de realizar biopsias en todas las circunstancias idóneas, lo que significa para cánceres en los que típicamente se expresan EPOR, EPH-B4 y/o efrina A1.

La presente descripción da a conocer además un método para tomar imágenes del tejido tumoral con capacidad de mejorar la supervivencia en respuesta al tratamiento con la EPO, que comprende administrar un anticuerpo anti-NEPOR o péptido de fijación al NEPOR unido a un radioligando o a otro radiotrazador, y medir la distribución y localización tisular del radioligando o del otro radiotrazador.

10 Si un tumor da positivo para el NEPOR, entonces la EPO está contraindicada y se le administra una terapia que actúa selectivamente sobre el NEPOR. Si el NEPOR no está presente, entonces se administrará con seguridad la EPO. Ambos resultados beneficiarán al desenlace del paciente, independientemente de si un paciente da positivo o negativo para el NEPOR. De nuevo, esto desplaza el equilibrio a favor de la realización sistemática de biopsias.

15 En una realización, la descripción se refiere a una molécula de siRNA específica de EPH-B4 y/o efrina A1 para ser usada en el tratamiento de un paciente con cáncer que recibe o recibirá la EPO.

siRNA y oligodesoxinucleótidos antisentido de EPH-B4

Se pueden sintetizar diferentes siRNA y oligodesoxinucleótidos (ODN) antisentido modificados con fosforotioato y específicos de EphB4 de, p. ej., Qiagen. Se elige el siRNA y el ODN antisentido más activo que hace disminuir la expresión de EphB4 en la línea de células 293T transfectadas transitoriamente. El ODN antisentido que se podría utilizar es el AS-10, que abarca los nucleótidos 1980 a 1999 con una secuencia 5'-ATG GAG GCC TCG CTC AGA AA-3' (SEQ ID n.º 217). Para eliminar las respuestas de la citocina, la citosina del sitio CpG podría estar metilada (AS-10M) sin ninguna pérdida en la eficacia de silenciamiento de EphB4 (no se muestran los datos). Los ODN desordenados que contienen la secuencia de nucleótidos aleatoria y un sitio CpG similar, 5'-TAC CTG AAG GTC AGG CGA AC-3' (SEQ ID n.º 218), se podrían utilizar como control. El siRNA 465 que corresponde a las secuencias 5'-GGU GAA UGU CAA GAC GCU GUU-3' (SEQ ID n.º 219) y 3'-UUC CAC UUA CAG UUC UGC GAC-5' (SEQ ID n.º 220) se podría utilizar para la interferencia por ARN. El siRNA de control se podría generar al mutar tres bases de esta secuencia para anular con eficacia el silenciamiento de EphB4. Este siRNA mutado (siRNA $\Delta$ ) tenía las secuencias 5'-AGU UAA UAU CAA GAC GCU GUU-3' (SEQ ID n.º 221) y 3'-UUU CAA UUA UAG UUC UGC GAC-5' (SEQ ID n.º 222). Adicionalmente, el siRNA dirigido contra la proteína fluorescente verde con las secuencias 5'-CGC UGA CCC UGA AGU UCA TUU-3' (SEQ ID n.º 223) y 3'-UUG CGA CUG GGA CUU CAA GUA-5' (SEQ ID n.º 224) se podría utilizar como control negativo.

En un aspecto, uno o varios de los siguientes siRNA específicos de EPH-B4, que se describen en forma bicatenaria, se pueden administrar a un paciente para mejorar la eficacia del tratamiento con EPO.

5' - **caauagccacucuaacaccuu**-3' (SEQ ID NO: 242)  
3' - **uuguuaucggugagauugugg**-5' (SEQ ID NO: 243)

5' - **ggggcccgucccauuugaguu** -3' (SEQ ID NO: 244)  
3' - **uuccccgggcaggguaaacuc** -5' (SEQ ID NO: 245)

5' - **cugaucugaagugggugacuu** -3' (SEQ ID NO: 246)  
3' - **uugacuagacuaccccacug** -5' (SEQ ID NO: 247)

5' - **aagaccuaaugaggcuguuu** -3' (SEQ ID NO: 248)  
3' - **uuuucugggauuacuccgaca** -5' (SEQ ID NO: 249)

5' - **ucgaugucuccuacgucauu** -3' (SEQ ID NO: 250)  
3' - **uuagcuacagagggaugcaguu** -5' (SEQ ID NO: 251)

5' - **auugaagaggugauugguuu** -3' (SEQ ID NO: 252)

3' -uuuaacuucuccacuaaccac -5' (SEQ ID NO: 253)

5' - ggaguuacgggauugugauuu -3' (SEQ ID NO: 254)

3' - uuccucaaugcccuaacacua -5' (SEQ ID NO: 255)

5' - gguacuaaggucuaacaucguu -3' (SEQ ID NO: 256)

3' - uuccaugauuccagauguagc -5' (SEQ ID NO: 257)

5' - guccugacuucaccuauacuu -3' (SEQ ID NO: 258)

3' - uucaggacugaaguggauaug -5' (SEQ ID NO: 259)

5' - ugccgcgucggguacuuccuu -3' (SEQ ID NO: 260)

3' - uuacggcgagcccaugaagg -5' (SEQ ID NO: 261)

Secuencias de EphB4:

5' -GAUCUGAAGUGGGUGACAU-3' (SEQ ID NO: 274)

5' -AUGUCACCCACUUCAGAUC-3' (SEQ ID NO: 275)

5' -CCCAUUUGAGCCUGUCAAU-3' (SEQ ID NO: 276)

5' -AUUGACAGGCUCAAAUGGG-3' (SEQ ID NO: 277)

5' -GAUCUGAAGUGGGUGACAU-3' (SEQ ID NO: 278)

5' -AUGUCACCCACUUCAGAUC-3' (SEQ ID NO: 279)

5 En otros ejemplos, el siRNA se puede obtener de fuentes comerciales, tales como Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y se puede utilizar para realizar el tratamiento con la EPO. Por ejemplo, los siguientes siRNA están disponibles en el mercado por Sigma-Aldrich:

EFRINA A1

ID del siRNA	ID del gen en Entrez	nucleótido inicial aproximado
SASI_Hs01_00211016	NM_004428	247
SASI_Hs01_00211017	NM_004428	223
SASI_Hs01_00211018	NM_004428	248
SASI_Hs01_00211019	NM_004428	1071
SASI_Hs01_00211020	NM_004428	256
SASI_Hs01_00211021	NM_004428	208
SASI_Hs01_00211022	NM_004428	829
SASI_Hs01_00211023	NM_004428	1015
SASI_Hs01_00211024	NM_004428	846

SASI_Hs01_00211025	NM_004428	225
SASI_Hs01_00071683	NM_182685	248
SASI_Hs01_00071684	NM_182685	214
SASI_Hs01_00071685	NM_182685	242
SASI_Hs01_00071686	NM_182685	1000
SASI_Hs01_00071687	NM_182685	263
SASI_Hs01_00071688	NM_182685	203
SASI_Hs01_00071689	NM_182685	769
SASI_Hs01_00071690	NM_182685	948
SASI_Hs01_00071691	NM_182685	778
SASI_Hs01_00071692	NM_182685	227

EPHB4

ID del siRNA	ID del gen en Entrez	nucleótido inicial aproximado
SASI_Hs01_00039855	NM_004444	1756
SASI_Hs01_00039856	NM_004444	577
SASI_Hs01_00039857	NM_004444	1373
SASI_Hs01_00039858	NM_004444	2290
SASI_Hs01_00039859	NM_004444	2318
SASI_Hs01_00039860	NM_004444	2353
SASI_Hs01_00039861	NM_004444	2898
SASI_Hs01_00039862	NM_004444	2245
SASI_Hs01_00039863	NM_004444	1679
SASI_Hs01_00039864	NM_004444	1416

- 5 En otro aspecto, se dan a conocer métodos para reforzar la eficacia del tratamiento con EPO en un paciente, que comprende administrar a dicho paciente, junto con el tratamiento con la EPO, moléculas antisentido específicas del ARNm de EPH-B4. En una realización, la molécula antisentido es un oligonucleótido que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID n.º 217.

Anticuerpos contra el NEPOR

- 10 La presente descripción incluye varios anticuerpos que se fijan a los componentes del NEPOR. En la tabla 6 que viene a continuación se da a conocer una lista de tales anticuerpos y su disponibilidad.

Tabla 6

Compañía	Elemento	Antígeno	Núm. catálogo	Aplicación
<b>EPOR</b>				
Abcam	Anticuerpo policlonal de cabra contra el receptor de la EPO, sin conjugar	EPOR	ab10653	ELISA, W
ABR-Affinity BioReagents	Anticuerpo monoclonal de ratón contra el EPOR de humano, sin conjugar, clon 3D10	EPOR	MA-1-51823	WB, ELIS
Abnova Corporation	Anticuerpo monoclonal de ratón contra el EPOR de humano, sin conjugar, clon 3D10	EPOR	H00002057-M01	WB, Capt ELISA

ES 2 647 762 T3

<b>Compañía</b>	<b>Elemento</b>	<b>Antígeno</b>	<b>Núm. catálogo</b>	<b>Aplicación</b>
<b>EPOR</b>				
Abcam	Anticuerpo policlonal de cabra contra el receptor de la EPO de humano, sin conjugar	EPOR	ab27497	ELISA, W
Abcam	Anticuerpo monoclonal de ratón contra el receptor de la EPO de humano, sin conjugar, clon MM-0031-6G7	EPOR	ab56310	WB
ABR-Affinity BioReagents	Anticuerpo policlonal de ratón contra el EPOR de humano, sin conjugar	EPOR	PA1-51822	WB
IMGENEX	Anticuerpo policlonal de cabra contra el EPOR de humano, sin conjugar	EPOR	IMG-3771	WB, ELIS
Lifespan Bioscience	Anticuerpo policlonal de conejo contra el receptor de la eritropoyetina de humano (EPOR), sin conjugar	EPOR	LS-C6720	ELISA
GeneTex	Anticuerpo monoclonal de ratón contra el EPOR de humano, sin conjugar, clon 3D10	EPOR	GTX91710	ELISA, W
Lifespan Biosciences	Anticuerpo policlonal de conejo contra el EPOR de humano, sin conjugar	EPOR	LS-C6719-100	ELISA
Novus Biologicals	Anticuerpo policlonal de ratón contra el EPOR de humano, sin conjugar	EPOR	H00002057-A01	
Novus Biologicals	Anticuerpo monoclonal de ratón contra el EPOR de humano, sin conjugar, clon 3D10	EPOR	H00002057-M01	ELISA, W
Lifespan Biosciences	Anticuerpo policlonal de oveja contra el receptor de la eritropoyetina (EPOR) de humano, sin conjugar	EPOR	LS-C6718	ELISA, W
Lifespan Biosciences	Anticuerpo policlonal de oveja contra el receptor de la eritropoyetina (EPOR) de humano, sin conjugar	EPOR	LS-C6716	
Lifespan Biosciences	Anticuerpo policlonal de oveja contra el EPOR de humano, sin conjugar	EPOR	LS-C6717-50	ELISA
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Anticuerpo policlonal de conejo contra el EPOR (C-20) de humano, sin conjugar	EpoR (C-20)	sc-695	WB, IP, I
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Anticuerpo policlonal de conejo anti-EPOR (M-20), sin conjugar	EpoR (M-20)	sc-697	WB, IP, I
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Anticuerpo policlonal de conejo anti-EPOR, sin conjugar	EpoR	sc-5624	WB, IP, I
<b>EPH-B4</b>				
Abgent	Anticuerpo policlonal de conejo RB1659-1660 contra el extremo carboxilo de EPH-B4, sin conjugar	Extremo C de EPH-B4	AP7625a	ELISA, I
ABR-Affinity BioReagents	Anticuerpo policlonal de conejo contra el EPH-B4 de humano, sin conjugar	EPH-B4	PA1-24241	WB

ES 2 647 762 T3

<b>Compañía</b>	<b>Elemento</b>	<b>Antígeno</b>	<b>Núm. catálogo</b>	<b>Aplicación</b>
<b>EPOR</b>				
ABR-Affinity BioReagents	Anticuerpo monoclonal de ratón contra el EPH-B4 de humano, sin conjugar, clon 1D1	EPH-B4	MA1-51815	ELISA
AbD Serotec	Anticuerpo monoclonal de humano contra el EPH-B4 de humano, sin conjugar, clon 1327	EPH-B4	HCA001	IHQ WB,
AbD Serotec	Anticuerpo monoclonal de humano contra el EPH-B4 de humano, sin conjugar, clon 3934	EPH-B4	HCA025	IHQ, WB
Invitrogen	Anticuerpo monoclonal contra el receptor EPH-B4, sin conjugar, clon 3D7F8	EPH-B4	35-2900	WB, ELIS
GeneTex	Anticuerpo policlonal de conejo contra el EPH-B4, sin conjugar	EPH-B4	GTX77656	WB
Invitrogen	Anticuerpo monoclonal de ratón contra el EPH-B4, clon 3D7G8	EPH-B4	182394	IHQ(FFP
Invitrogen	Anticuerpo en paquete muestreador contra el receptor EPH	EPH-B4	901100	
GeneTex	Anticuerpo monoclonal de ratón contra el EPH-B4 de humano, sin conjugar, clon 1D1	EPH-B4	GTX91629	ELISA
Invitrogen	Anticuerpo monoclonal de ratón contra el EPH-B4 de humano, clon 3D7G8	EPH-B4	371800	WB ELISA, IHQ
Novus Biologicals	Anticuerpo monoclonal de ratón contra el EPH-B4 de humano, sin conjugar, clon 1D1	EPH-B4	H00002050-M01	
R&D Systems	Anticuerpo policlonal de cabra contra el EPH-B4 de humano, sin conjugar	EPH-B4	AF3038	FC, IHQ
Raybiotech, Inc.	Anticuerpo monoclonal de humano contra el EPH-B4 de humano (empaquetado con el anticuerpo secundario conjugado a HRP); sin conjugar	EPH-B4	DS-MB-01224	
R&D Systems	Anticuerpo monoclonal de rata contra el EPH-B4 de humano, sin conjugar, clon 395810	EPH-B4	MAB3038	FC, IHQ
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Anticuerpo policlonal de cabra contra el EPH-B4, sin conjugar	EPH-B4	sc-7284	WB, IF
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Anticuerpo policlonal de cabra contra el EPH-B4, sin conjugar	EPH-B4	sc-7285	WB, IF
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Anticuerpo policlonal de conejo contra el EPH-B4, sin conjugar	EPH-B4	sc-5536	WB, IF
Raybiotech, Inc.	Anticuerpo monoclonal de humano contra el EPH-B4 de humano (empaquetado con el anticuerpo secundario conjugado a HRP), sin conjugar	EPH-B4	DS-MB-01225	

Compañía	Elemento	Antígeno	Núm. catálogo	Aplicación
	<b>EPOR</b>			
	<b>EFNA1</b>			
Invitrogen	Anticuerpo policlonal contra la efrina A1, sin conjugar, clon ZMD.39	EFNA1	34-3300	
Novus Biologicals	Anticuerpo monoclonal de ratón contra la EFNA1 de humano, sin conjugar, clon 3C6	EFNA1	H00001942-M01	
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Anticuerpo policlonal de conejo contra la efrina A1 (V-18), sin conjugar	EFNA1 (V-18)	sc-911	WB, IF
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Anticuerpo policlonal de conejo contra la efrina A1, sin conjugar	EFNA1	sc-20719	WB, IP, IP
Abcam	Anticuerpo policlonal de conejo contra el receptor efrina A1 de humano, sin conjugar	EFNA1	ab37857	ELISA, IF
GeneTex	Anticuerpo monoclonal de ratón contra la EFNA1 de humano, sin conjugar, clon 3C7	EFNA1	GTX91614	
	<b>EFNB2</b>			
Novus Biologicals	Anticuerpo policlonal de ratón contra la EFNB2 de humano, sin conjugar	EFNB2	H00001948-A01	
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Anticuerpo policlonal de conejo contra la efrina-B2 (P-20), sin conjugar	EFNB2 (P-20)	sc-1010	WB, IF
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Anticuerpo policlonal de cabra contra la efrina B2, sin conjugar	EFNB2	sc-19227	WB, IF, I
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Anticuerpo policlonal de conejo contra la efrina B2, sin conjugar	EFNB2	sc-15397	WB, IF, I

Otras sustancias biológicas de ejemplo incluyen:

Fármaco	Estado del desarrollo	Compañía	Tipo
<b>MEDI-548</b>	Descubrimiento	VasGene/MedImmune	Sustancia biológica
<b>IDDBCP222163</b>	Descubrimiento		
<b>ONC-101</b>	Descubrimiento	ESBATech Nestle SA	Sustancia biológica

- 5 En un aspecto, se da a conocer un método para valorar la expresión de la EPH-B4 y/o la efrina A1 en el tejido tumoral, que comprende: (a) aislar una muestra de tejido de un individuo que recibe o recibirá la eritropoyetina, (b) determinar el nivel de expresión de la EPH-B4 y/o de la efrina A1, (c) correlacionar la presencia de estos productos de expresión de los genes de los componentes con una respuesta fisiológica negativa al tratamiento con la eritropoyetina. En una realización, el nivel de expresión de los genes (ARNm) de los componentes se determina mediante una técnica de biología molecular seleccionada del grupo que consiste en PCR, QPCR, R-PCR, análisis por micromatrices de la expresión génica, análisis por transferencia de tipo Northern, transcripción inversa y amplificación, zimografía, reacción en cadena de la ligasa, NASBA, ensayo de protección de la ARNasa (RPA), electroforesis capilar con fluorescencia inducida con láser (CE-LIF). En otra, el individuo es un paciente con cáncer que se ha de tratar con eritropoyetina o que se está tratando con eritropoyetina. En un ejemplo, la presencia de productos de expresión génica de la EPH-B4 y/o de la efrina A1 es indicativa de un mal control tumoral locorregional
- 10

- y de una peor supervivencia del paciente tras el tratamiento con la eritropoyetina. En otra, la presencia de un nivel más alto de productos de expresión génica de la EPH-B4 y/o de la efrina A1 es indicativa de un mal control tumoral locorregional y de una peor supervivencia del paciente tras el tratamiento con la eritropoyetina. En algunas realizaciones, los medios para analizar la presencia de los productos de expresión génica son una matriz de proteínas o la fijación a un instrumento de microequilibrio de masas. En otras, la determinación de la presencia de los productos génicos de la EPH-B4 y/o de la efrina A1 se hace mediante la detección de las proteínas correspondientes con un procedimiento de inmunoensayo, en donde el procedimiento de inmunoensayo se selecciona del grupo de inmunoprecipitación, inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA) o fluoroinmunoensayo, un ensayo quimioluminiscente, un ensayo de aglutinación, inmunonefelometría, inmunoturbidimetría, una transferencia de tipo Western, un inmunoensayo competitivo, un inmunoensayo no competitivo, un inmunoensayo homogéneo, un inmunoensayo heterogéneo, un bioensayo y un ensayo con indicador. En un ejemplo, el inmunoensayo es un ELISA. En otra realización, la muestra de tejido se podría seleccionar del tejido canceroso o de las células en circulación procedentes del mismo o de un grupo de tejidos y líquidos biológicos, tales como sangre, linfa, orina, líquido cefalorraquídeo.
- En otro aspecto, se da a conocer un método pronóstico para clasificar a los pacientes que tienen un tumor como idóneo (EPH-B4 y/o efrina A1) o no idóneo (EPH-B4 y/o efrina A1) para el tratamiento con la EPO, que comprende: (a) aislar una muestra de tejido de un individuo que recibe o que recibirá eritropoyetina; (b) determinar el nivel de expresión del gen o de los genes de los componentes EPH-B4 y/o efrina A1, un EPH-B4 y/o efrina A1 del tejido aislado; y (c) correlacionar la presencia de los productos de expresión de los genes del componente EPH-B4 y/o efrina A1 con una respuesta fisiológica negativa al tratamiento con eritropoyetina. En una realización, el nivel de expresión de los genes del componente EPH-B4 y/o efrina A1 se determina mediante una técnica de biología molecular seleccionada del grupo que consiste en PCR, QPCR, R-PCR, análisis de la expresión génica con micromatrices, análisis por transferencia de tipo Northern, transcripción inversa y amplificación, zimografía, reacción en cadena de la ligasa, NASBA, ensayo de protección de la ARNasa (RPA), electroforesis capilar con fluorescencia inducida con láser (CE-LIF). En otra, la determinación de la presencia de los productos génicos de EPH-B4 y/o efrina A1 se realiza mediante la detección de la proteína correspondiente con un procedimiento de inmunoensayo, donde el procedimiento de inmunoensayo se selecciona del grupo de ELISA, inmunoprecipitación, inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA) o fluoroinmunoensayo, un ensayo quimioluminiscente, un ensayo de aglutinación, inmunonefelometría, inmunoturbidimetría, una transferencia de tipo Western, un inmunoensayo competitivo, un inmunoensayo no competitivo, un inmunoensayo homogéneo, un inmunoensayo heterogéneo, un bioensayo y un ensayo con indicador, tal como un ensayo con luciferasa. La muestra de tejido se puede seleccionar del tejido canceroso o de las células en circulación procedentes del mismo o de un grupo de tejidos y líquidos biológicos, tales como sangre, linfa, orina, líquido cefalorraquídeo.
- En otro aspecto, se da a conocer un método para tomar imágenes del tejido tumoral que es capaz de reforzar la supervivencia en respuesta al tratamiento con la EPO, que comprende administrar un anticuerpo anti-EPH-B4 y/o antiefrina A1 o péptido de fijación a EPH-B4 y/o efrina A1 unido a un radioligando o a otro radiotrazador, y medir la distribución de tejidos y la localización del radioligando o del otro radiotrazador. En una realización, el anticuerpo anti-EPH-B4 y/o antiefrina A1 es un anticuerpo monoclonal o policlonal seleccionado del grupo de anticuerpos recogidos en la tabla 6.
- En otro aspecto, se da a conocer un método para diseñar un compuesto que interfiere con la actividad que promueve la supervivencia gracias al NEPOR, que comprende: (a) dar a conocer la estructura molecular de las especies de NEPOR y dar a conocer las secuencias aminoacídicas de los polipéptidos que componen el NEPOR; (b) utilizar el programa informático que comprende el ordenador digital para diseñar un compuesto químico/construcción proteica que se predice que se fijará al NEPOR; y
- (c) opcionalmente, diseñar construcciones proteicas que imitan el NEPOR en su estado dimerizado/multimérico (p. ej., construcciones con Fc).
- También se da a conocer un método para identificar los compuestos que modulan la actividad de señalización protectora de tejido del NEPOR, que comprende (a) poner en contacto un compuesto problema con el complejo receptor NEPOR; (b) medir el nivel de actividad protectora de tejido iniciada por la activación del NEPOR; (c) identificar un compuesto problema que incrementa o atenúa el nivel de actividad del complejo NEPOR protector de tejido; (d) ensayar la actividad protectora de tejido mediada por el NEPOR que tienen los fármacos identificados; y (e) ensayar la actividad inhibidora del NEPOR que tienen los fármacos identificados. En una realización, la actividad del complejo receptor NEPOR protector de tejido se mide con la medición de la fijación del compuesto problema al complejo receptor NEPOR. En otra, el compuesto problema está marcado y la fijación del compuesto problema al complejo receptor NEPOR protector de tejido se mide por la detección del marcador unido al compuesto problema. La actividad del complejo receptor NEPOR protector de tejido se puede medir con la medición de la fijación del compuesto problema al complejo receptor NEPOR protector de tejido.
- En otro aspecto, se da a conocer un método para identificar los compuestos que modulan la actividad de señalización protectora de tejido que tiene el NEPOR, que comprende (a) poner en contacto un compuesto problema con la célula que expresa el complejo receptor NEPOR protector de tejido; (b) medir el nivel de actividad protectora

de tejido iniciada por la activación del NEPOR en la célula; (c) identificar un compuesto problema que incrementa o disminuye el nivel de la actividad del complejo NEPOR protector de tejido en una célula; (d) ensayar la actividad protectora de tejido a través del NEPOR que presentan los compuestos identificados; y (e) ensayar la actividad inhibitora del NEPOR que presentan los fármacos identificados. En una realización, el ensayo de la etapa (d) es una actividad del complejo receptor NEPOR protector de tejido y se mide mediante un ensayo de proliferación/diferenciación celular. En un ejemplo, las células del ensayo de proliferación/diferenciación celular se manipulan por recombinación para que expresen EPH-B4 y/o EPOR y/o efrina A1. En otra, las células expresan en su interior un receptor de EPO y están transformadas con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que (i) está unida operativamente a un promotor y (ii) codifica la EPH-B4 o bien la efrina A1. En otro ejemplo, las células expresan en su interior la EPH-B4 y/o la efrina A1, y están transformadas con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que (i) está operativamente unida a un promotor y (ii) codifica un polipéptido del receptor de la EPO.

En un aspecto, se da a conocer un método para identificar un compuesto que modula la interacción entre un complejo receptor NEPOR protector de tejido y un ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido, que comprende: (a) poner en contacto un complejo receptor NEPOR protector de tejido con uno o varios compuestos problema; y (b) medir la actividad del complejo receptor NEPOR protector de tejido, gracias lo cual si la actividad medida en (b) difiere de la actividad del complejo receptor NEPOR protector de tejido en ausencia de uno o varios compuestos problema, entonces se identifica un compuesto que modula la interacción entre el complejo receptor NEPOR protector de tejido y el ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido. En una realización, la actividad del complejo receptor NEPOR protector de tejido se mide mediante la proliferación o diferenciación celular. En otra, la actividad del complejo receptor NEPOR protector de tejido medida es la capacidad que tiene el complejo receptor NEPOR protector de tejido para interactuar con un ligando del complejo del receptor de NEPOR protector de tejido. En otra, la etapa de ensayar la actividad protectora de tejido que tiene en el compuesto identificado comprende detectar la presencia de nucleolina en la célula. En algunas realizaciones, la etapa de ensayar la actividad protectora de tejido que tiene el compuesto identificado comprende detectar o medir un incremento del nivel de actividad de neuroglobina o citoglobina en una célula. En otras, el complejo receptor NEPOR protector de tejido está en solución. En otra, el complejo receptor NEPOR protector de tejido está en una célula. En algunos aspectos, el compuesto inhibe la fijación de un ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido a un complejo receptor NEPOR protector de tejido, mientras que, en otros, el compuesto refuerza la fijación de un ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido a un complejo receptor NEPOR protector de tejido. El complejo receptor NEPOR protector de tejido puesto en contacto en la etapa (a) puede estar sobre una superficie celular o sobre una membrana celular aislada. En algunas realizaciones, la actividad del complejo receptor NEPOR protector de tejido se compara con la activación del receptor EPOR para identificar los compuestos específicos de NEPOR. En algunas realizaciones, el complejo receptor NEPOR protector de tejido está inmovilizado en una superficie sólida. En un ejemplo, la superficie sólida es una placa de microtitulación y en otra es un chip.

En otro aspecto, se da a conocer un método para identificar un compuesto que se fija a un complejo receptor NEPOR protector de tejido, que comprende: (a) poner en contacto un compuesto problema con un fragmento del complejo receptor NEPOR protector de tejido que se fija al ligando que comprende al menos un dominio extracelular del receptor de la EPO o del receptor EPH-B4 o del receptor efrina A1 y al menos un dominio extracelular del receptor de la EPO o del receptor EPH-B4 o del receptor efrina A1, el cual está fusionado a un fragmento Fc unido a un soporte sólido; y (b) poner en contacto un compuesto problema con un fragmento del complejo receptor EPOR que se fija al ligando, que comprende al menos dos dominios extracelulares del receptor de la EPO fusionados a un fragmento Fc unido a un soporte sólido; (c) retirar los compuestos problema sin fijar desde los soportes sólidos; (d) identificar el compuesto fijado al fragmento del complejo receptor NEPOR protector de tejido, pero no al complejo receptor EPOR (y viceversa), gracias a lo cual un compuesto que se fija al soporte sólido se identifica como un compuesto que se fija específicamente a un complejo receptor NEPOR protector de tejido o un compuesto que se fija específicamente a un complejo receptor EPOR.

En otro aspecto, se da a conocer un método para identificar un compuesto que se fija a un complejo receptor NEPOR protector de tejido, que comprende: (a) poner en contacto un compuesto problema con un fragmento del complejo receptor NEPOR protector de tejido que se fija al ligando y que comprende al menos un dominio extracelular del receptor de EPO o del receptor EPH-B4 o del receptor efrina A1, el cual está fusionado a un fragmento Fc unido a un soporte sólido; (b) retirar los compuestos problema sin fijar desde los soportes sólidos; (c) identificar el compuesto unido al fragmento del complejo receptor NEPOR protector de tejido, gracias a lo cual se identifica un compuesto fijado al soporte sólido como un compuesto que se fija específicamente a un complejo receptor NEPOR protector de tejido.

En otro aspecto, se da a conocer un método para identificar un compuesto que se fija a un complejo receptor NEPOR protector de tejido, que comprende: (a) poner en contacto un fragmento del complejo receptor NEPOR protector de tejido que comprende al menos un dominio extracelular del receptor de la EPO o del receptor EPH-B4 o del receptor efrina A1 y al menos un dominio extracelular del receptor de la EPO o del receptor EPH-B4 o del receptor efrina A1, el cual está fusionado a un fragmento de Fc unido a un soporte sólido con (i) un ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido unido a un primer marcador y (ii) una cantidad equivalente de un compuesto problema unido a un segundo marcador en las condiciones que llevan a la fijación; (b) retirar el material

sin fijar del complejo receptor NEPOR protector de tejido; y (c) detectar el nivel del primer y del segundo marcadores, en donde si el segundo marcador está presente, el compuesto se fija al complejo, y si el nivel del primer marcador disminuye con respecto al nivel del primer marcador, en donde el ligando marcado se pone en contacto con un complejo receptor NEPOR protector de tejido en las condiciones que llevan a la fijación en ausencia de un compuesto problema después de la retirada del material sin fijar, entonces se identifica un compuesto que se fija a un complejo receptor NEPOR protector de tejido.

En otro aspecto, se da a conocer un método para identificar un compuesto que modula la fijación de un ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido a un complejo receptor NEPOR protector de tejido, que comprende: (a) poner en contacto un ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido con un fragmento del complejo receptor NEPOR protector de tejido que comprende al menos un dominio extracelular del receptor de la EPO o del receptor EPH-B4 o del receptor efrina A1 y al menos un dominio extracelular del receptor de la EPO o del receptor EPH-B4 o del receptor efrina A1, el cual está fusionado a un fragmento Fc unido a un soporte sólido; en presencia de uno o más compuestos problema en las condiciones que llevan a la fijación; y (b) medir la cantidad de complejo receptor NEPOR protector de tejido ligado que está fijado al complejo receptor NEPOR protector de tejido; gracias a lo cual, si la cantidad de ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido fijado que se ha medido en (b) difiere de la cantidad de ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido medido en ausencia de uno o varios compuestos problema, entonces se identifica un compuesto que modula la fijación de un ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido al complejo receptor NEPOR protector de tejido. En una realización, la cantidad de ligando del complejo del receptor de NEPOR protector de tejido fijado se mide mediante el uso de un anticuerpo específico contra el ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido. En otra, se marca el ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido y se mide la fijación del ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido al complejo receptor NEPOR protector de tejido mediante la detección del marcador unido al ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido. En un aspecto, se marca el ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido y la fijación del ligando marcado al complejo receptor NEPOR protector de tejido se mide mediante la detección del marcador unido al ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido. En un ejemplo, el marcador es fluorescente. En otra realización, el compuesto problema es un anticuerpo específico contra el complejo receptor NEPOR protector de tejido. En otra, el compuesto problema es una molécula pequeña o un péptido o un miembro de una colección. En una realización, el ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido es la EPO, o derivados de la misma. En algunos aspectos, el compuesto se fija al complejo receptor NEPOR protector de tejido. En otras, el compuesto se fija al ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido. En algunas realizaciones, la actividad del complejo receptor NEPOR protector de tejido se compara con la activación del receptor EPOR para identificar compuestos específicos de NEPOR.

En un aspecto, se da a conocer un método para identificar un compuesto que modula una actividad protectora de tejido en un mamífero, que comprende: (a) administrar el compuesto a un primer animal inmediatamente después de infligirle una lesión, en donde el primer animal expresa en su interior un complejo receptor NEPOR protector de tejido; y (b) administrar el compuesto a un segundo animal inmediatamente después de infligirle la misma lesión que en la etapa (a), en donde el segundo animal no expresa el complejo receptor NEPOR protector de tejido ni los componentes del mismo; de tal manera que si la recuperación de la lesión difiere en el animal de la etapa (a) con respecto al animal de la etapa (b), se identifica un compuesto que modula una actividad protectora de tejido.

En otro aspecto, se da a conocer un método para tratar los resultados negativos de los pacientes asociados a la función de NEPOR estimulada con la EPO, lo que implica la coadministración de la EPO con un inhibidor de la actividad de NEPOR. En una realización, el método comprende la administración de una cantidad eficaz del anticuerpo anti-NEPOR de la reivindicación 1, en combinación con la EPO, y gracias a tales combinaciones se permite la señalización hematopoyética al mismo tiempo que se apaga la señalización del NEPOR y, así pues, las señales de supervivencia celular mediadas por la EPO en las células tumorales. En otra, el método comprende además administrar una cantidad eficaz del inhibidor de la tirosina cinasa de EPHB4, en combinación con la EPO, gracias a lo cual tales combinaciones permiten la señalización hematopoyética al mismo tiempo que se apaga la señalización del NEPOR y, así pues, las señales de supervivencia celular mediadas por la EPO en las células tumorales. En otra, el método además comprende administrar una cantidad eficaz del siRNA anti-NEPOR, en combinación con la EPO, y gracias a tales combinaciones se permite la señalización hematopoyética al mismo tiempo que se apaga la señalización del NEPOR y, así pues, las señales de supervivencia celular mediadas por la EPO en las células tumorales.

En otro aspecto, se da a conocer un método para hacer disminuir la supervivencia de las células o tejidos tumorales en un humano, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que modula la actividad de un complejo receptor NEPOR protector de tejido a un humano que lo necesita, en donde dicha disminución de la supervivencia de las células o tejidos cancerosos da lugar a la disminución del crecimiento tumoral y/o a un incremento en la supervivencia del paciente, siempre y cuando el compuesto sea un derivado de la EPO y no una EPO de tipo silvestre.

En un aspecto, se da a conocer un método para modular la supervivencia celular en el tejido que da positivo para el NEPOR, que comprende la administración de unos mutantes y péptidos de la EPO seleccionados del grupo que consiste en péptidos de cada una de las SEQ ID n.º 17 hasta SEQ ID n.º 212.

En otro, se da a conocer un método para modular la supervivencia celular en tejido que da positivo para el NEPOR, que comprende la administración de una cantidad eficaz de una quimera de la EPO, que comprende un dominio de fijación a ligando del receptor efrina seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID n. 215 y la SEQ ID n.º 216.

5 En una realización, el compuesto es un anticuerpo específico contra el complejo receptor NEPOR protector de tejido. En otro, el compuesto es un anticuerpo específico contra un ligando del complejo receptor NEPOR protector de tejido. En otro, el compuesto es una molécula pequeña, péptido o un miembro de una colección. En otro, el compuesto se fija al complejo receptor NEPOR protector de tejido. En otro, el compuesto hace disminuir la actividad del complejo receptor NEPOR protector de tejido. En otro, el compuesto se administra junto con una EPO. En otra realización, la enfermedad o trastorno es un cáncer, que incluye cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de intestino delgado, leucemia, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de endometrio, cáncer de estómago, linfoma no de Hodgkin, cáncer de riñón, carcinoma de células renales (CCR), melanoma maligno, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de vejiga, cáncer de vulva, cáncer de pene, cáncer de testículo, cáncer de timo, sarcoma de Kaposi, cáncer de ojo, cáncer de la glándula suprarrenal, cáncer de cerebro, cáncer de cuello uterino, cáncer del apéndice, cáncer adenoideo, cáncer del conducto colédoco, cáncer de uretra, cáncer raquídeo, familia de tumores de Ewing, cáncer de células germinales extragonadal, cáncer del conducto colédoco extrahepático, cáncer de las trompas de Falopio, cánceres de las partes blandas, cáncer de hueso, linfoma de Hodgkin, cáncer de ano, mesotelioma maligno, cáncer de vagina, cáncer de piel, cáncer del sistema nervioso central (craneofaringioma), blastoma pleuropulmonar, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, cáncer de las células transicionales de la pelvis renal y de la uretra, cáncer de hipófisis, carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello (CCECC), cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga y cáncer de glándula salival. En una realización, el cáncer comprende células cancerosas que expresan el complejo receptor NEPOR protector de tejido. En otra, el cáncer es cáncer metastásico. En otra el cáncer es un cáncer dependiente de la angiogénesis.

25 En otro aspecto, se da a conocer un método para tratar a un paciente que padece una enfermedad asociada a la angiogénesis, que comprende administrar al paciente un compuesto identificado por los métodos descritos.

En otro aspecto, se da a conocer un siRNA que es específico de EPH-B4 para ser usado para tratar a un paciente con cáncer y/o tumor que está recibiendo o recibirá la eritropoyetina.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

30 Se persiguieron muchas estrategias de análisis de secuencias, que incluyen la búsqueda de homólogos del dominio de fijación de la EPO que tiene el EPOR, un método basado en el análisis del dominio combinado con la minería de textos, y el análisis de homología de la EPO seguido por la minería de textos de los aciertos resultantes. Sólo se investigó la parte del proteoma humano expuesto al medio extracelular. Esto permitió centrarse en las homologías que eran significativas, aunque posiblemente no se tuvieran en cuenta dentro del contexto de un análisis del proteoma completo. Esto formó la base de datos XtraCell. La base de datos XtraCell realizó una predicción de los péptidos señal y transmembranarios de todo el proteoma humano. Todas las proteínas que poseen al menos uno de estos rasgos se almacenaron en una primera versión de la base de datos extracelular. Dado que no todas las proteínas extracelulares realmente poseen alguno de estos rasgos, se extrajo una lista de dominios de proteínas específicos del medio extracelular a partir de un SMART (del inglés *Simple Modular Architecture Research Tool*. SMART es una base de datos de dominios de proteínas bien conocidos con un fuerte sesgo hacia dominios contenidos en las proteínas de señalización). A continuación, estos se cribaron frente al proteoma humano con el uso del algoritmo HMMER. HMMER es una implementación de libre distribución del programa informático de perfiles HMM para el análisis de secuencias de proteínas. Los perfiles de modelos ocultos de Markov (HMM, del inglés *hidden Markov models*) se pueden utilizar para realizar una búsqueda sensible en la base de datos a partir de la descripción estadística del consenso de una familia de secuencias. Todos los aciertos se añadieron a la base de datos XtraCell y el conjunto de datos no contenía redundancias. Se consolidó una versión final de la base de datos XtraCell para el propósito de estos análisis específicos de la EPO.

### Ejemplo 2

50 Este ejemplo ilustra una estrategia basada en dominios acoplada a un análisis de minería de textos y un análisis de escala genómica. La teoría subyacente era que cualquier nuevo receptor de la EPO implicado en el traslado del efecto neuroprotector de la EPO podría también poseer los dos dominios membranarios proximales de la fibronectina 3 (FN3) (como los encontrados en el EPOR), mientras que al mismo tiempo era inducible por la hipoxia. Tal arquitectura de dominios conservados es compatible tanto con un EPOR formado por un complejo heterodimérico como con un receptor independiente y homodimérico inducible por la hipoxia. Se extrajeron todas las proteínas que contenían dos dominios proximales FN3 membranarios a partir del proteoma humano (84 en total) y se preguntó si había alguna prueba de su función en respuesta a la isquemia o a condiciones con poco oxígeno (véase la figura 4). El último análisis se realizó mediante una estrategia de minería de textos que abarca el uso de sinónimos de todas las proteínas y conceptos tales como hipoxia e isquemia. De las 84 proteínas que contienen la composición de dominios 2FN3-TM, solo cuatro mostraban indicios de intervención en la respuesta a las condiciones

de poco oxígeno: EPH-B4, IL6RB, TIE1 y GM-CSF. Además de EPH-B4, la función celular de cada una de estas proteínas se ha estudiado y se ha confirmado su importante función en respuesta a la hipoxia.

El examen directo del locus de EPH-B4 reveló que está directamente yuxtapuesto al locus de la EPO, aunque en la hebra opuesta (véase la figura 5). Esta asociación genómica tan cercana estaba conservada en todos los genomas examinados de los vertebrados. Se observó que se necesitaba una respuesta inmediata por parte de las células a las condiciones de poco oxígeno y, así pues, se necesitaba cotranscribir o cotraducir las moléculas efectoras clave. Además, tal colocalización genómica de moléculas asociadas desde el punto de vista funcional se observa para otras parejas receptor:ligando (p. ej., MST1 y su receptor MST1R: véase la web de internet [ensembl.org/Homo\\_sapiens/contigview?gene=OTTHUMG00000136237;db=vega](http://ensembl.org/Homo_sapiens/contigview?gene=OTTHUMG00000136237;db=vega)).

Para examinar esta posibilidad con más detalle, analizamos el promotor y las regiones 5' UTR y 3' UTR de la EPO, de EPHB4 y del EPOR en busca de los sitios de fijación del factor inducible por hipoxia. Aquí utilizamos el algoritmo 'match' de Genomatix, que busca la conservación estricta de los restos centrales del sitio de fijación y al menos una conservación del 90% de los restos que no son centrales. Hallamos que los locus de EPO y EPH-B4 poseían numerosos sitios de fijación para el factor de transcripción inducible por hipoxia. En cambio, se encontró que las regiones reguladoras del gen de EPOR estaban completamente desprovistas de tales sitios de fijación de HIF-1, lo que de nuevo apuntaba a una posible función de EPHB4 como receptor de la EPO inducible por hipoxia (véase la figura 6).

### Ejemplo 3

En este ejemplo se muestra la estrategia basada en la homología que utiliza la base de datos extracelular de humano. Aquí vamos en busca de la identificación directa de las regiones con actividad de fijación a la EPO en otras proteínas, mediante la comparación directa con el dominio de fijación de la EPO que tiene el EPOR. Se extrajo la región del EPOR responsable de la fijación a la EPO y se utilizó para identificar alguna homología con proteínas de la XtraCellDB. Esta base de datos, especialmente desarrollada, aporta una serie de ventajas en el sentido de que todas las homologías identificadas son con proteínas extracelulares de humano, lo que elude la necesidad de evaluar homologías espurias con especímenes intracelulares irrelevantes. El análisis de los homólogos resultantes reveló una homología sorprendente con la proteína efrina A1 entre los cuatro mejores aciertos. Dado lo que habíamos aprendido sobre la posible función de la EPH-B4 en la señalización de la EPO, decidimos valorar esta homología con más detalle gracias al paquete de programas para estructura de proteínas Swiss-Model. Aquí empleamos información procedente de la estructura cocristalizada de la efrina A5 asociada a la EphB2 y la comparamos con la información del cocristal de EPO:EPOR. La conservación de los restos clave en las posiciones alineadas por su estructura nos permitió concluir una firme base estructural para la asociación entre la efrina A1 y la EPO. Además, el hecho de que tanto la efrina A1 como la EPHB4 poseen una posible afinidad por la EPO sugiere para la biología de la efrina un contexto funcional más estimulante que lo reconocido hasta entonces (véase la figura 7).

### Ejemplo 4

Este ejemplo da a conocer datos *in vivo* o de laboratorio experimental que validan el análisis por bioinformática dado a conocer en los ejemplos 1 a 3 en la presente memoria. La validación *in vivo* de la función de EPH-B4 en la señalización de la EPO se ha centrado en el aspecto neuroprotector de la función de la EPO, con un sesgo hacia la hipótesis de que EPH-B4 y EPOR son compañeros de heterodimerización. La siguiente tabla recoge los experimentos de validación de los que se dispone de datos (véase la tabla 7).

Tabla 7. Experimentos de validación realizados en el laboratorio

Método	Objetivo	Resultado
Inmunohistoquímica	Valorar la expresión de la proteína EPHB4 en el cerebro y cómo está relacionada con la expresión del EPOR.	Las tinciones de precipitación en el cerebro de roedores adultos mostraron que la EPHB4 se expresaba en las neuronas adultas con el mismo patrón que el receptor de la EPO. La tinción del hipocampo mostró la coexpresión de EPOR y EPHB4 (véase la figura 8). Resultó sorprendente que la tinción se limitara a determinadas células dentro del campo del tejido.
Co-IP	Expresión exógena de EPOR/EPHB4 en las células COS. Co-IP con los anticuerpos contra EpoR y EphB4 → análisis por WB.	Positivo. El uso del anticuerpo contra el EPOR Co-IP satisfactoriamente la proteína EPHB4.

Imunohistoquímica. Para la inmunofluorescencia, los cortes (2  $\mu\text{m}$ ) de tejido encefálico de rata incluidos en parafina se desparafinaron y se calentaron en el microondas (a 600 W durante 15 min en tampón de citrato). Después, los cortes se incubaron a la vez con el antisuero contra el EPOR (1:200; sc-697, Santa Cruz Biotechnology) y con el anticuerpo contra EphB4 (1:100; AF446, R&D Systems) a 4 °C durante una noche. Después de añadir un anticuerpo secundario anticabra biotinilado (1:200; Dianova), los cortes se incubaron con Alexa Fluor 555 acoplado a estreptavidina (1:200; Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y un anticuerpo secundario anticonejo acoplado a FITC (1:200; Dianova). Los núcleos se contratiñeron con Hoescht 33342 (1:10.000, Molecular Probes). Los controles para las tinciones incluían la omisión de los anticuerpos primarios, intercambio de fluoróforos y tinciones con un único fluorescente. Se obtuvieron las imágenes con un microscopio Olympus IX-81 con excitación monocromática de ancho de banda estrecho (Policromo IV, Till Photonics, Gräfelfing, Alemania) y los filtros adecuados.

Tanto EPHB4 como EPOR mostraron una colocalización sorprendente cuando se valoraron en los cortes de tejido encefálico de ratas. Sin comprometerse con la teoría, esta coexpresión sugiere el acoplamiento funcional de ambos receptores.

Coinmunoprecipitación. El principio de la inmunoprecipitación es un anticuerpo (monoclonal o policlonal) contra un antígeno diana específico al que se le deja formar un complejo inmunitario con la diana en una muestra, tal como un lisado celular. A continuación, el complejo inmunitario se captura en un soporte sólido en el cual se ha inmovilizado la proteína A o la proteína G (la proteína A o la G se fija al anticuerpo, que está fijado a su antígeno). El proceso de la captura de este complejo desde la solución se denomina precipitación. Se retira por lavado cualquier proteína que no se «precipita» mediante el soporte con proteína A o G inmovilizadas. Finalmente, los componentes del complejo inmunitario fijado (tanto antígeno como anticuerpo) se eluyen del soporte y se analizan por SDS-PAGE (electroforesis en gel), a lo que sigue muy a menudo la detección por transferencia de tipo Western para verificar la identidad del antígeno.

La inmunoprecipitación tradicional implica las etapas siguientes:

1. Formar el complejo entre antígeno y anticuerpo (complejo inmunitario) mediante la incubación del anticuerpo específico con la muestra que contiene el antígeno durante 1 hora o varias horas.
2. Capturar el complejo inmunitario en un soporte de gel de agarosa con la proteína A o la proteína G inmovilizadas mediante incubación durante 0,5 a 2 horas.
3. Retirar cualquier proteína sin fijar (componentes de la muestra del complejo no inmunitario) desde el complejo precipitado mediante el lavado del gel de soporte con más tampón de muestra.
4. Hervir el gel de soporte para reducir la muestra en el tampón de carga para SDS-PAGE.
5. Recuperar la muestra eluida en el tampón de carga desde el gel de soporte y analizarla por SDS-PAGE.
6. Realizar el análisis por transferencia de tipo Western, utilizando como sonda el anticuerpo específico contra el antígeno.

En una coinmunoprecipitación, el antígeno diana que se precipita gracias al anticuerpo «coprecipita» un complejo formado por la proteína y su compañero de fijación a partir de un lisado, es decir, la proteína que interacciona está fijada al antígeno diana, que acaba siendo fijado por el anticuerpo que queda capturado en el gel de soporte con la proteína A o G. La suposición que se hace habitualmente cuando las proteínas asociadas se coprecipitan es que estas proteínas están relacionadas a nivel celular con la función del antígeno diana.

La valoración de una posible asociación entre EPHB4 y EPOR por coinmunoprecipitación mostró que ambas proteínas mantenían una asociación física. Aquí, el EPOR etiquetado con FLAG se coexpresó con EPH-B4 en las células COS y, a continuación, se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti-FLAG. Como se puede observar en la figura 9, se demostró que EPHB4 se coinmunoprecipitaba en estos experimentos.

Construcciones de anticuerpo con el Fc humano. La estrategia del conjugado a Fc es la más adecuada cuando se trata con receptores diméricos de la superficie celular. Aquí, la porción extracelular de EPHB4/EPOR se puede fusionar con un fragmento Fc. Este método tiene ventajas debido a su viabilidad (terapéutica) *in vivo* y al hecho de que imita óptimamente el estado dimerizado del receptor. En la figura 10 se destacan las construcciones de humano que se pueden utilizar para demostrar la afinidad de la EPHB4/efrina A1 por la EPO.

Una de las dos alternativas puede ensayar la interacción de las construcciones de Fc con EPO, entre ellas, por ejemplo, una estrategia de matrices de proteínas o un análisis de resonancia de plasmón superficial.

Ejemplo 5

Validación adicional *in vitro* e *in vivo* de la función de los NEPOR cuando median en la función de la EPO.

En estos experimentos, nos proponemos determinar la respuesta al tratamiento con eritropoyetina (EPO) en un

panel de líneas celulares de cáncer de ovario. Esto estaría mediado por la expresión del receptor de la eritropoyetina (EPO) así como dos receptores, EPH-B4 y efrina A, que tendrían la capacidad de activar las vías de señalización en respuesta a la fijación de la EPO. Primero fue necesario caracterizar la expresión de estos receptores en un panel de líneas celulares de cáncer de ovario. Primero recogimos el ARN de cada línea celular y lo retrotranscribimos en ADNc. Mediante el uso de cebadores específicos para cada receptor, analizamos la expresión de su ARN. Tal y como resulta evidente en las figuras, la expresión del ARN de EPOR y EPH-B4 es diferente en las diferentes líneas celulares, lo que sugiere que los cambios de regulación transcripcional durante la formación del tumor no producen cambios significativos en la efrina A1. A continuación, fue necesario determinar en el panel la expresión de las proteínas de estos receptores. De nuevo, observamos diferencias significativas en la expresión de los receptores EPOR y EPH-B4, aunque no coinciden con la expresión del ARN, lo que sugiere que hay cambios de regulación postranscripcional de estos receptores en las líneas celulares. Después clasificamos estos cambios de expresión, en particular con respecto a EPOR y EPH-B4, para analizar entonces la respuesta al tratamiento con la EPO. Analizamos su respuesta a la quimioterapia junto con la EPO. Hallamos que, en particular en la línea celular de cáncer de ovario HeyA8, que la EPO era capaz de anular la apoptosis inducida por el docetaxel. A continuación, fue necesario analizar la activación de las vías de señalización que se sabe que son activadas por estos receptores en respuesta al tratamiento con la EPO. Tres líneas celulares se mantuvieron en ayuno durante dos horas para aislar su respuesta a la EPO. Las líneas celulares con mayor expresión del EPOR (HeyA8 y HeyA8 MDR) mostraron la activación de la vía MAPK/ERK, mientras que las líneas celulares que expresaban más EPH-B4 (SKOV3ip1) mostraban un incremento de la activación de las vías de señalización de AKT y STAT5b. A continuación, nos propusimos determinar una dosis de EPO que optimizase su efecto promotor del tumor *in vivo*. A las ratonas hembra atímicas se les inyectó i.p. HeyA8 MDR (positivo para EPOR y EPH-B4). El día 8, las ratonas se trataron con dosis crecientes de EPO (10, 50, 100 U) en días alternos. El tratamiento continuó hasta que los tumores se hicieron evidentes, se sacrificaron entonces las ratonas, y se determinó la masa tumoral. Observamos un incremento de la masa tumoral en comparación con el control en las ratonas tratadas con 10 y 50 U de EPO. La expresión diferencial de EphB4 en las líneas celulares, así como la activación de determinadas vías de señalización, sugirió que también intervendría en el efecto promotor del tumor *in vivo*. Para determinar esto, les inyectamos de nuevo a las ratonas las líneas celulares HeyA8 MDR i.p. El día 8 comenzamos el tratamiento con EPO (50 U 3 × semana) junto con el siRNA específico de la EPH-B4 [sentido: (SEQ ID n.º 266) 5'CAGCCAAUAGCCACUCUAA3'; antisentido: (SEQ ID n.º 267) 5'UUAGAGUGGCUAUUGGCUG3']. Tal y como está descrito más arriba, el siRNA de EphB4 fue capaz de hacer disminuir por sí solo el crecimiento tumoral. Además, el siRNA de EPH-B4 también anuló por completo el crecimiento tumoral inducido por la EPO.

#### Ejemplo 6

Para validar adicionalmente que la EPHB4 es un nuevo receptor de la EPO, se llevó a cabo un experimento de coimmunoprecipitación con un anticuerpo anti-EPHB4 para inmunoprecipitar la EPHB4 a partir del lisado celular.

En particular, las células (HeyA8 MDR y A2780cp20) se hicieron crecer en RPMI-1640 complementado con suero de ternera fetal al 15% y gentamicina. A una confluencia del 70%, las células se trataron con EPO (50 U/ml) durante 15 y 30 minutos. Además, un grupo de células se expuso al MG132 (10 µM) durante 30 minutos. Se prepararon los lisados celulares después de lavar dos veces con PBS frío y se incubaron en el tampón de ensayo modificado de radioinmunoprecipitación (RIPA, por su nombre en inglés). Se determinó la concentración de las proteínas con un kit de reactivos de ensayo de proteínas BCA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Para la inmunoprecipitación, se incubaron 500 µg del lisado celular con 6 µl del anticuerpo primario (EphB4-Abcam) durante una noche a 4 °C. Se añadieron perlas de Sepharose con proteína A y la mezcla se incubó durante 3 horas a 4 °C. Se añadió el tampón de Laemmli para disociar los complejos de las perlas, y las perlas se separaron por centrifugación a 3.500g durante 5 minutos a 4 °C. A continuación, los sobrenadantes se utilizaron para el análisis de inmunotransferencia. Los sobrenadantes se separaron en SDS-PAGE al 8%. Las muestras transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) por electroforesis se incubaron con anticuerpos contra la EphB4 (Abcam Co.) y la EPO (R & D Systems) durante una noche a 4 °C, se detectaron con IgG de conejo antirratón conjugada a la peroxidasa de rábano picante (HRP, por su nombre en inglés) (Amersham, Piscataway, NJ) y se revelaron con el kit de detección de quimioluminiscencia potenciada (Pierce Biotechnology).

Los resultados se dan a conocer en la figura 19. Los datos muestran claramente una asociación directa entre la EPHB4 y la EPO, lo que sugiere el acoplamiento funcional estrecho de ambas proteínas.

#### Ejemplo 7

La EPO radiomarcada es capaz de fijarse a líneas celulares independientes con diferente intensidad. La capacidad que tiene la EPHB4 para mediar tal fijación se investigó en tres líneas celulares diferentes con diferentes grados de expresión de EPHB4 y EPOR.

Las células (HeyA8, HeyA8 MDR y A2780cp20) se hicieron crecer en RPMI-1640 complementado con suero de ternera fetal al 15% y gentamicina. Las células se transfectaron transitoriamente con el siRNA de control [sentido: 5'UUCUCCGAACGUUGUCACGU3' (SEQ ID n.º 264); antisentido: 5'ACGUGACACGUUCGGAGAA3' (SEQ ID

n.º 265)], el siRNA de EphB4 [sentido: 5'CAGCCAAUAGCCACUCUAA3' (SEQ ID n.º 266); antisentido: 5'UUAGAGUGGCUAUUGGCUG3' (SEQ ID n.º 267)] o el siRNA de EPOR [sentido: 5'CCGAAGAGCUUCUGUGCUU3' (SEQ ID n.º 262); antisentido: 5'AAGCACAGAAGCUCUUCGG3' (SEQ ID n.º 263)]. Después de 72 horas, las células se desprendieron con EDTA al 0,1%. Se diluyeron  $1 \times 10^6$  células en 80  $\mu$ l de tampón de fijación (MEM + HEPES a 20 mM, pH 7,4, SAB al 0,1%). Se incubaron con  $^{125}$ I-EPO a 7,5 mM a temperatura ambiente durante 2,5 horas. La fijación inespecífica se determinó con la exposición de las células a  $^{125}$ I-EPO a 7,5 mM y EPO fría ( $\times 200$ ). Las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en tampón amortiguador (SAB al 10% en PBS). Después de la centrifugación, los tubos se congelaron en hielo seco y el sedimento se desprendió y se colocó en líquido de centelleo. La fijación total se calculó mediante a sustracción de la fijación inespecífica de la fijación total.

Los resultados, dados a conocer en la figura 20, muestran que la EPHB4 es realmente responsable de la mayor parte de fijación de la EPO en determinados tipos de células (p. ej., A2780cp20).

#### Ejemplo 8

Para demostrar que la EPHB4 es responsable de la mediación en la supervivencia de las células tumorales y de los peores resultados de los pacientes en respuesta al tratamiento con la EPO, se realizó un análisis inmunohistoquímico de EphB4 y EPOR sobre las muestras tumorales de 71 pacientes con cáncer de ovario epitelial muy maligno y de alta estadificación. Todos los pacientes se trataron con anterioridad con cirugía seguida de quimioterapia con taxano-platino y tratamiento con la EPO.

En concreto, el análisis inmunohistoquímico de EphB4 y EPOR se realizó en muestras un grosor de 4  $\mu$ m de cáncer de ovario epitelial incluidas en parafina y fijadas con formol. Los cortes se desparafinaron con xileno y con concentraciones decrecientes de etanol, y se rehidrataron con PBS. La recuperación del antígeno de la EphB4 se realizó con Diva Decloaker a 1 $\times$  (Biocare Medical, Concord, CA) en un chorro de vapor durante 40 minutos seguido de un enfriamiento de 20 minutos a temperatura ambiente. La recuperación del antígeno de la EPOR se realizó con Borg Decloaker a 1 $\times$  (Biocare Medical) con calor (125 °C) y presión durante 4 minutos seguido de un enfriamiento de 60 minutos a temperatura ambiente. Después de la recuperación de antígenos, todos los cortes se lavaron con PBS. Las peroxidasa endógenas se bloquearon con peróxido de hidrógeno al 3% en PBS durante 12 minutos a temperatura ambiente seguido del bloqueo inespecífico de proteínas con SAB al 5% en TBST durante 10 minutos a temperatura ambiente para EphB4, o bien suero de caballo normal al 5% durante 20 minutos a temperatura ambiente para EPOR. A continuación, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario contra la EphB4 (monoclonal de ratón contra humano, dilución de 1:500, Abcam, Cambridge, MA) o contra el EPOR (monoclonal de ratón y biotinilado contra humano, dilución de 1:25, R&D Systems, Minneapolis, MN) en la solución de bloqueo correspondiente durante una noche a 4 °C. Se realizó la amplificación secundaria con el sistema de detección de polímeros MACH4 (EphB4: Biocare Medical) o el marcador estreptavidina AP 4plus (EpoR: Biocare Medical). La visualización se consiguió con 3,3'-diaminobezidina (DAB; Open Biosystems, Huntsville, AL). Los cortes se contratiñeron con hematoxilina Gill n.º 2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), se lavó con PBS durante 1 minuto y se montó con Universal Mount (Research Genetics, Huntsville, AL). Las muestras clínicas las puntuaron por la tinción con los anticuerpos contra la EphB4 y contra el EpoR un anatomopatólogo acreditado por el comité y que desconocía el resultado clínico de las pacientes. Se determinó semicuantitativamente la expresión de EphB4 y EpoR mediante la valoración de la distribución de las células positivas y de la intensidad de la tinción en las células tumorales. La distribución de las células positivas se puntuó como sigue: 0 puntos, sin tinción; 1 punto, focal o <25%; 2 puntos, del 25 al 50%, 3 puntos, del 50 al 75%, 4 puntos, del 75 al 100%. La intensidad de la tinción se puntuó como focal o débil (1 punto), moderada (2 puntos) o fuerte (3 puntos). Se multiplicaron los puntos para la intensidad y la distribución, y se les asignó una puntuación global que oscilaba de 0 a 12. Una puntuación global de <3 se consideraba negativa, mientras que las >3 eran positivas.

Los resultados se representan en las figuras 21 a 23. La sobreexpresión de EPHB4, pero no de EPOR, se halló que estaba correlacionada con el empeoramiento del resultado clínico en respuesta al tratamiento con la EPO. Los niveles altos de expresión de EPHB4 con niveles bajos de EPOR mostraron la peor mediana de la supervivencia (2,53 años), mientras que niveles bajos de EPHB4 y niveles altos de EPOR mostraron la mejor mediana de la supervivencia (7,67 años). Los datos apoyan la necesidad de una prueba trataméntica para valorar la expresión de la EPHB4 antes y/o durante una pauta de tratamiento con la EPO.

#### Ejemplo 9

El tratamiento con siRNA selectivos de EphB4, pero no de EPOR, inhibe *in vivo* la formación de metástasis estimulada por la eritropoyetina (EPO) en las células de cáncer de ovario A2780

#### Propósito del estudio y resumen de los resultados

El objetivo de este estudio fue investigar la función del silenciamiento de EphB4 y EPOR en la formación de metástasis después de la estimulación con la EPO de las células de cáncer de ovario A2780 *in vivo*. El tratamiento con la EPO incrementó el número de nódulos tumorales *in vivo* de tumores de ovario A2780 que expresan EPOR y

5 EPH-B4 en las ratonas. El silenciamiento selectivo de la expresión de EphB4 mediante el tratamiento con siRNA *in vivo* inhibió la formación de metástasis inducida por la EPO. Por el contrario, la inhibición del EPOR mediante siRNA aceleró la formación de la metástasis basal, lo que no se podía haber estimulado además con la EPO. De igual forma que otros hallazgos *in vitro* e *in vivo* y a diferencia de la EphB4, el EpoR parece ser un regulador negativo de la formación de metástasis *in vivo*.

Métodos y resultados

Modelo de cáncer de ovario ortotópico A2780 (cp20):

10 Las células de cáncer de ovario A2780 de humano que crecieron en cultivo se incubaron con EDTA, se centrifugaron a 110g a 4 °C durante 7 minutos, se lavaron dos veces con la solución salina equilibrada de Hank (Gibco, Carlsbad, CA) y se resuspendieron. A cada ratona hembra atímica (NCR-nu) se le inyectó por vía intraperitoneal  $1,0 \times 10^6$  células A2780/ratona.

15 Para valorar el efecto del silenciamiento de la expresión de los receptores EphB4 y EPOR en el crecimiento tumoral inducido por la EPO, el siRNA selectivo de EphB4 y EPOR se administraron *in vivo* mediante liposomas que contienen 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DOPC, por su nombre en inglés). Las moléculas de siRNA se describen en el ejemplo 7. El tratamiento se inició una semana después de la inyección i.p. de las células tumorales. Las ratonas se asignaron aleatoriamente a 6 grupos (n = 10 ratonas por grupo): (a) siRNA de control-DOPC\* (150 µg/kg i.p. dos veces a la semana), (b) siRNA de control-DOPC + EPO (50 U/ratona i.p. tres días a la semana) (c) siRNA de EphB4-DOPC (150 µg/kg i.p. dos veces a la semana), (d) siRNA de EphB4-DOPC + EPO, (e) siRNA de EphB4-DOPC (150 µg/kg i.p. dos veces a la semana), y (f) siRNA de EPH-B4-DOPC + EPO.

20 A las ratonas se les monitorizaron los efectos adversos y se continuó con el tratamiento hasta que las ratonas de algún grupo empezaron a agonizar. En el momento del sacrificio, se anotó de las ratonas el peso, la masa tumoral, el número de nódulos y la distribución de los tumores.

Tratamiento

Grupo	Tratamiento	Estimulación	Línea celular
1	siRNA de control-DOPC	Control	A2780
2	siRNA de control-DOPC	EPO (50 U)	
3	siRNA de EphB4-DOPC	Control	
4	siRNA de EphB4-DOPC	EPO (50 U)	
5	siRNA de EpoR-DOPC	Control	
6	siRNA de EpoR-DOPC	EPO (50 U)	

25 Criterios de valoración

Definición: Número de nódulos tumorales valorados cuando las ratonas de algún grupo empezaron a agonizar.

Mediciones: Recuento de nódulos.

Los resultados descritos en la figura 24 muestran que la inhibición de EphB4, pero no de EpoR, redujo la formación de metástasis inducida por la EPO en el cáncer de ovario A2780 *in vivo*.

30 Ejemplo 10

El tratamiento con siRNA selectivo de EphB4, pero no de EpoR, inhibe *in vivo* el crecimiento del cáncer de ovario A2780 estimulado por la eritropoyetina (EPO)

Propósito del estudio y resumen de los resultados

35 El objetivo de este estudio fue investigar la función del silenciamiento de EphB4 y EpoR en el crecimiento tumoral inducido por la estimulación de la EPO en las células de cáncer de ovario A2780 *in vivo*.

El tratamiento con la EPO estimuló el crecimiento *in vivo* de los tumores de ovario A2780 que expresan EpoR y EphB4 en las ratonas. El silenciamiento selectivo de la expresión de EphB4 por el tratamiento *in vivo* con siRNA inhibió fuertemente el crecimiento tumoral inducido por la EPO. Además, la inhibición de EphB4 redujo significativamente el crecimiento basal del xenoinjerto A2780, lo que subraya la importancia decisiva de este

receptor para el crecimiento de A2780 *in vivo*. En cambio, la inhibición del EPOR mediante el siRNA aceleró el crecimiento tumoral basal, lo que no se pudo estimular más con la EPO. Al igual que en otros hallazgos *in vitro*, en análisis *in vivo* y en retrospectiva de muestras de pacientes, el EpoR era un regulador negativo del crecimiento del tumor de ovario *in vivo*. En cambio, el crecimiento tumoral basal y el inducido por la EPO eran críticamente dependientes de la expresión del receptor EphB4.

Métodos y resultados

Las células de cáncer de ovario A2780 de humano que crecieron en cultivo se incubaron con EDTA, se centrifugaron a 110g a 4 °C durante 7 minutos, se lavaron dos veces con la solución salina equilibrada de Hank (Gibco, Carlsbad, CA) y se resuspendieron. A cada ratona atómica hembra (NCR-nu) se le inyectó por vía intraperitoneal  $1,0 \times 10^6$  células A2780/ratona.

Para valorar el efecto del silenciamiento de la expresión de los receptores EphB4 y EpoR en el crecimiento tumoral inducido por la EPO, los siRNA selectivos de EphB4 y EpoR se administraron *in vivo* mediante liposomas que contienen 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DOPC). Las moléculas de siRNA se describen en el ejemplo 7. El tratamiento se inició una semana después de la inyección i.p. de las células tumorales. Las ratonas se asignaron aleatoriamente a 6 grupos (n = 10 ratonas por grupo): (a) siRNA de control-DOPC (150 µg/kg i.p. dos veces a la semana), (b) siRNA de control-DOPC + EPO (50 U/ratona i.p. tres días a la semana), (c) siRNA de EphB4-DOPC (150 µg/kg i.p. dos veces a la semana), (d) siRNA de EphB4-DOPC + EPO, (e) siRNA de EphB4-DOPC (150 µg/kg i.p. dos veces a la semana), y (f) siRNA de EphB4-DOPC + EPO. A las ratonas se les monitorizaron los efectos adversos y se continuó con el tratamiento hasta que las ratonas de algún grupo empezaron a agonizar. En el momento del sacrificio, se anotó de las ratonas el peso, la masa tumoral, el número de nódulos y la distribución de los tumores.

Tratamiento

Grupo	Tratamiento	Estimulación	Línea celular
1	siRNA de control-DOPC	Control	A2780
2	siRNA de control-DOPC	EPO (50 U)	
3	siRNA de EphB4-DOPC	Control	
4	siRNA de EphB4-DOPC	EPO (50 U)	
5	siRNA de EpoR-DOPC	Control	
6	siRNA de EPOR-DOPC	EPO (50 U)	

Criterios de valoración

Definición: Tamaño del tumor valorado cuando las ratonas de algún grupo empezaron a agonizar.

Mediciones: Valoración manual del tamaño tumoral.

Resultados

Los resultados representados en la figura 25 muestran que la inhibición de EphB4, pero no de EpoR, redujo el crecimiento tumoral basal y bloqueaba completamente el crecimiento de cáncer de ovario A2780 inducido por la EPO *in vivo*.

Ejemplo 11

El tratamiento con siRNA selectivo de EphB4 inhibe *in vivo* completamente el crecimiento de cáncer de ovario Skov3ip1 estimulado por la eritropoyetina (EPO)

Propósito del estudio y resumen de los resultados

El objetivo de este estudio era investigar la función del silenciamiento de EphB4 en el crecimiento tumoral inducido por la estimulación de la EPO en las células de cáncer de ovario Skov3ip1 *in vivo*. Los resultados demostraban que el tratamiento con la EPO aceleraba fuertemente el crecimiento *in vivo* de los tumores de ovario Skov3ip que expresan EphB4 en las ratonas. El silenciamiento selectivo de la expresión de EphB4 mediante el tratamiento con siRNA inhibió completamente *in vivo* el crecimiento tumoral inducido por la EPO. Al igual que en otros experimentos, a pesar de la expresión del EPOR canónico en las células Skov3ip1, el crecimiento tumoral inducido por la EPO era

totalmente dependiente de la expresión de EphB4.

#### Métodos y resultados

5 Las células de cáncer de ovario Skov3ip1 de humano que crecieron en cultivo se incubaron con EDTA, se centrifugaron a 110g a 4 °C durante 7 minutos, se lavaron dos veces con la solución salina equilibrada de Hank (Gibco, Carlsbad, CA) y se resuspendieron. A cada ratona atímica hembra (NCr-nu) se le inyectó por vía intraperitoneal  $1,0 \times 10^6$  células Skov3ip1/ratona.

10 Para valorar el efecto del silenciamiento de la expresión del receptor EphB4 en el crecimiento tumoral inducido por la EPO, el siRNA selectivo de EphB4 se administró *in vivo* mediante liposomas que contienen 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DOPC). Las moléculas de siRNA se describen en el ejemplo 7. El tratamiento se inició una semana después de la inyección i.p. de las células tumorales.

15 Las ratonas fueron asignadas aleatoriamente a 4 grupos (n = 10 ratonas por grupo): (a) siRNA de control-DOPC (150 µg/kg i.p. dos veces a la semana), (b) siRNA de control-DOPC + EPO (50 U/ratona i.p. dos días una vez), (c) siRNA de EphB4-DOPC (150 µg/kg i.p. dos veces a la semana) y (d) siRNA de EphB4-DOPC + EPO (50 U/ratona i.p. dos días una vez). A las ratonas se les monitorizaron los efectos adversos y se continuó con el tratamiento hasta que las ratonas de algún grupo empezaron a agonizar. En el momento de sacrificio, se anotó de las ratonas el peso, la masa tumoral, el número de nódulos y la distribución de los tumores.

#### Tratamiento

Grupo	Tratamiento	Estimulación	Línea celular
1	siRNA de control-DOPC	Control	Skov3ip1
2	siRNA de control-DOPC	EPO (50 U)	
3	siRNA de EphB4-DOPC	Control	
4	siRNA de EphB4-DOPC	EPO (50 U)	

#### Criterios de valoración

20 Definición: Tamaño tumoral valorado cuando las ratonas de algún grupo empezaron a agonizar.

Mediciones: Valoración manual del tamaño tumoral.

#### Resultados

Los resultados mostrados en la figura 26 demuestran que la inhibición con siRNA selectivo de EphB4 anula completamente *in vivo* el crecimiento de Skov3ip1 estimulado por la EPO.

#### 25 Ejemplo 12

El tratamiento con siRNA selectivo de EphB4 inhibe *in vivo* el crecimiento de cáncer de ovario A2780 estimulado por la eritropoyetina (EPO)

#### Propósito del estudio y resumen de los resultados

30 El objetivo de este estudio era investigar la función del silenciamiento de EphB4 en el crecimiento tumoral *in vivo* inducido por la EPO de las células de cáncer de ovario A2780. Los resultados demostraron que el tratamiento con la EPO aceleró fuertemente el crecimiento *in vivo* de tumores de ovario A2780 que expresan la EphB4 en las ratonas. El silenciamiento selectivo de la expresión de EphB4 mediante el tratamiento *in vivo* con siRNA inhibió el crecimiento tumoral inducido por la EPO. Al igual que en otros experimentos y a pesar de la expresión del EpoR canónico en las células A2780, el crecimiento tumoral inducido por la EPO podría estar mediado por la EphB4.

#### 35 Métodos y resultados

##### Modelo de cáncer de ovario ortotópico A2780:

40 Las células de cáncer de ovario A2780 de humano que crecieron en cultivo se incubaron con EDTA, se centrifugaron a 110g a 4 °C durante 7 minutos, se lavaron dos veces con la solución salina equilibrada de Hank (Gibco, Carlsbad, CA) y se resuspendieron. A cada ratona atímica hembra (NCr-nu) se le inyectó por vía intraperitoneal  $1,0 \times 10^6$  células A2780/ratona.

Para valorar el efecto del silenciamiento de la expresión del receptor EphB4 sobre el crecimiento tumoral inducido por la EPO, el siRNA selectivo de EphB4 se administró *in vivo* mediante liposomas que contienen 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina (DOPC). Las moléculas de siRNA se describen en el ejemplo 7. El tratamiento se inició dos semanas después de la inyección i.p. de las células tumorales. Las ratonas se asignaron aleatoriamente a 4 grupos (n = 10 ratonas por grupo): (a) siRNA de control-DOPC (150 µg/kg i.p. dos veces a la semana), (b) siRNA de control-DOPC + EPO (50 U/ratona i.p. tres días a la semana), (c) siRNA de EphB4-DOPC (150 µg/kg i.p. dos veces a la semana), y (d) siRNA de EphB4-DOPC + EPO. A las ratonas se les monitorizaron los efectos adversos y se continuó con el tratamiento hasta que las ratonas de algún grupo empezaron a agonizar. En el momento del sacrificio, se anotó de las ratonas el peso, la masa tumoral, el número de nódulos y la distribución de los tumores.

10 Tratamiento

Grupo	Tratamiento	Estimulación	Línea celular
1	siRNA de control-DOPC	Control	A2780
2	siRNA de control-DOPC	EPO (50 U)	
3	siRNA de EphB4-DOPC	Control	
4	siRNA de EphB4-DOPC	EPO (50 U)	

Criterios de valoración

Definición: La masa tumoral se valoró cuando las ratonas de algún grupo empezaron a agonizar.

Mediciones: Se valoró la masa tumoral en el momento de la autopsia.

15 Resultados

En la figura 27 se muestra que la inhibición con siRNA selectivos de EphB4 bloquea *in vivo* completamente el crecimiento del cáncer de ovario A2780 inducido por la EPO.

Ejemplo 13

El EphB4 interviene en la proliferación de las células cancerosas estimulada por la eritropoyetina (EPO)

20 Propósito del estudio y resumen de los resultados

El objetivo de este estudio fue dar a conocer pruebas de la función del EPOR y de la EphB4 en la proliferación de las células cancerosas inducida por la eritropoyetina. Las células de cáncer de ovario A2780 parentales y los clones de A2780 generados con vectores de expresión que expresan los ARN pequeños ahorquillados selectivos de EpoR y EphB4 se utilizaron para valorar la dependencia de las señales de crecimiento sobre el estado de la expresión del receptor.

25 La disminución del receptor de la EPO (EpoR) en las células del cáncer intensificó significativamente la actividad promotora del crecimiento debida a la EPO. Las células que expresan niveles significativos de EphB4 sólo mostraron una fuerte y significativa proliferación inducida por la EPO, lo que resalta la función crítica de la EphB4 a la hora de mediar el crecimiento de las células cancerosas inducido por la EPO. En cambio, las células cancerosas que expresan el EpoR solo eran comparables a la línea de células parentales y carecían de la fuerte señal de proliferación en respuesta al tratamiento con la EPO.

30 Métodos y resultados

Generación de los clones de A2780 con shRNA específicos de EpoR y EphB4

Resumen y resultados: El objetivo de este trabajo era desarrollar clones que solo difiriesen de la línea de células parentales en la inhibición estable de EpoR o EphB4, respectivamente. Los clones transfectados de manera estable se obtuvieron de las células A2780 con inhibición específica de EpoR y EphB4. Estas células se utilizaron como herramientas de investigación en estos estudios. Las siguientes secuencias de shRNA se emplearon para formular los clones celulares estables:

35 Secuencia de shEpoR:  
 CCGGTGCCAGCTTTGAGTACTATCTCGAGATAGTGTACTCAAAGCTGGCATTTTTG (SEQ ID n.º 280)

40 Secuencia shEphB4:

CCGGTGATCTGAAGTGGGTGACATTCTCGAGAAYGYCACCCACTTCAGATCATT TTT (SEQ ID n.º 281)

Protocolo a grandes rasgos

5 Las células A2780 ( $1,25 \times 10^5$ ) se sembraron en placas de 6 pocillos el día antes de la transfección. A continuación, las células se lavaron con PBS y se les añadieron medio nuevo, el lentivirus y Polybreen™. Las células se incubaron durante una noche a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5%. Después de la incubación, se cambió el medio por medio recién preparado. Al cabo de 24 horas, se les añadió puromicina para seleccionar las células transfectadas. Para valorar el nivel de transfección, aislamos el ARN de cada grupo y determinamos la expresión de EpoR y EphB4 por RT-PCR. (véase la figura 28). El lentivirus tenía por código del producto SHVRS en Sigma-Aldrich.

Tratamiento.- Líneas celulares utilizadas: A2780.

10 Criterios de valoración

Generación de clones de A2780 que tienen silenciados EpoR y EphB4.

Resultados

Los resultados se muestran en la figura 28. Los clones 2 y 3 de las células tratadas con shEpoR y los clones 1 y 4 de las células tratadas con shEphB4 no mostraban ninguna expresión de sus correspondientes receptores.

15 Ensayo de proliferación

20 Se inocularon en placas de 96 pocillos  $1 \times 10^3$  células de las células A2780 parentales, o clones celulares estables con disminución de la expresión de EpoR y EphB4, y se dejaron en ayuno de suero durante una noche (a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5%). Al día siguiente, se les añadió EPO (50 U/ml) a las células adecuadas que expresan EpoR, EphB4 o ambos (véase la tabla que viene a continuación, que recoge los grupos de tratamiento). Después de la incubación de las células con EPO, las células se contaron en diferentes momentos del tiempo (48, 72 y 96 horas). Cada condición se evaluó por triplicado.

Tratamiento

Grupo	Líneas celulares	Estimulación	Receptores expresados
1	A2780	-	EpoR/EphB4
2	A2780	EPO	
3	Sh EpoR	-	EphB4
4	shEpoR	EPO	
5	shEphB4	-	EpoR
6	shEphB4	EPO	

Criterios de valoración

25 Definición: Número de células cancerosas tras la incubación de 96 h con o sin el ligando EPO.

Mediciones: Recuento manual de las células.

Resultados

En la figura 29 se muestra que EphB4 es el mediador preferido de la proliferación estimulada por la EPO en las células de cáncer de ovario A2780.

30 Ejemplo 14

EphB4 interviene en la fijación celular de la eritropoyetina a las células cancerosas

Propósito del estudio y resumen de los resultados

35 El objetivo de este estudio fue el de dar a conocer pruebas de la función de la expresión de EphB4 en las células tumorales de humano como un receptor celular para la eritropoyetina. Las células de cáncer de ovario A2780 parentales y los clones estables de células A2780 que se generaron tal y como se describe en el ejemplo 13 para

disminuir selectivamente la cantidad de EpoR, o bien de EphB4, gracias a los shRNA se utilizaron para valorar la fijación dependiente del receptor de la EPO radiomarcada.

5 La fijación de la <sup>125</sup>I-EPO radiomarcada a los clones de células cancerosas A2780 que se generaron para disminuir la cantidad de EphB4 o EpoR se vio inhibida significativamente en comparación con la línea de células parentales A2780 que expresan ambos receptores de la EPO. Resulta interesante que después de la disminución de la cantidad de EphB4, la fijación de las células a la EPO era significativamente menor que con el shEpoR, lo que sugiere que en estas células se expresan más receptores EphB4 que receptores EpoR.

#### Métodos y resultados

##### Ensayo de fijación de la EPO:

10 Las células a una confluencia del 80% se desprendieron con EDTA al 0,5%, se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos y se lavaron dos veces con el tampón de fijación (MEM, Hepes a 20 mM, SAB a 0,1%, pH 7,4). Se resuspendieron  $1,0 \times 10^7$  células/ml en el tampón de fijación que contiene azida de sodio y citocalasina B. La <sup>125</sup>I-EPO (5,0 nM) se añadió a las células y se incubó durante 2,5 horas. La actividad inespecífica se valoró por la adición de una cantidad de 300 veces de EPO sin marcar. Después de la incubación, la suspensión celular se  
15 centrifugó sobre un gradiente de ninolilo:dinonilo (60:40). Los sedimentos se congelaron instantáneamente en un baño de hielo seco con etanol. Se extrajo la fase oleosa y se contó a radioactividad en un contador de centelleo.

##### Tratamiento

Grupo	Líneas celulares	Receptores expresados	Tratamiento
1	Control	EpoR/EphB4	Ninguno
2	sh EpoR	EphB4	Ninguno
3	shEphB4	EpoR	Ninguno

##### Criterios de valoración

20 Definición: Cambios relativos de la radioactividad medida.

Mediciones: Cantidad de radioactividad (<sup>125</sup>I-EPO) fijada a las células cancerosas que expresan diferentes receptores en la superficie celular.

##### Resultados:

25 La figura 30 muestra que la fijación de la <sup>125</sup>I-EPO a las células de cáncer de ovario depende de la expresión de EpoR y EphB4.

##### Ejemplo 15

La EPO induce la activación de Stat3 en las células cancerosas que expresan la EphB4

##### Propósito del estudio y resumen de los resultados

30 El objetivo de este estudio fue el de dar a conocer pruebas para las vías de señalización inducidas por la EPO que no son activadas por el receptor canónico de la EPO, sino más bien mediadas por el nuevo receptor de la EPO, el EphB4. Hallamos que la activación de EphB4 por la EPO induce la activación de Stat-3. En cambio, la activación de EpoR debida a la EPO induce la activación de Jak-2/Stat-5, como se esperaba. Además, evaluamos si había una interacción directa entre EphB4 y Stat-3. No había coprecipitación entre estas dos moléculas, lo que sugiere que no hay una interacción directa. Sin embargo, la coprecipitación de EphB4 y src demostró que ambas interaccionan tras  
35 la estimulación de la EPO. Así pues, nuestro modelo propone que la activación de EphB4 por la EPO induce la src y a continuación la Stat-3.

##### Métodos

40 Se generaron líneas celulares tal y como se describe en el ejemplo 13. Las células se hicieron crecer hasta que la confluencia era del 50 al 70%. Se dejaron sin suero durante una noche. Después se le añadió EPO (50 U/ml) a cada placa en diferentes momentos temporales (0, 1, 3, 5 y 10 minutos). Tras la exposición, las células se lavaron con PBS enfriado en hielo y las células se levantaron con EDTA (0,01%). Después del lavado con PBS, se lisó el sedimento con el tampón de lisis que contiene inhibidores de las proteasas. Después de la cuantificación de las proteínas, los geles de acrilamida se cargaron con 50 µg de proteína por carril y se migraron durante 2 horas. A continuación, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se bloquearon, y se incubaron a 4 °C

durante una noche con el anticuerpo primario (dilución de 1:1.000). Tras el lavado, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario y a continuación se expuso al ECL.

Tratamiento

Carril	Línea celular	Tratamiento	Tiempo de la estimulación (min)
1	shEpoR	Ninguno	0
2		EPO (50/ml)	1
3		EPO (50/ml)	3
4		EPO (50/ml)	5
5		EPO (50/ml)	10

5 Criterios de valoración

Definición: Cambios relativos de la fosforilación de Stat3.

Mediciones: Análisis por transferencia de tipo Western seguido del análisis densitométrico para cuantificar la cantidad de proteína Stat3 fosforilada en el lisado de las células cancerosas.

Resultados

10 En la figura 31 se muestra la identificación de los mediadores activados por la EPO a través de los receptores EphB4 y EpoR. Mientras tanto, en la figura 32 se describe la evolución temporal de la activación de Stat3 inducida por la EPO en las células cancerosas, que incluye la cuantificación densitométrica de la activación de Stat3. En la figura 33 se muestra la posible interacción entre EphB4 y Stat-3. En la figura 34 se evalúa la interacción entre EphB4/src y EphB4/Jak-2.

15 Ejemplo 16

Análisis de la expresión de EPO/EphB4 en las muestras de tumor de ovario

Propósito del estudio y resumen de los resultados

Estos estudios se orientaron a la validación y normalización de la estrategia inmunohistoquímica para la detección EphB4 y EpoR en tejido tumoral antes de los estudios clínicos retrospectivos.

20 Se definió con éxito un protocolo para la tinción y puntuación de las muestras tumorales de cáncer de ovario mediante el uso de la IHQ.

Métodos y resultados

25 El análisis inmunohistoquímico de EphB4 y EpoR se llevó a cabo en especímenes de cáncer de ovario epitelial de 4 µm de grosor incluidas en parafina y fijadas con formol. Los cortes se desparafinaron con xileno y concentraciones decrecientes de etanol, y se rehidrataron con PBS. La recuperación del antígeno de EphB4 se realizó con Diva Decloaker a 1× (Biocare Medical, Concord, CA) en un chorro de vapor durante 40 minutos seguido de un enfriamiento de 20 minutos a temperatura ambiente. La recuperación del antígeno de EpoR se realizó con Borg Decloaker 1× (Biocare Medical) con calor (125 °C) y presión durante 4 minutos seguido de un enfriamiento de 60 minutos a temperatura ambiente. Después de la recuperación del antígeno, todos los cortes se lavaron con PBS.

30 Las peroxidasas endógenas se bloquearon con peróxido de hidrógeno al 3% en PBS durante 12 minutos a temperatura ambiente seguido de un bloqueo inespecífico de proteínas, bien con SAB al 5% en TBST durante 10 minutos a temperatura ambiente para la EphB4, o bien con suero de caballo normal al 5% durante 20 minutos a temperatura ambiente para el EPOR. A continuación, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario contra la EphB4 (monoclonal de ratón contra la de humano, dilución de 1:500, Abcam, Cambridge, MA) o contra el EpoR (monoclonal de ratón biotinilado contra la de humano, dilución de 1:25, R&D Systems, Minneapolis, MN) en la correspondiente solución de bloqueo durante una noche a 4 °C. Se realizó la amplificación secundaria con el uso del sistema de detección de polímeros MACH4 (EphB4: Biocare Medical), o bien el marcador estreptavidina 4plus AP (EpoR: Biocare Medical). Se consiguió la visualización con 3,3'-diaminobezidina (DAB; Open Biosystems, Huntsville, AL). Los cortes se contratiñeron con hematoxilina n.º 2 de Gill (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), se lavaron con PBS

35 durante 1 minuto y se montaron con Universal Mount (Research Genetics, Huntsville, AL).

Las muestras clínicas se puntuaron según la tinción con los anticuerpos contra EphB4 y EpoR con la determinación semicuantitativa de la expresión al valorar la puntuación de histología, HSCORE =  $\sum P_i (i + 1)$ ; donde i es la

intensidad de la tinción, calculada sobre la base de la estimación de los porcentajes de las células epiteliales teñidas positivamente en cada una de las 4 categorías de la intensidad (0, 1+, 2+ y 3+).  $P_i$  es el porcentaje de células epiteliales teñidas para cada intensidad, que varía del 0 al 100%, y 1 es una corrección para la densidad óptica. Los cortes teñidos fueron puntuados por dos investigadores basándose en la puntuación histoquímica (en donde se dice que es alta una puntuación de  $>100$ , y  $\leq 100$  se dice que es expresión baja), de acuerdo con el método descrito por McCarty et al. [PMID: 3893381 y 17532033], que considera tanto la intensidad de la tinción como el porcentaje de células teñidas.

#### Resultados

En la figura 35 se da a conocer un análisis inmunohistoquímico de la expresión de EpoR (fila superior) y de EphB4 (fila inferior) en los tumores de cáncer de ovario, que muestra ejemplos de niveles altos de expresión (HSCORE  $> 100$ ) frente a niveles bajos de expresión (HSCORE  $\leq 100$ ). En la figura 36 se da a conocer un análisis inmunohistoquímico de la expresión de EPOR (fila superior) y EphB4 (fila inferior) en los tumores de cáncer de mama, que muestran ejemplos de niveles altos de expresión (HSCORE  $> 100$ ) frente a niveles bajos de expresión (HSCORE  $\leq 100$ ).

#### Ejemplo 17

Efecto del tratamiento con la EPO sobre la supervivencia de las pacientes con cáncer de ovario

#### Propósito del estudio y resumen de los resultados

Hemos valorado adicionalmente la eficacia de utilizar la expresión de EPH-B4 como un tratánóstico para seleccionar pacientes idóneos para el tratamiento con la eritropoyetina (EPO). Con este propósito, evaluamos si la expresión de EPH-B4 en las células tumorales se correlaciona con la tasa de supervivencia de las pacientes con cáncer que reciben la EPO para el tratamiento de la anemia. Hallamos que las pacientes que expresan la EPH-B4 experimentaban una tasa de supervivencia más baja cuando se trataban con la EPO. Mientras tanto, el tratamiento con la EPO no tenía ningún efecto sobre la tasa de supervivencia de las pacientes que no expresan la EPH-B4.

#### Métodos y resultados

Mediante el uso de los métodos histoquímicos, se examinó la presencia de EPH-B4 en los tumores de cáncer de ovario de 175 pacientes.

(A) En un aspecto, la presencia de expresión de EPH-B4 se definió mediante la fórmula  $P \times C$ , en donde P es el porcentaje de células de dicha muestra que muestran niveles detectables de la proteína EPH-B4, y C es la concentración relativa de la proteína EPH-B4 en dichas células, en donde se le asigna una puntuación de 0, 1, 2, 3 o 4 a una muestra que comprende un porcentaje de células que muestran niveles detectables de la proteína EPH-B4 de, respectivamente, 0%,  $<25\%$ , 25-50%, 50-75% y 75-100%, en donde se asigna una puntuación de 1, 2 o 3 a concentraciones relativas de la proteína EPH-B4 de, respectivamente, débil, moderada y fuerte, y en donde un producto resultante de  $>3$  denota la expresión de EPH-B4 en la muestra. Se valoró la tasa de supervivencia de estas pacientes con y sin el tratamiento con la EPO que depende de la expresión de EPH-B4.

#### Resultados

Los resultados se dan a conocer en las figuras 37 y 38.

En las figuras, una línea verde (a saber, EPOTX\_DX = 1) señala las pacientes que recibieron el tratamiento con la EPO, mientras que una línea azul (a saber, EPOTX\_DX = 0) señala las pacientes que no lo recibieron. El eje X representa el seguimiento de la paciente en años, mientras que el eje Y representa la supervivencia acumulada (número de pacientes vivos dividido por el tamaño de la cohorte original: p. ej., 0,5 = 50% vivos).

Los datos demuestran espectacularmente que la expresión de EPH-B4 afecta negativamente a la supervivencia de las pacientes que reciben el tratamiento con la EPO. Véase la figura 37. Por el contrario, la supervivencia de las pacientes no se ve afectada por una ausencia de EPH-B4. Véase la figura 38. En consecuencia, los datos demuestran que la idoneidad de la paciente para el tratamiento con la EPO se puede determinar mediante la valoración del nivel de expresión de EPH-B4 en la paciente.

(B) En otro aspecto, las muestras clínicas se puntuaron por la tinción con los anticuerpos contra EphB4 y EpoR, cuya expresión se determinó semicuantitativamente al valorar la puntuación de la histología, HSCORE =  $\sum P_i (i + 1)$ ; en donde i es la intensidad de la tinción, calculada sobre la base de la estimación de los porcentajes de células epiteliales teñidas positivamente en cada una de las 4 categorías de intensidad (0, 1+, 2+ y 3+).  $P_i$  es el porcentaje de células epiteliales teñidas para cada intensidad, que varía del 0 al 100%, y 1 es una corrección para la densidad óptica. Los cortes teñidos fueron puntuados por dos investigadores basándose en la puntuación histoquímica (en donde se define que una puntuación de  $>100$  es expresión alta, y  $\leq 100$  es expresión baja), de acuerdo con el método descrito por McCarty et al. [PMID: 3893381 y 17532033], que tiene en cuenta tanto la intensidad de la tinción como el porcentaje de células teñidas.

Resultados

En la tabla 8 se muestran las características demográficas y clínicas de la población del estudio por la expresión de EphB4 baja/alta, y en la tabla 9 se muestran las características demográficas y clínicas por la expresión de EpoR baja/alta.

5 Tabla 8. Características demográficas y clínicas por la expresión de EPH-B4 baja/alta

<b>Característica</b>	<b>Todos los pacientes (N = 175)</b>	<b>EphB4 baja (N = 106)</b>	<b>EphB4 alta (N = 69)</b>	<b>Valor de P</b>
<b>Diagnóstico</b>				0,2484
Ovario	160 (92,49%)	94 (90,38%)	66 (95,65%)	
Peritoneo	13 (7,51%)	10 (9,62%)	3 (4,35%)	
<b>Estadio</b>				0,4051
Estadio I	6 (3,43%)	5 (4,72%)	1 (1,45%)	
Estadio II, III, IV	169 (96,57%)	101 (95,28%)	68 (98,55%)	
<b>Grado</b>				0,0622
Grado bajo	16 (9,20%)	6 (5,71%)	10 (14,49%)	
Grado alto	158 (90,80%)	99 (94,29%)	59 (85,51%)	
<b>Histología</b>				1,0000
Serosa	149 (85,14%)	90 (84,91%)	59 (85,51%)	
Otra	26 (14,86%)	16 (15,09%)	10 (14,49%)	
<b>Ascitis</b>				0,6325
Ninguna	71 (42,01%)	43 (40,57%)	28 (44,44%)	
Sí	98 (57,99%)	63 (59,43%)	35 (55,56%)	
<b>Citorreducción</b>				0,1023
Subóptima	58 (33,14%)	30 (28,30%)	28 (40,58%)	
Óptima	117 (66,86%)	76 (71,70%)	41 (59,42%)	
<b>CA125</b>				0,0818
N	143	96	47	
Media (DE)	2.188,75 (5.567,64)	2.102,76 (5.824,58)	2.364,39 (5.057,71)	
Mediana	560,7	476	833	
Mín.-Máx.	7,5-50.000	7,5-50.000	50-32.680	
<b>Edad</b>				<b>0,0292</b>
N	175	106	69	
Media (DE)	58,20 (11,98)	59,89 (11,15)	55,60 (12,80)	
Mediana	58	59	56	
Mín.-Máx.	20-92	20-92	26-88	

Característica	Todos los pacientes (N = 175)	EphB4 baja (N = 106)	EphB4 alta (N = 69)	Valor de P
<b>Raza</b>				0,8385
Blanca	145 (82,86%)	87 (82,08%)	58 (84,06%)	
Otra	30 (17,14%)	19 (17,92%)	11 (15,94%)	
<b>EPOR</b>				0,1290
EpoR baja	37 (21,14%)	18 (16,98%)	19 (27,54%)	
EpoR alta	138 (78,86%)	88 (83,02%)	50 (72,46%)	

Tabla 9. Características demográficas y clínicas por la expresión de EPOR baja/alta

Característica	Todos los pacientes (N = 175)	EpoR baja (N = 37)	EpoR alta (N = 138)	Valor de P
<b>Diagnóstico</b>				0,4745
Ovario	160 (92,49%)	32 (88,89%)	128 (93,43%)	
Peritoneo	13 (7,51%)	4 (11,11%)	9 (6,57%)	
<b>Estadio</b>				0,6080
Estadio I	6 (3,43%)	2 (5,41%)	4 (2,90%)	
Estadio II, III, IV	169 (96,57%)	35 (94,59%)	134 (97,10%)	
<b>Grado</b>				0,3290
Grado bajo	16 (9,20%)	5 (13,89%)	11 (7,97%)	
Grado alto	158 (90,80%)	31 (86,11%)	127 (92,03%)	
<b>Histología</b>				0,7969
Serosa	149 (85,14%)	31 (83,78%)	118 (85,51%)	
Otra	26 (14,86%)	6 (16,22%)	20 (14,49%)	
<b>Ascitis</b>				1,0000
Ninguna	71 (42,01%)	14 (41,18%)	57 (42,22%)	
Sí	98 (57,99%)	20 (58,82%)	78 (57,78%)	
<b>Citorreducción</b>				0,8446
Subóptima	58 (33,14%)	13 (35,14%)	45 (32,61%)	
Óptima	117 (66,86%)	24 (64,86%)	93 (67,39%)	
<b>CA125</b>				0,3349
N	143	24	119	
Media (DE)	2.188,75 (5.567,64)	1.050,73 (1.461,49)	2.418,27 (6.047,36)	
Mediana	560,7	438	569,3	
Mín.-Máx.	7,5-50.000	16-5.028)	7,5-50.000	

Característica	Todos los pacientes (N = 175)	EpoR baja (N = 37)	EpoR alta (N = 138)	Valor de P
<b>Edad</b>				0,0759
N	175	37	138	
Media (DE)	58,20 (11,98)	55,14 (13,19)	59,02 (11,55)	
Mediana	58	55	59	
Mín.-Máx.	20-92	26-88	20-92	
<b>Raza</b>				<b>0,0120</b>
Blanca	145 (82,86%)	25 (67,57%)	120 (86,96%)	
Otra	30 (17,14%)	12 (32,43%)	18 (13,04%)	
<b>EPH-B4</b>				0,1290
EphB4 baja	106 (60,57%)	18 (48,65%)	88 (63,77%)	
EphB4 alta	69 (39,43%)	19 (51,35%)	50 (36,23%)	

Tabla 10. Resumen de la estadística para la supervivencia específica de la enfermedad

		N.º total de pac.	N.º de acontecim.	Tiempo medio hasta el acontecim. (años)	Prueba del rango logarítm.	Razón de riesgos	IC del 95%, razón de riesgos	Prueba de Wald	
EphB4	Expresión baja	106	39	7,39	<0,0001	3,70	1,47-9,30	<0,0001	
	Expresión alta	68	52	3,00					
EpoR	Expresión baja	37	22	5,88	0,6954	0,91	0,34-2,41	0,6956	
	Expresión alta	137	69	4,78					
EphB4 y EpoR	EpoR: Baja, EphB4: Baja	18	5	9,09	<0,0001	6,13	1,51-24,91	<b>0,0004</b>	
	EpoR: Baja, EphB4: Alta	19	17	2,67		1,65	0,42-6,45	0,2991	
	EpoR: Alta, EphB4: Baja	88	34	7,39		5,39	1,38-21,04	<b>0,0005</b>	
	EpoR: Alta, EphB4: Alta	49	35	3,29					
Tratamiento con la Epo (Todos los pacientes)	Sin tratar con la Epo	85	32	6,26	<b>0,0407</b>	1,57	0,62-3,98	<b>0,0424</b>	
	Tratamiento con la Epo	89	59	3,96					
Tratamiento con la Epo (Pacientes con la EphB4 alta)	Sin tratar con la EPO	25	15	4,52	<b>0,0004</b>	3,05	0,99-9,35	<b>0,0007</b>	
	Tratamiento con la EPO	43	37	2,18					

		N.º total de pac.	N.º de acontecim.	Tiempo medio hasta el acontecim. (años)	Prueba del rango logaritm.	Razón de riesgos	IC del 95%, razón de riesgos	Prueba de Wald
Tratamiento con la Epo (pacientes con la Epo alta)	Sin tratar con la Epo	73	27	5,28	0,1807	1,40	0,52-3,78	0,1827
	Tratamiento con la Epo	64	42	4,38				

Tabla 11. Modelo proporcional de regresión de riesgos para la supervivencia específica de la enfermedad y la supervivencia específica de la enfermedad a los 5 años

	Supervivencia específica de la enfermedad			Supervivencia específica de la enfermedad a los 5 años		
	HR	Valor de P	IC del 95%	HR	Valor de P	IC del 95%
EphB4 alta	4,53	<b>&lt;0,0001</b>	2,87-7,16	4,93	<b>&lt;0,0001</b>	2,94-8,27
EpoR alta	1,21	0,4696	0,72-2,02	1,38	0,2971	0,75-2,52
Grado alto	1,16	0,6826	0,57-2,38	1,69	0,2694	0,67-4,28
Citorreducción óptima	0,49	<b>0,0013</b>	0,32-0,76	0,46	<b>0,0015</b>	0,28-0,74
Edad	1,02	0,0530	1,00-1,04	1,02	0,0757	0,998-1,04

- 5 En las figuras 39 a 44 se presentan gráficamente los datos. Los datos demuestran espectacularmente que la expresión de EPH-B4 afecta negativamente a la supervivencia de las pacientes que reciben el tratamiento con la EPO. En consecuencia, los datos confirman que la idoneidad de una paciente para el tratamiento con la EPO se puede determinar con la valoración del nivel de expresión de EPH-B4 en la paciente.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un siRNA específico para EPH-B4 para ser usado en un método para realizar la eficacia del tratamiento con la EPO en un paciente con cáncer, en donde dicho método comprende la administración a dicho paciente, junto con el tratamiento con la EPO, de dicho siRNA específico para EPH-B4,
- en donde el siRNA
- 10 i) Se selecciona del grupo de ácidos nucleicos bicatenarios que consisten en la SEQ ID n.º 242 y SEQ ID n.º 243; SEQ ID n.º 244 y SEQ ID n.º 245; SEQ ID n.º 246 y SEQ ID n.º 247; SEQ ID n.º 248 y SEQ ID n.º 249; SEQ ID n.º 250 y SEQ ID n.º 251; SEQ ID n.º 252 y SEQ ID n.º 253; SEQ ID n.º 254 y SEQ ID n.º 255; SEQ ID n.º 256 y SEQ ID n.º 257; SEQ ID n.º 258 y SEQ ID n.º 259; y SEQ ID n.º 260 y SEQ ID n.º 261;
- o
- ii) Es una doble cadena de la SEQ ID n.º 266 y la SEQ ID n.º 267.
- 15 2. El siRNA para ser usado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el siRNA se selecciona del grupo de ácidos nucleicos bicatenarios que consisten en la SEQ ID n.º 242 y SEQ ID n.º 243; SEQ ID n.º 244 y SEQ ID n.º 245; SEQ ID n.º 246 y SEQ ID n.º 247; SEQ ID n.º 248 y SEQ ID n.º 249; SEQ ID n.º 250 y SEQ ID n.º 251; SEQ ID n.º 252 y SEQ ID n.º 253; SEQ ID n.º 254 y SEQ ID n.º 255; SEQ ID n.º 256 y SEQ ID n.º 257; SEQ ID n.º 258 y SEQ ID n.º 259; y SEQ ID n.º 260 y SEQ ID n.º 261.
- 20 3. El siRNA para ser usado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el siRNA es una doble cadena de la SEQ ID n.º 266 y la SEQ ID n.º 267.

FIG. 1

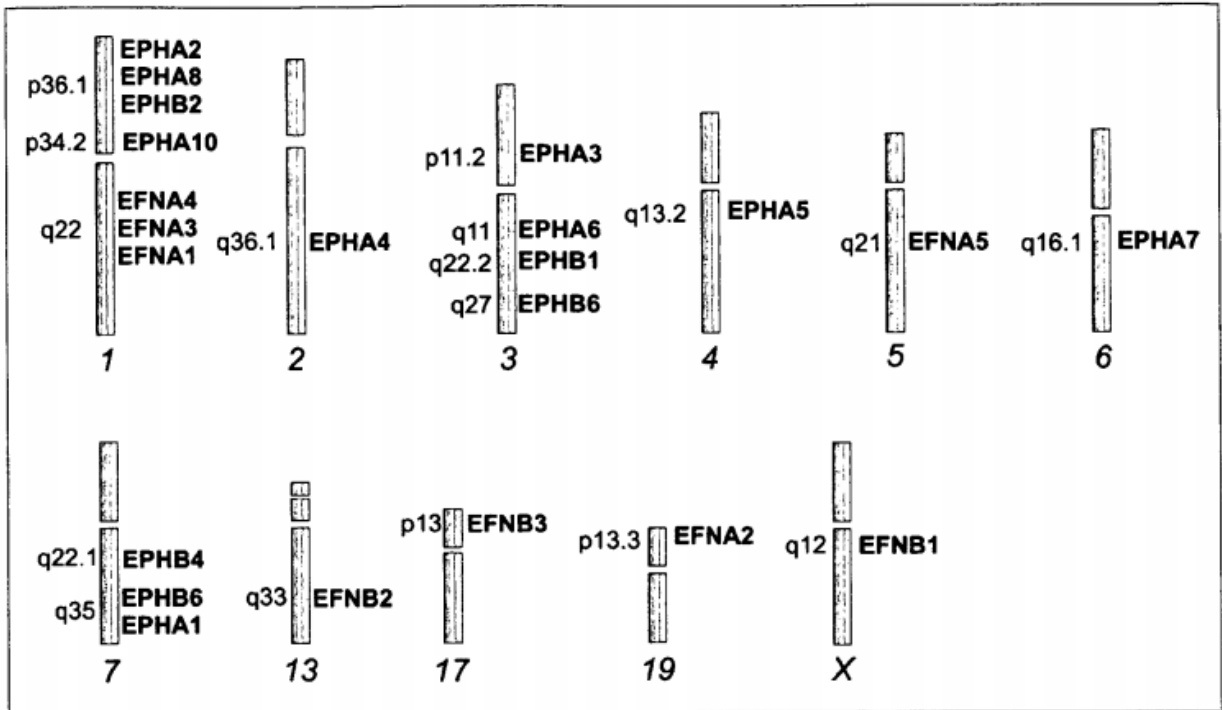
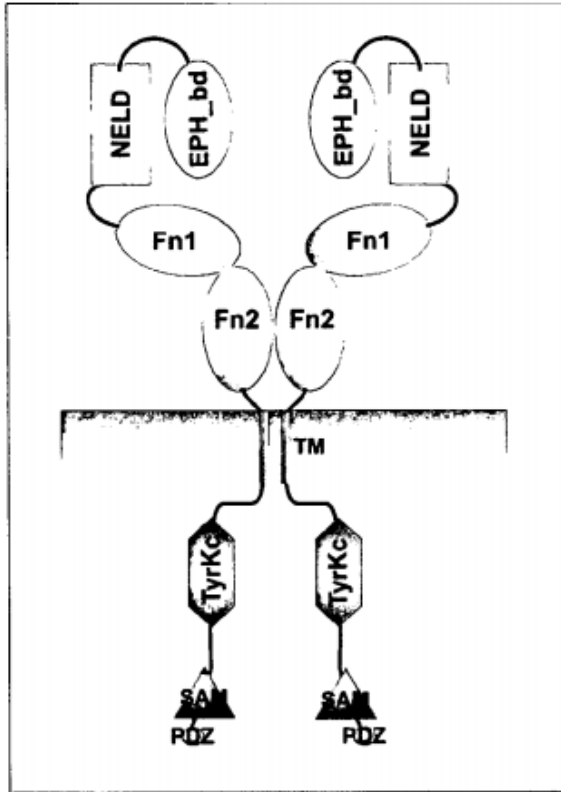


FIG. 2

Arquitectura de dominios del receptor EPH



Arquitectura de dominios de la efrina

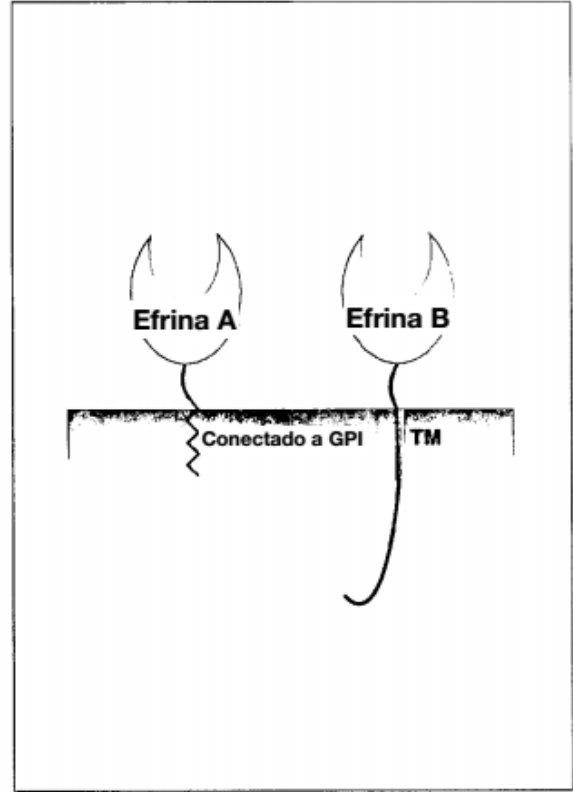


FIG. 3

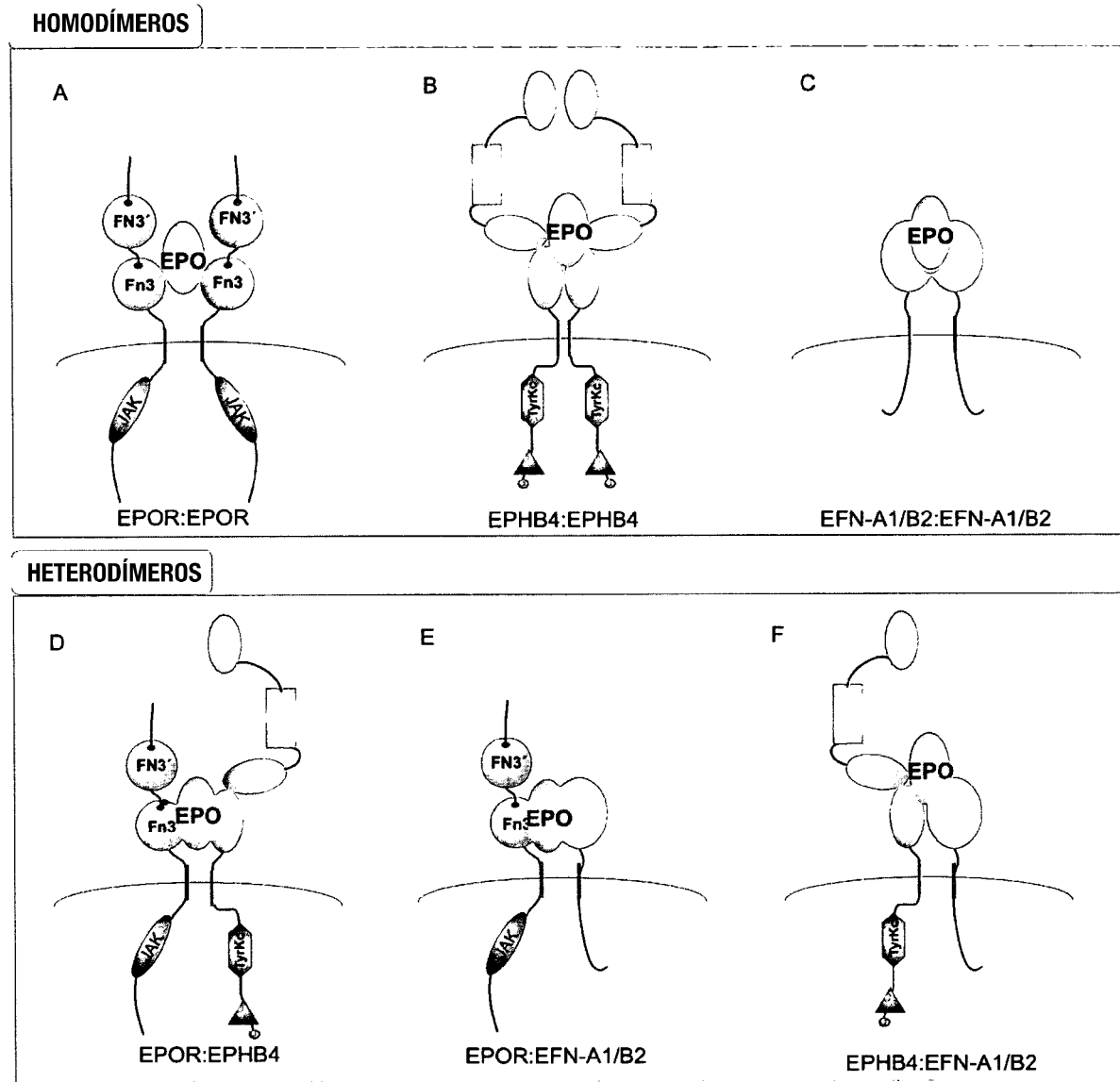


FIG. 4

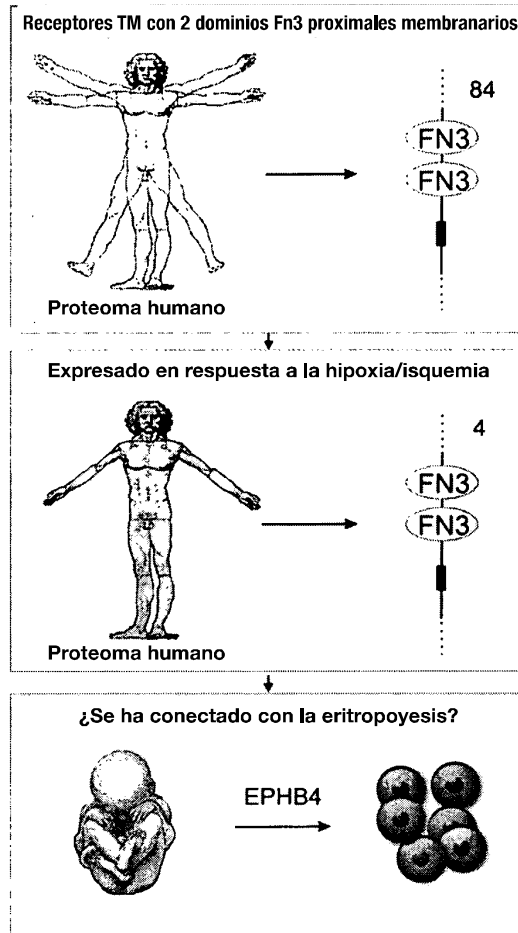


FIG. 5

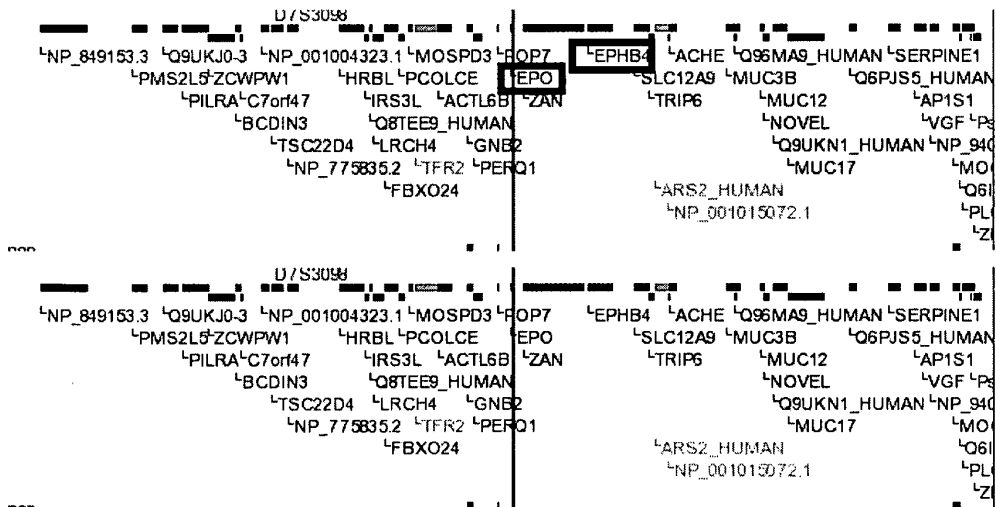


FIG. 6

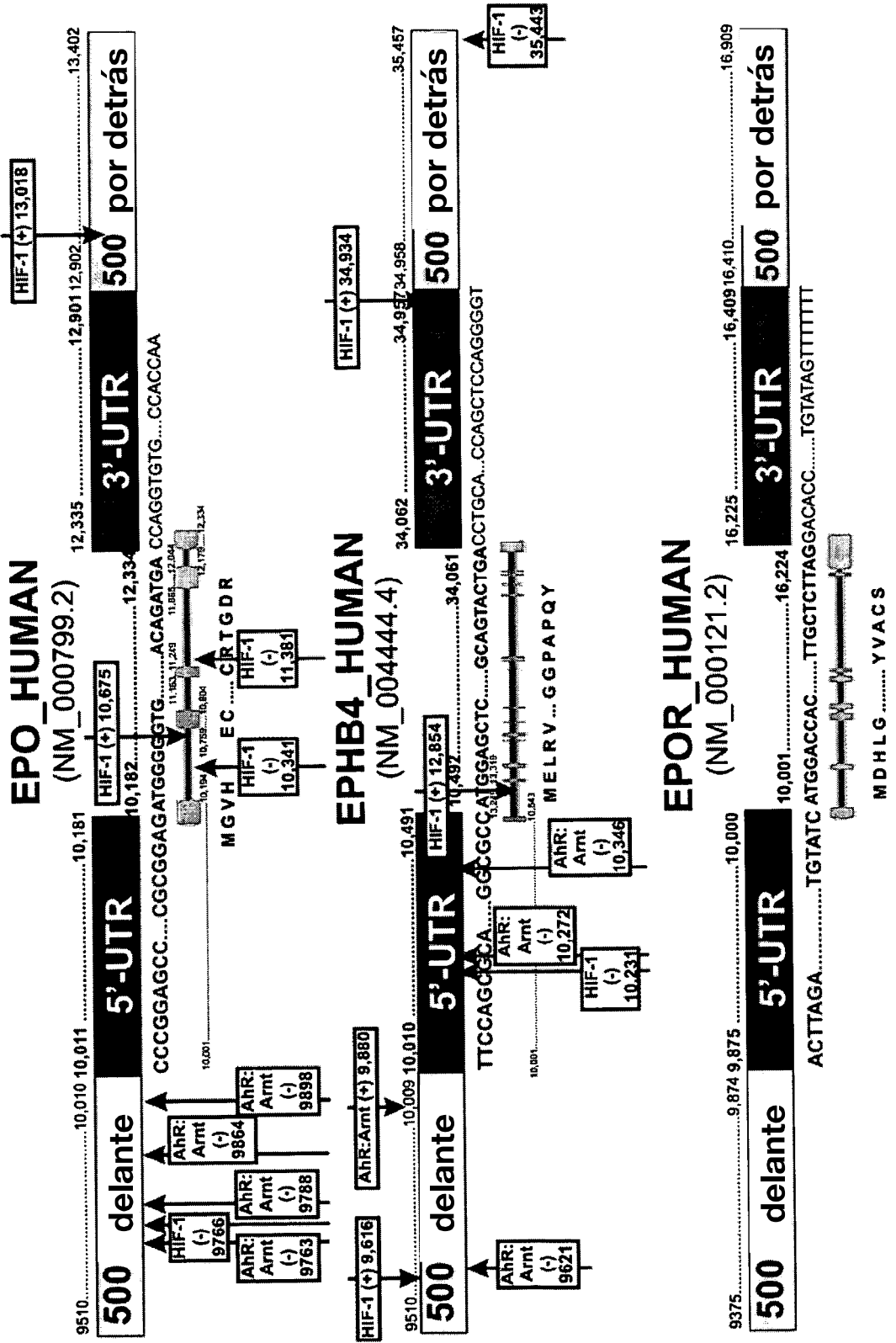


FIG. 7A

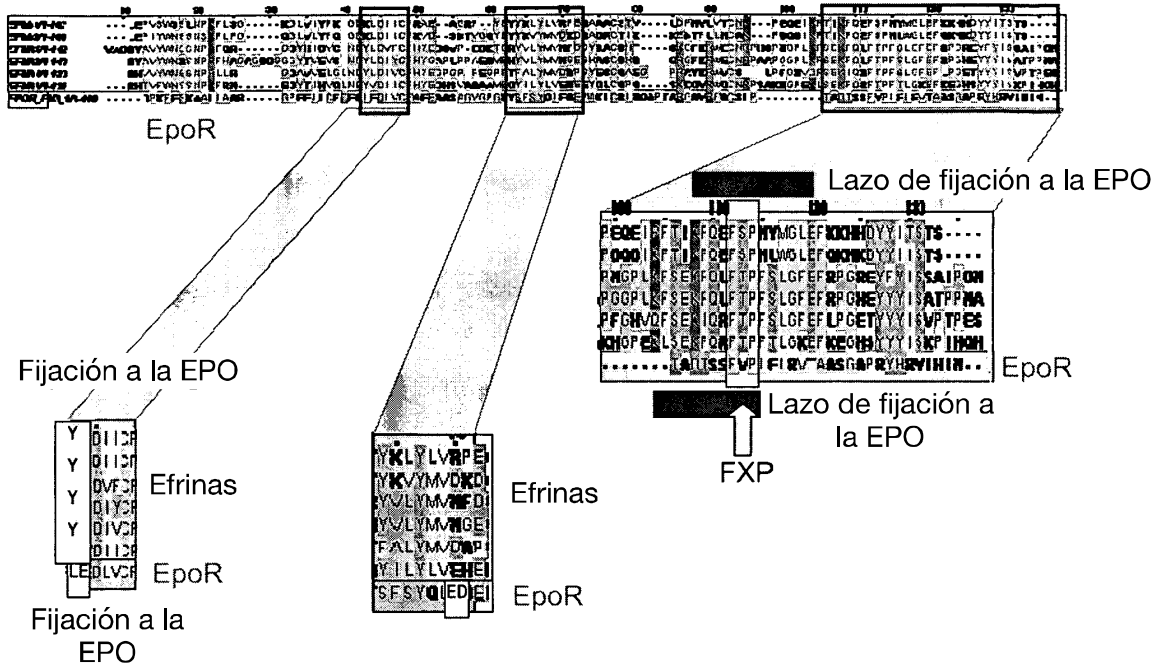


FIG. 7B

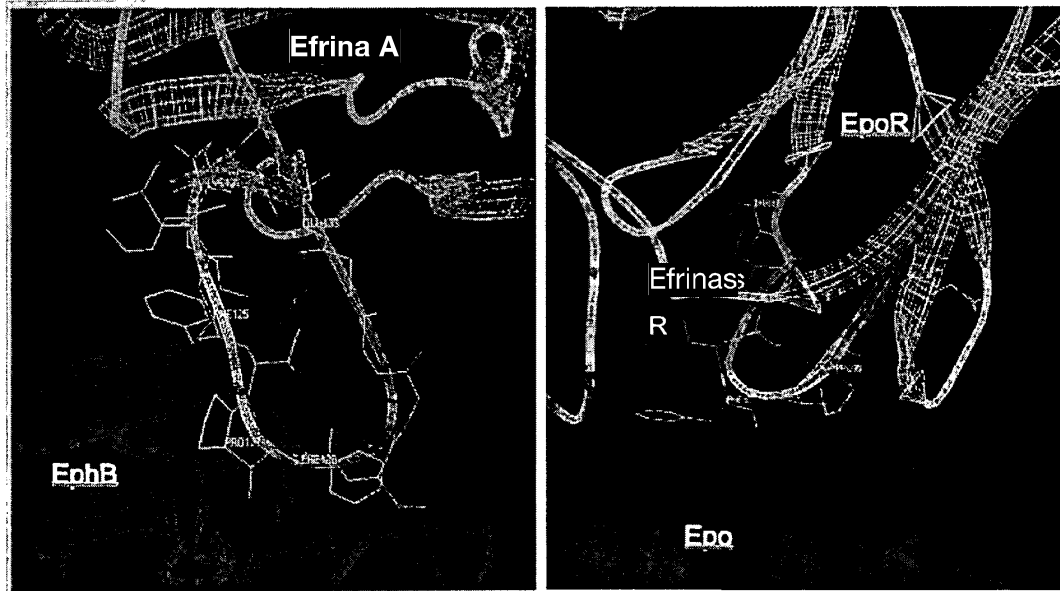


FIG. 8

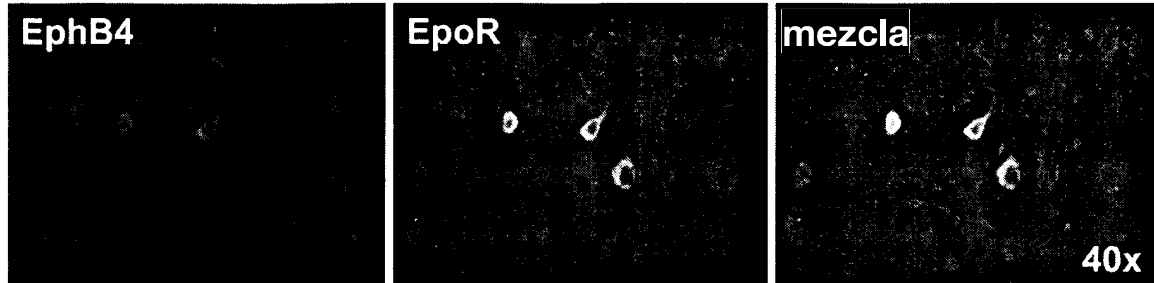


FIG. 9

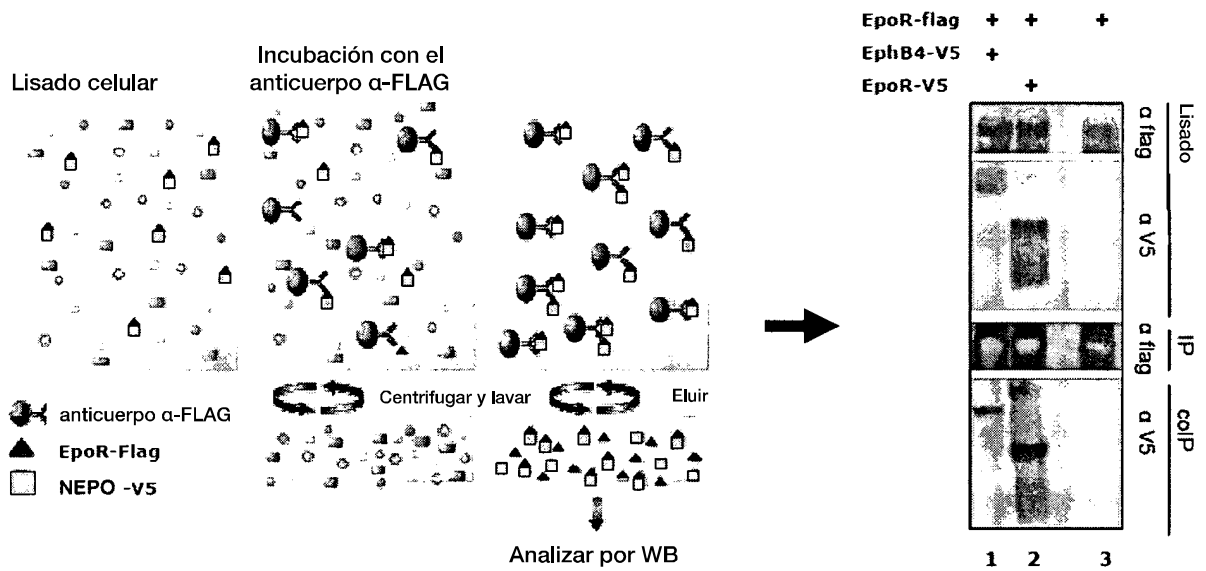


FIG. 10

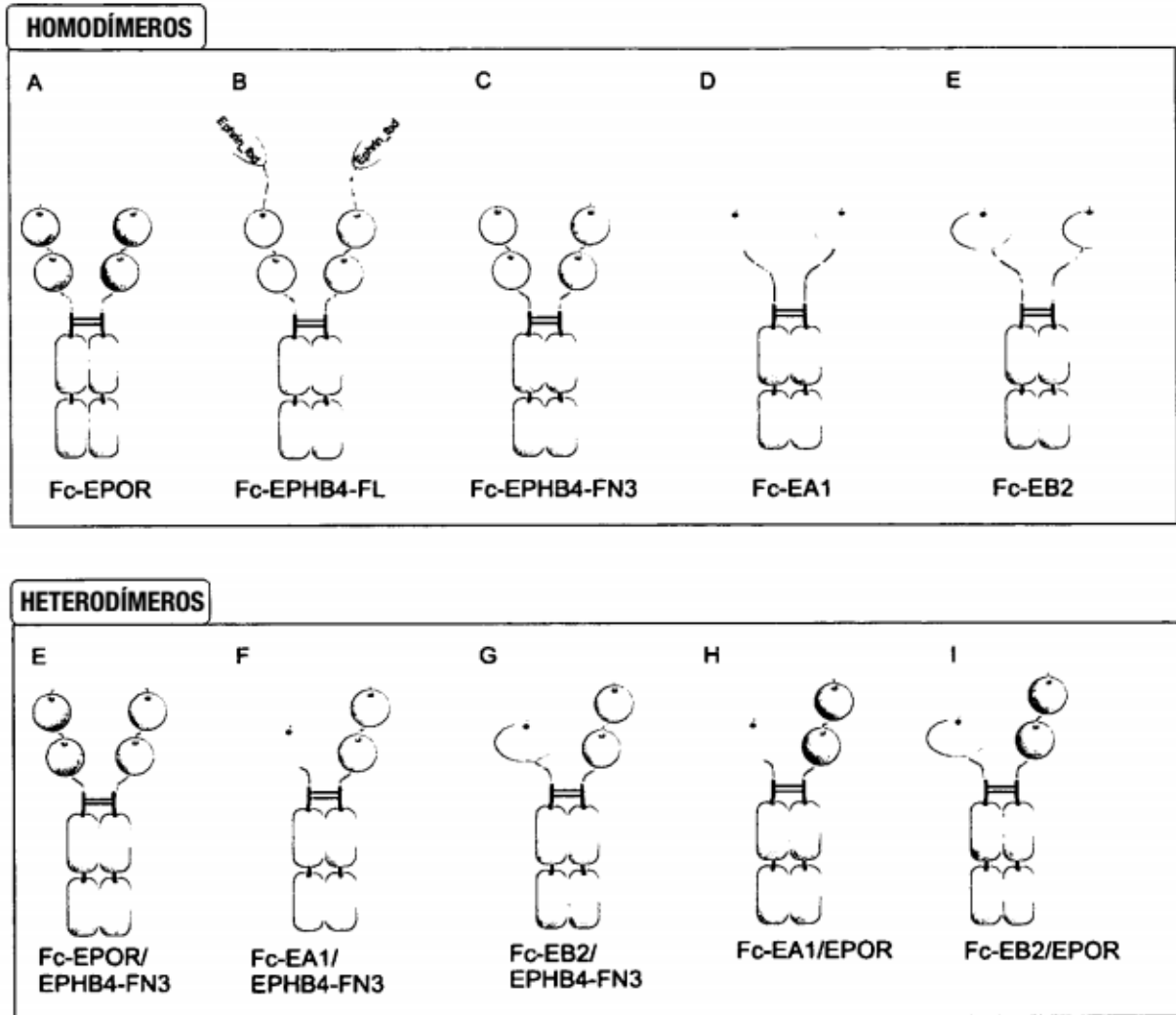


FIG. 11

SEQ ID NO:207	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T
SEQ ID NO:208	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T
SEQ ID NO:206	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T
SEQ ID NO:204	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T
SEQ ID NO:205	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T
SEQ ID NO:203	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T
SEQ ID NO:201	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T
SEQ ID NO:202	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T
SEQ ID NO:200	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T
SEQ ID NO:198	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T
SEQ ID NO:199	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T
SEQ ID NO:187	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T
SEQ ID NO:188	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T
SEQ ID NO:189	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T
SEQ ID NO:190	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T
SEQ ID NO:191	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T
SEQ ID NO:192	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T
SEQ ID NO:193	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T
SEQ ID NO:194	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T
SEQ ID NO:195	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T
SEQ ID NO:196	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T
SEQ ID NO:197	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T
Consensus/80%								
SEQ ID NO:241	PP LIG S VL YLL	ITT C	CSL	ITVP T V EX R N V	V VM L LLS VL	LIV SS PR PL L V	VS L SRTLL L	ISPP S PL TIT TP LP VWS ELA L LXT C T

A:PPRLICDSRYLAEKAKAVLITTCAGLHICSLAKMNTVYPTIKYHFAKRRREYCGQANFVQGGALLSEANLRGQALLVHSSQPPRPLQLEHFDKAVSGLSSTLLALHAGQKALISPPDAASAAADLRTITADTRKLFRRYVSNPLRGRKAKVYQELAKCTDGR

FIG. 12

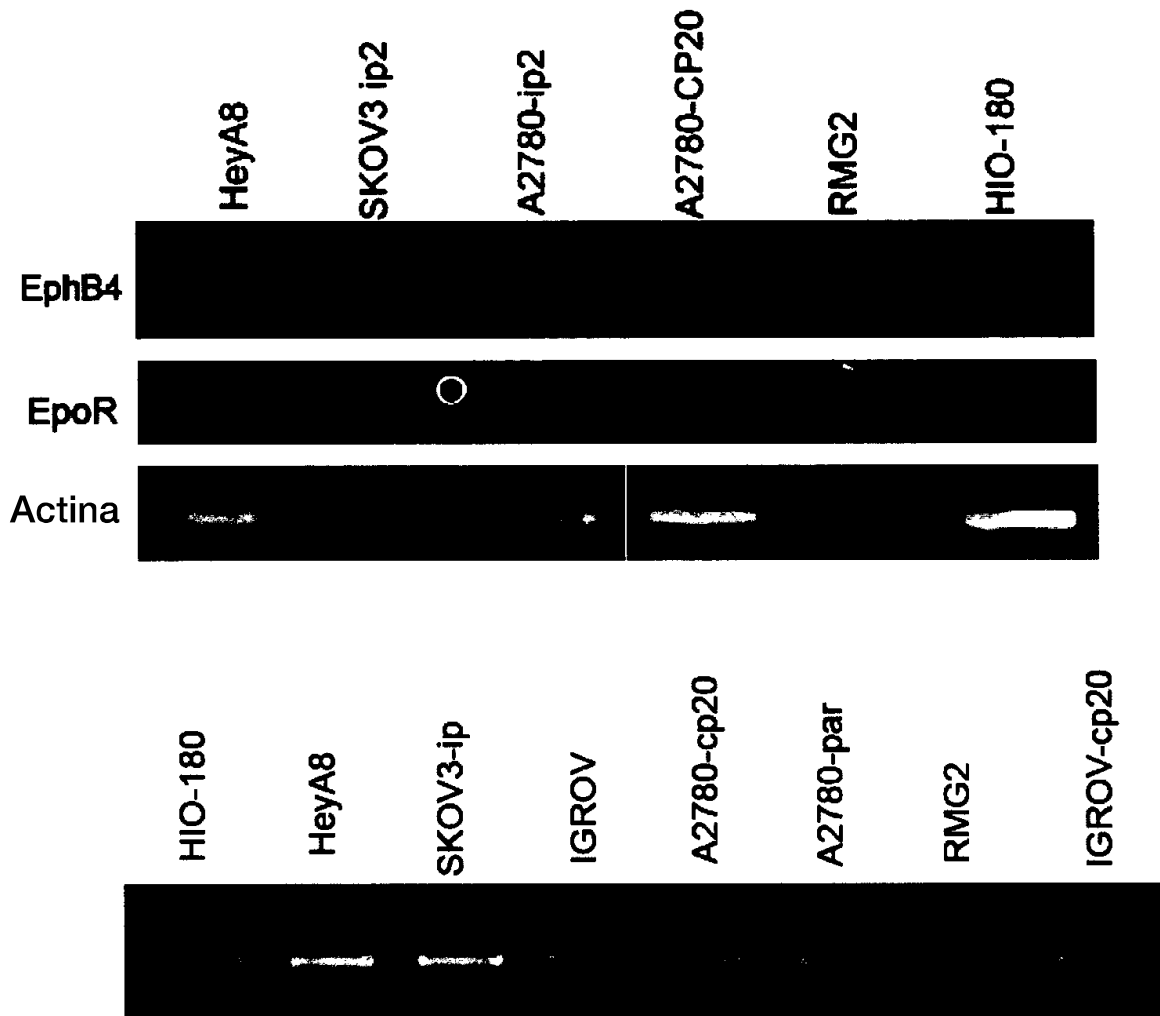


FIG 13.

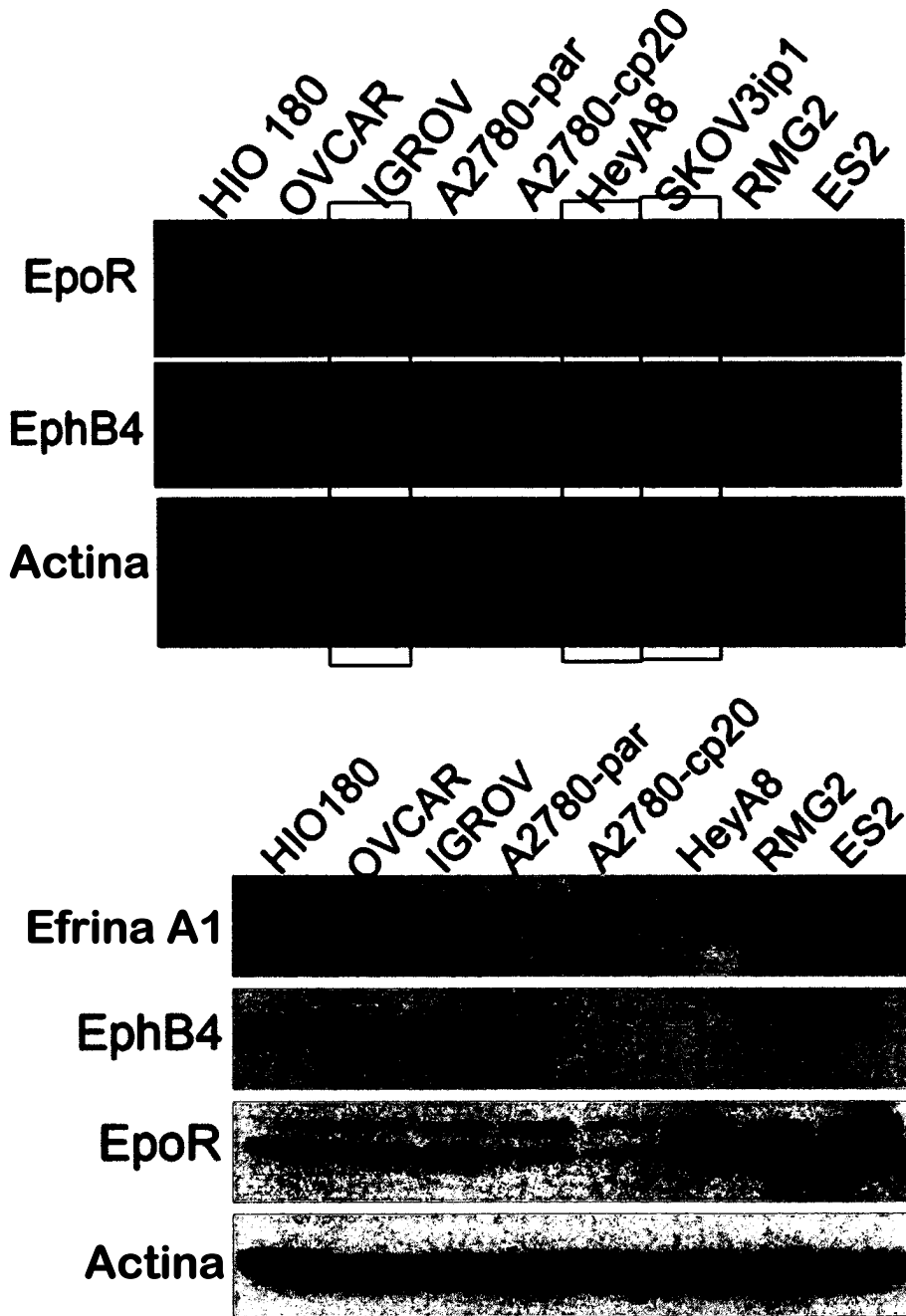


FIG. 14

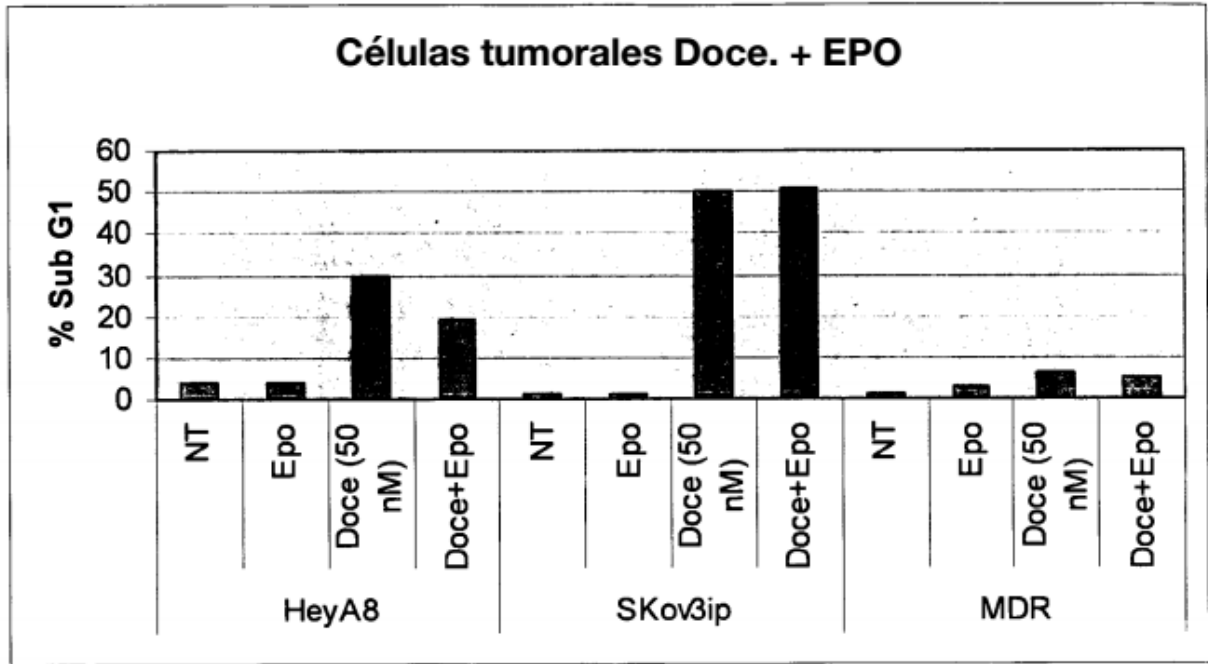
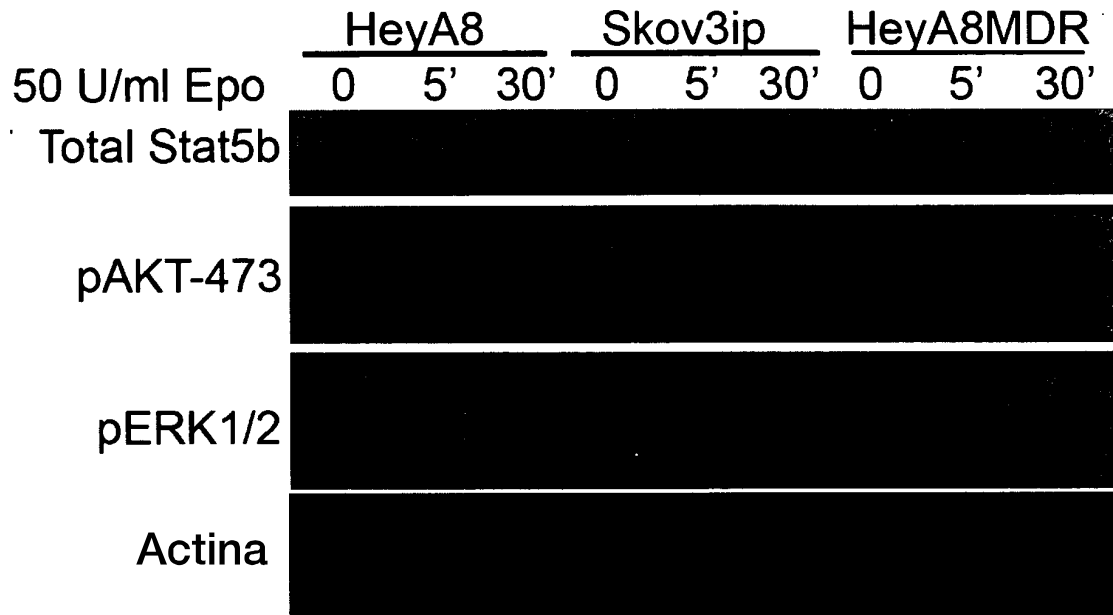
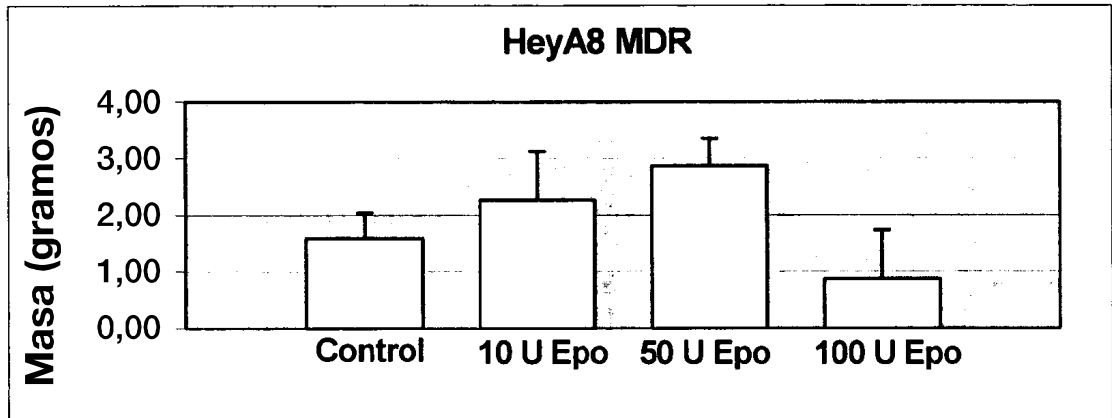


FIG. 15



Línea celular	EpoR	EphB4
Igrov	+	++
Skov3ip	0	++
HeyA8	++	0
HeyA8MDR	+++	+

FIG. 16



HeyA8-MDR  
Muestras de tumor de ratón

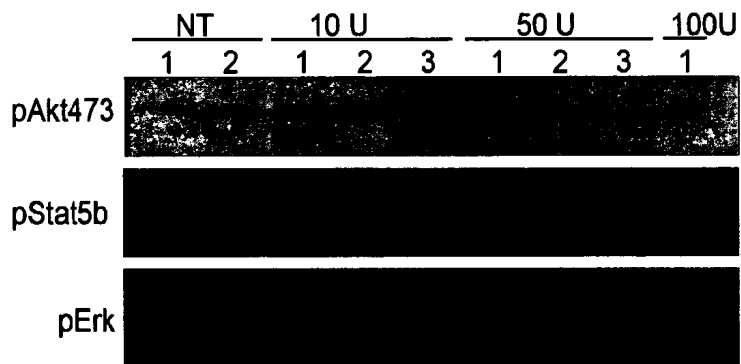
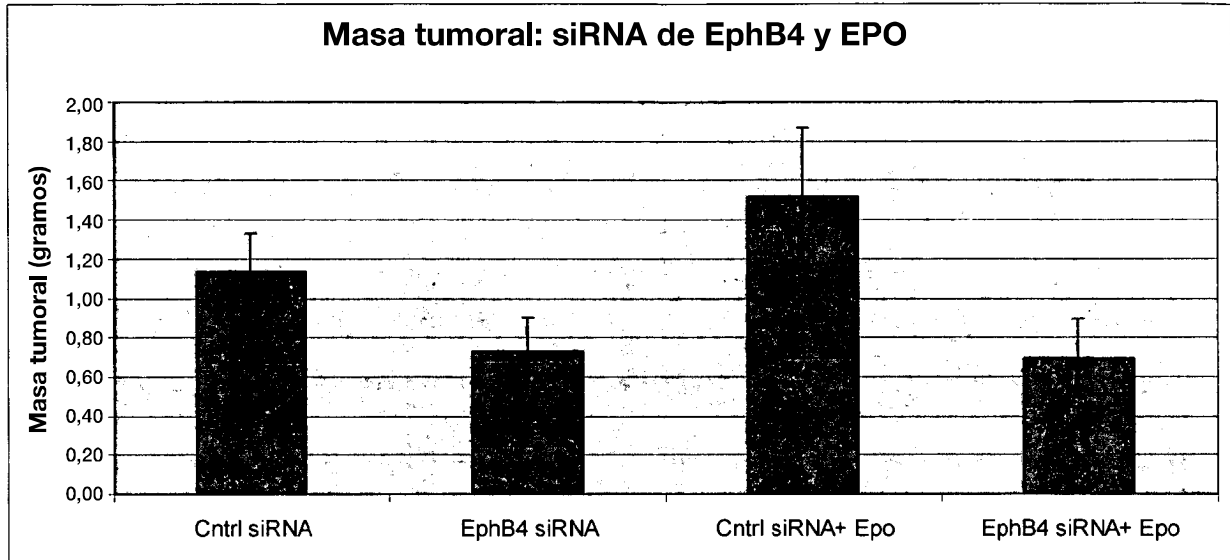


FIG. 17



Reducción porcentual		Prueba de la <i>t</i>
0,360976	1 v 2	0,065056
-0,33573	1 v 3	0,024091
-1,09027	2 v 3	0,024901
-0,19542	2 v 4	0,284385
0,428102	3 v 4	0,055284
0,236098	1 v 4	0,155481

FIG. 18

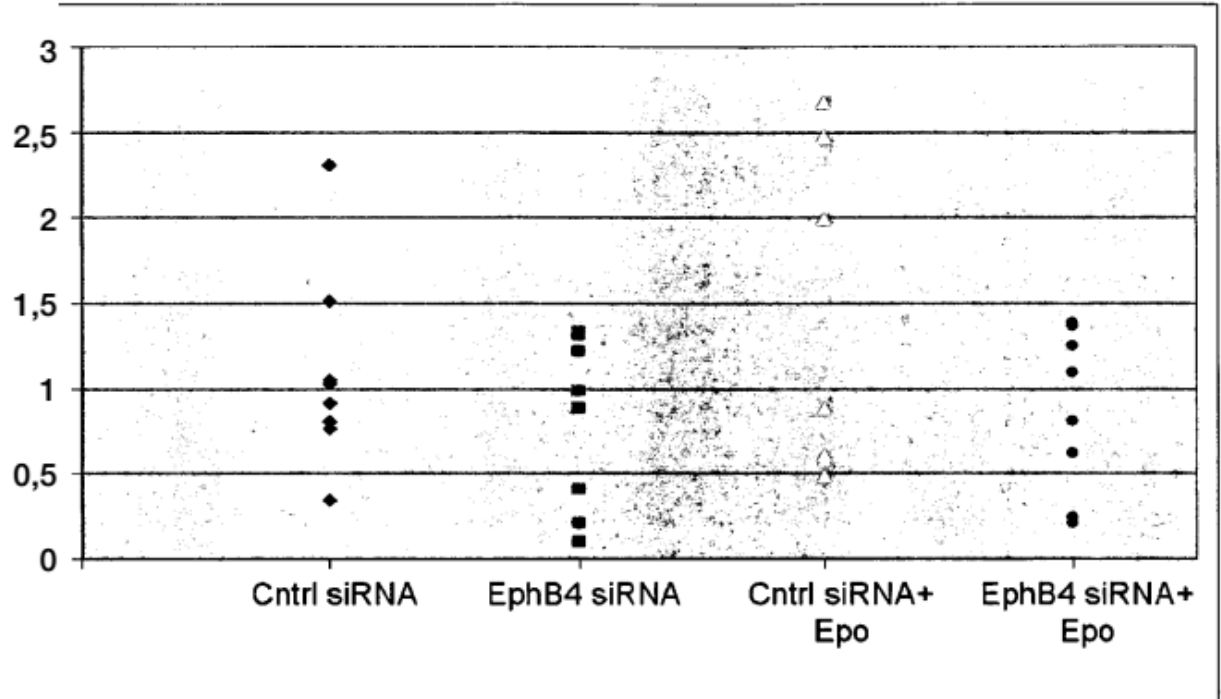


FIG. 19

Inmunoprecipitado - EphB4  
wb- Epo

	19G	HeyA8 MDR			A2780cp20				
MG132	--	--	--	+	--	--	+		
Epo	-	-	15'	30'	30'	-	15'	30'	30'
EphB4	[Redacted]								
Epo	[Redacted]								

FIG. 20

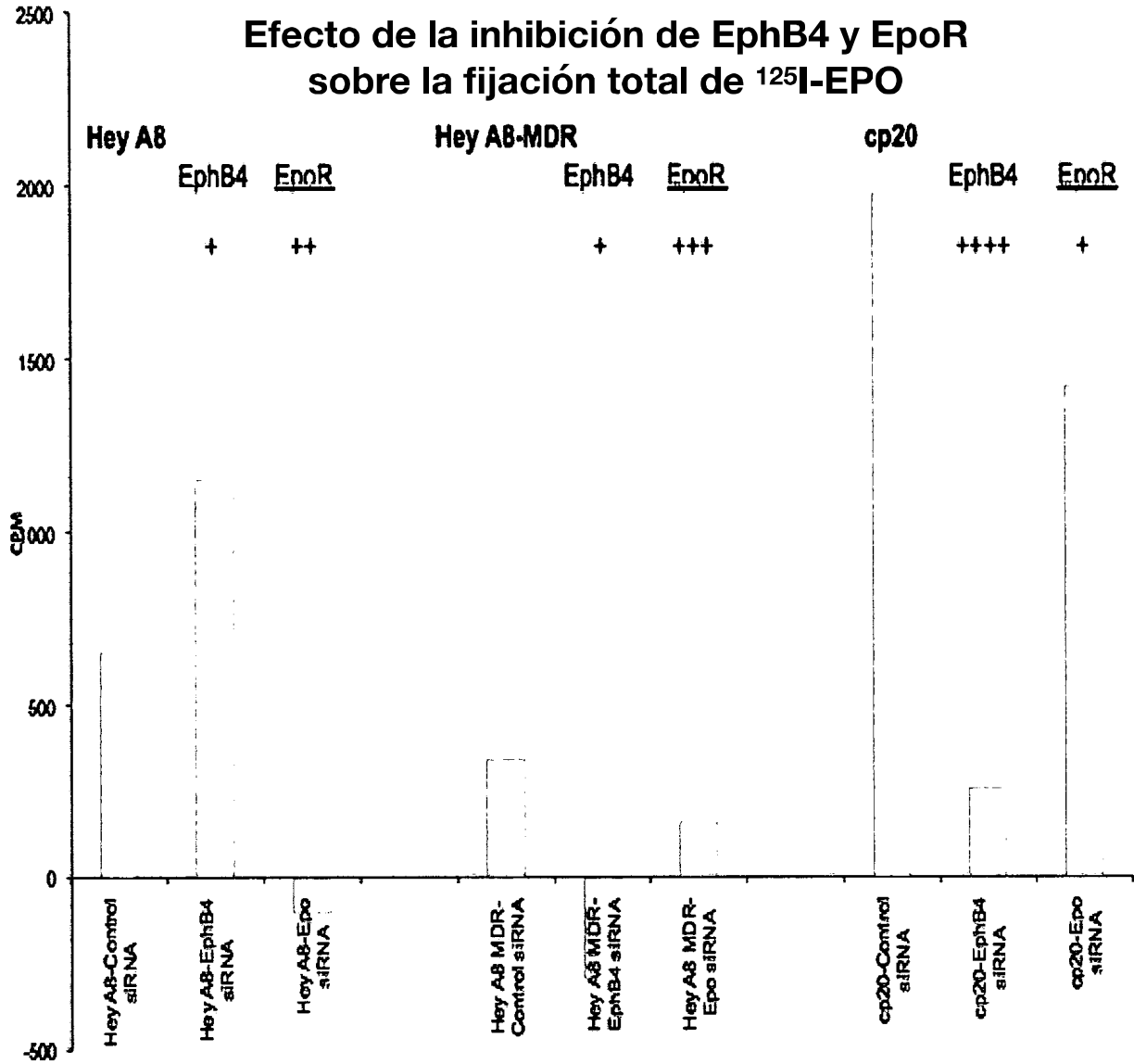
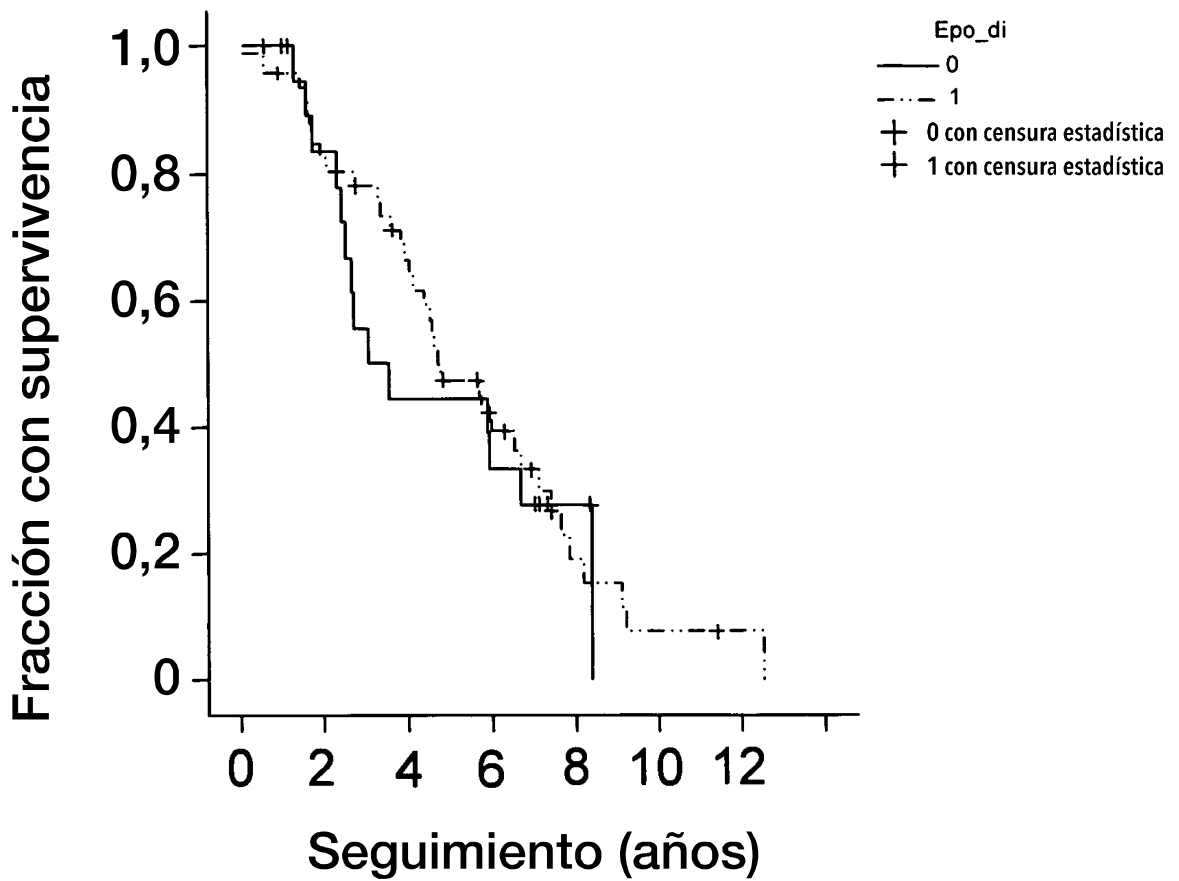


FIG. 21



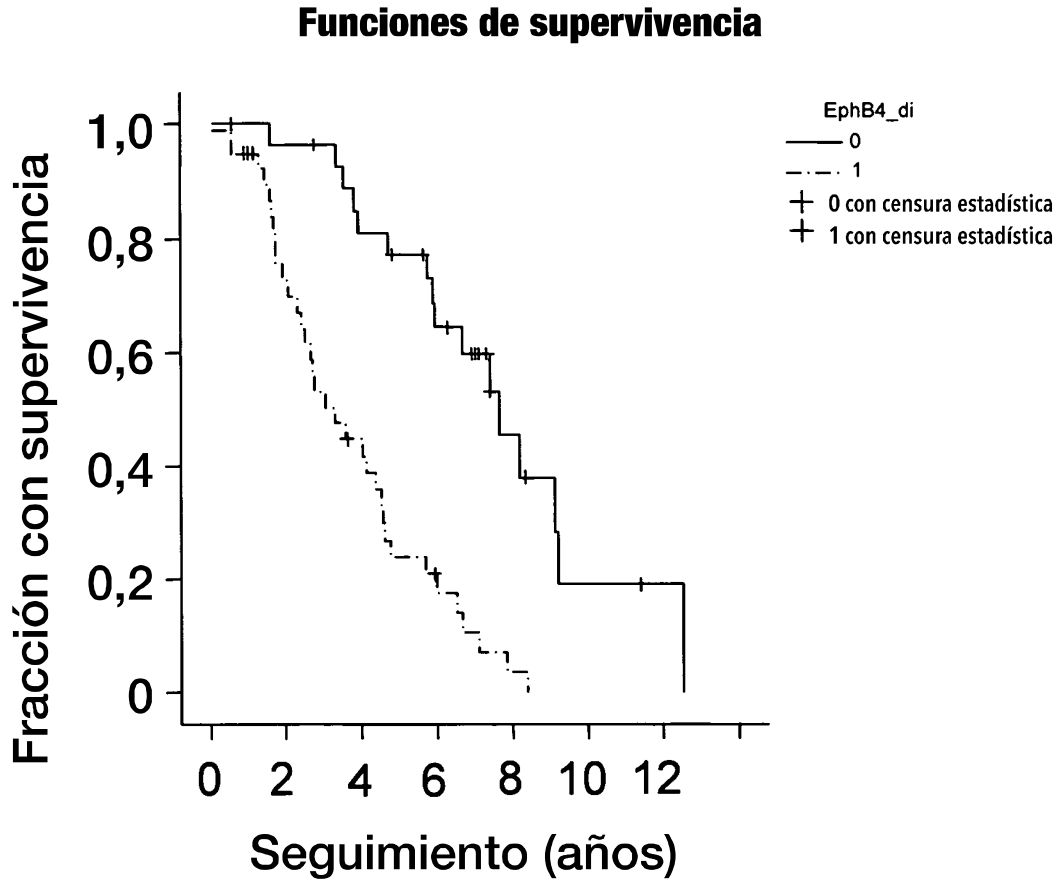
Supervivencia (mediana de los años):

Epo-R - 3,06

Epo-R + 4,62

$P = 0,61$

FIG. 22



Supervivencia (mediana de los años):

EphB4- 7,67

EphB4+ 3,29

$P < 0,001$

FIG. 23

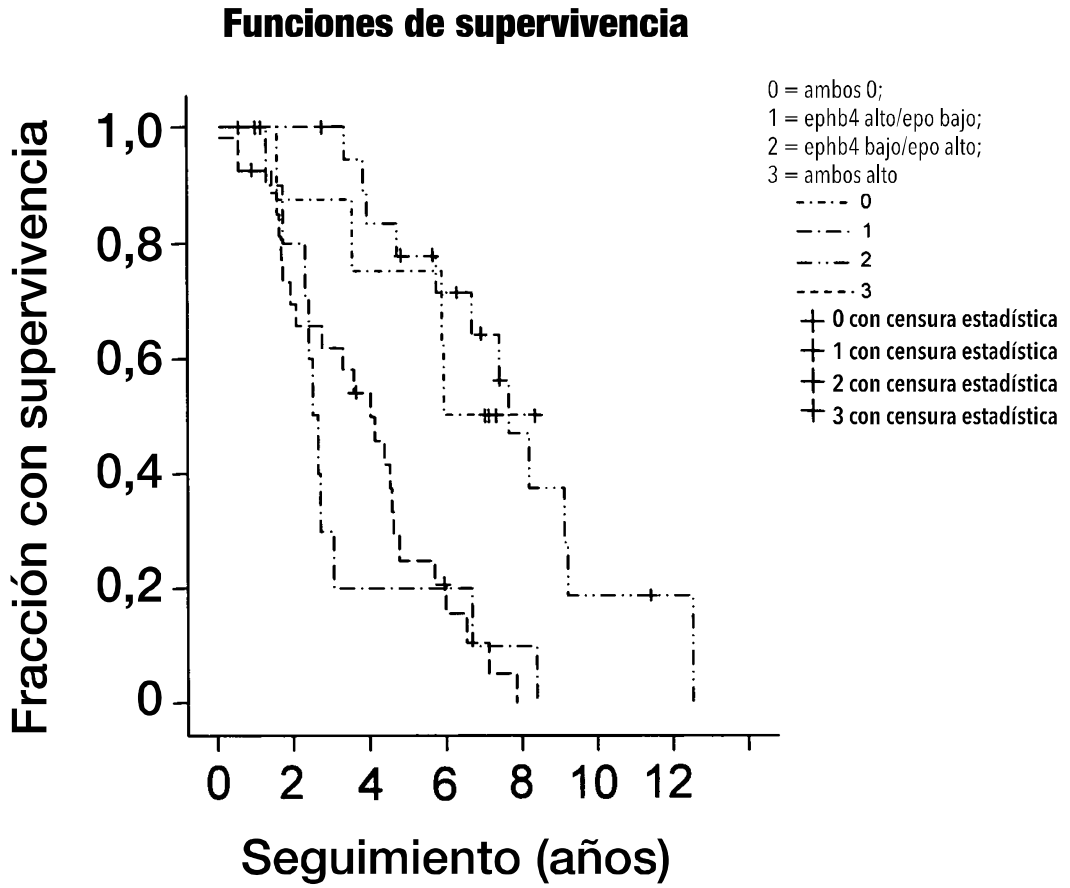


FIG. 24

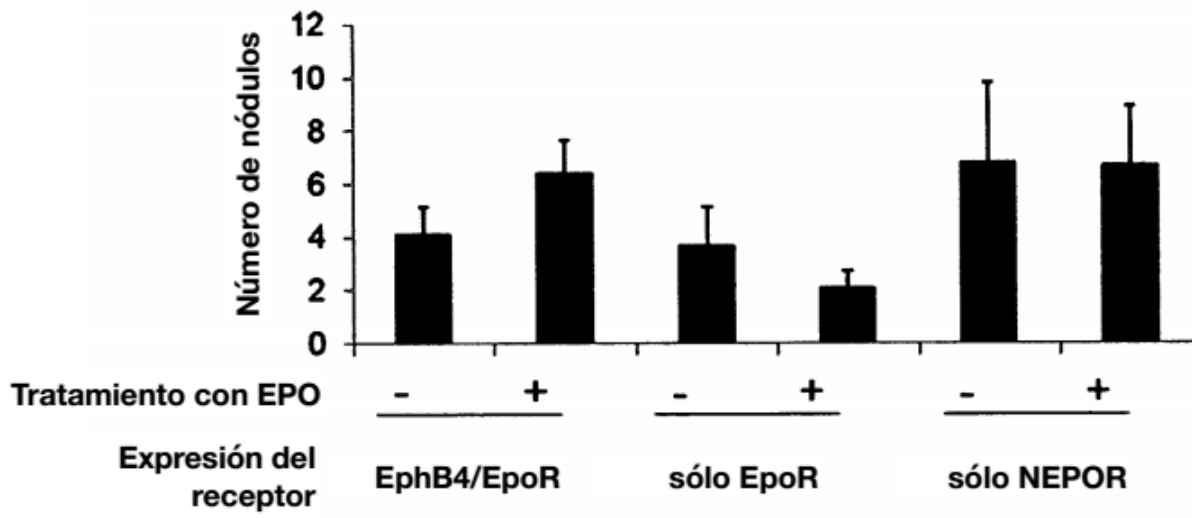


FIG. 25

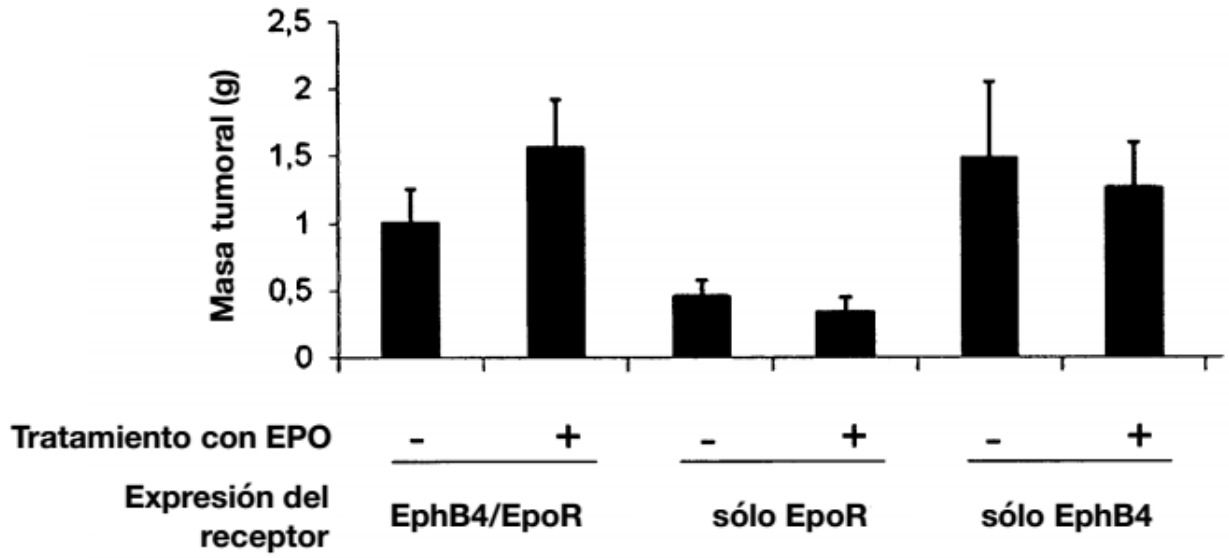


FIG. 26

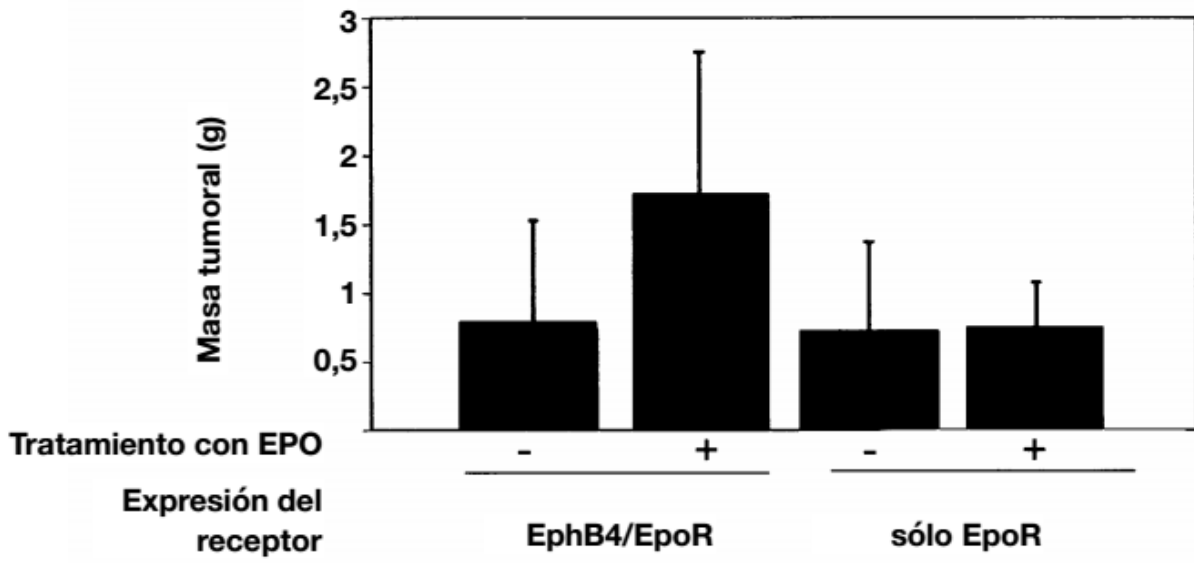
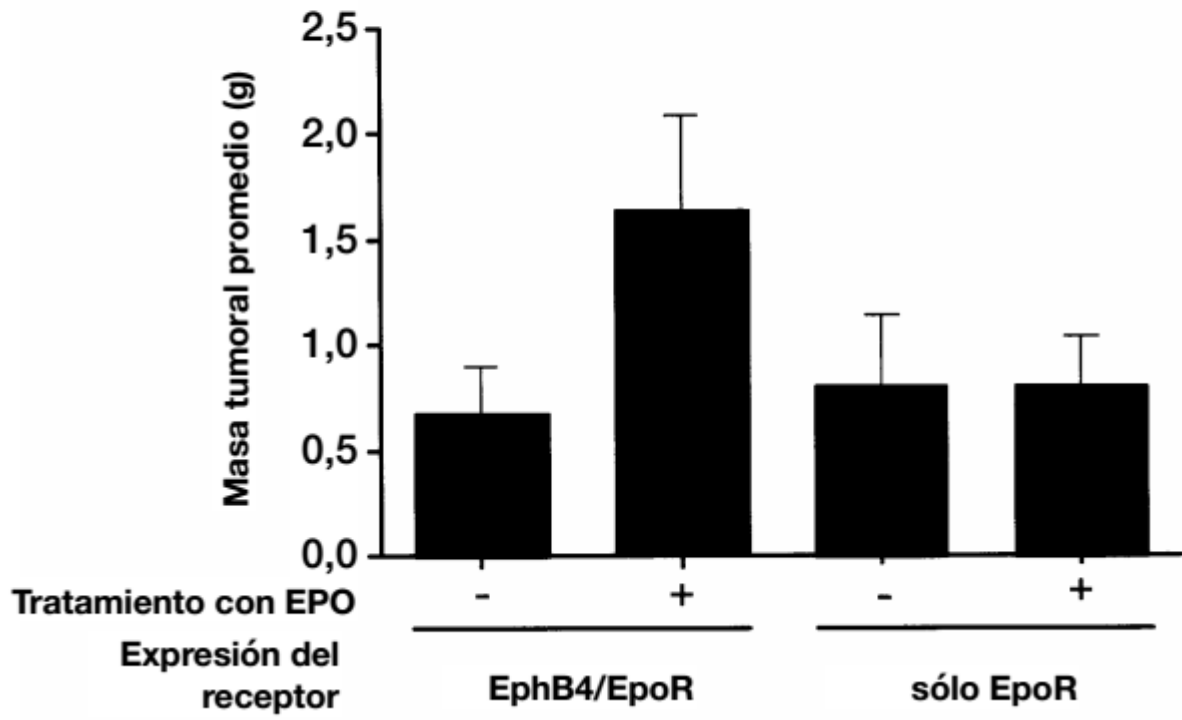
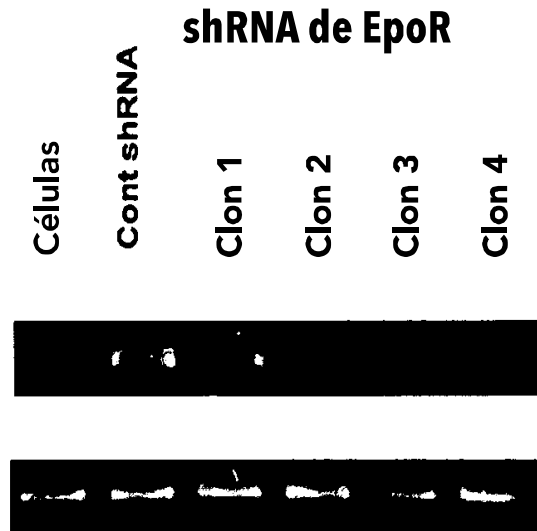


FIG. 27



**FIG. 28**

**A**



**B**

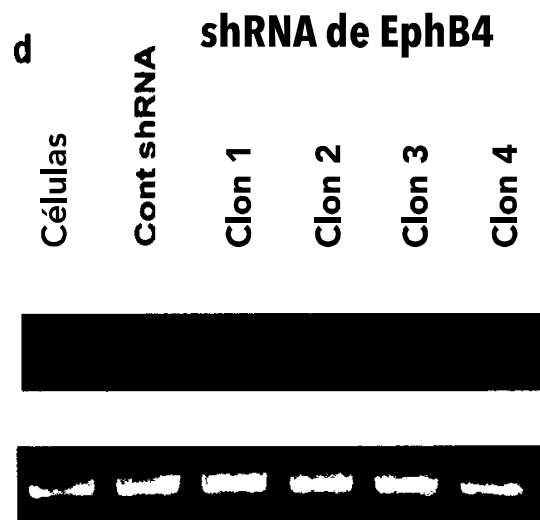


FIG 29

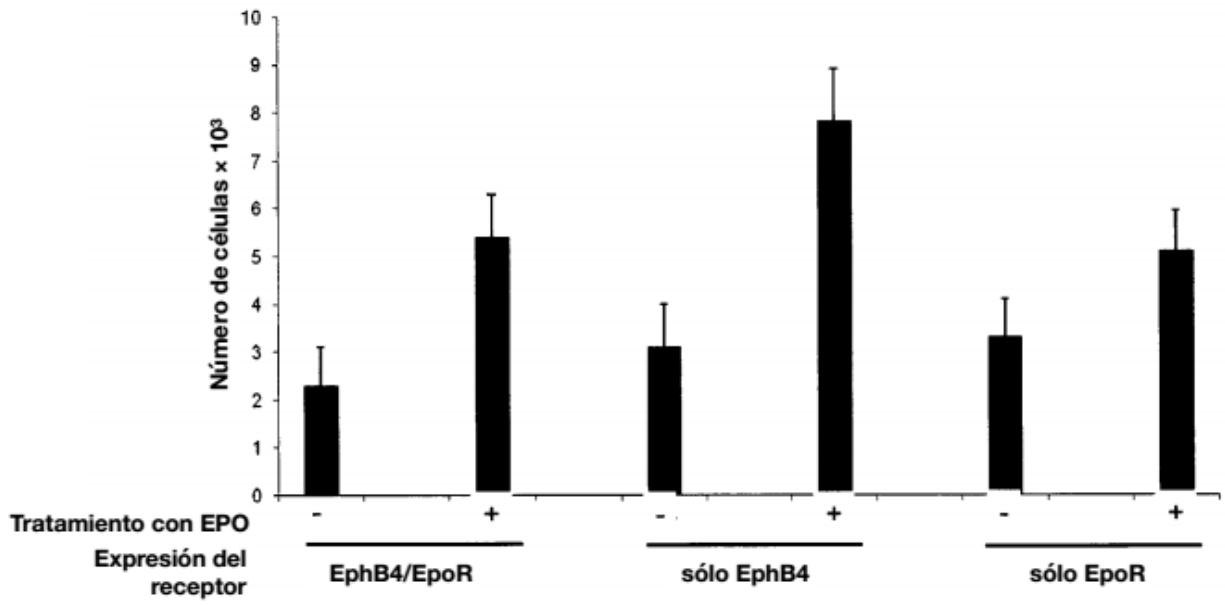


FIG 30

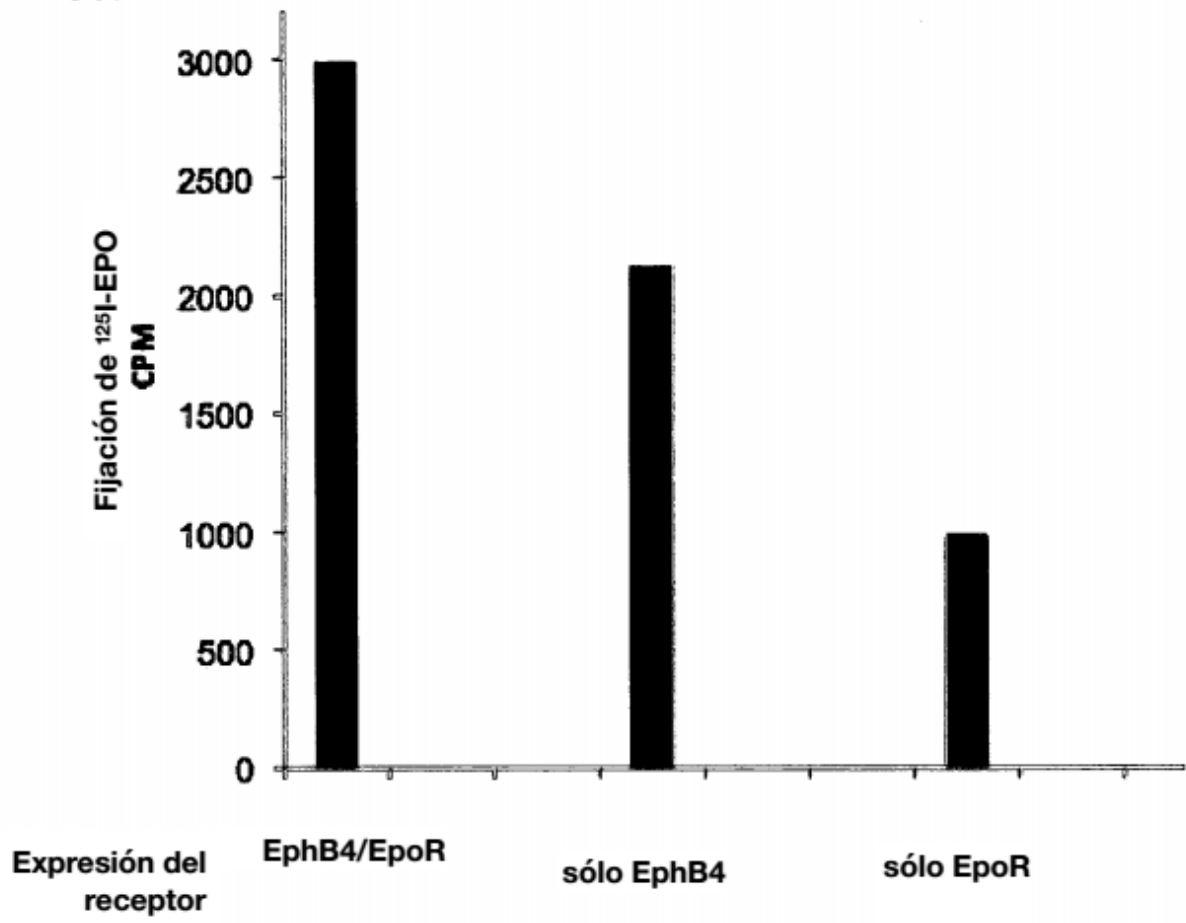


FIG. 31

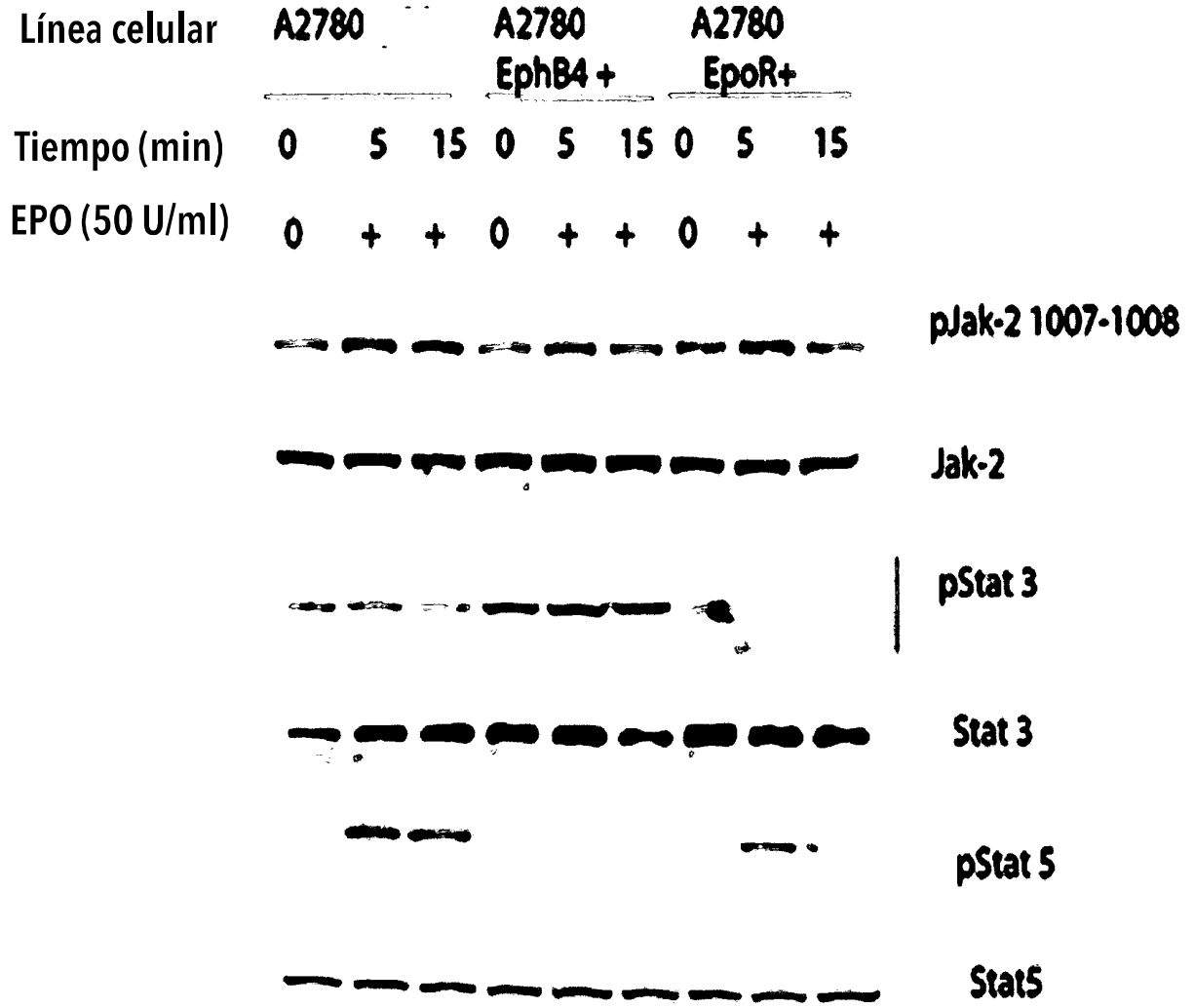


FIG. 32

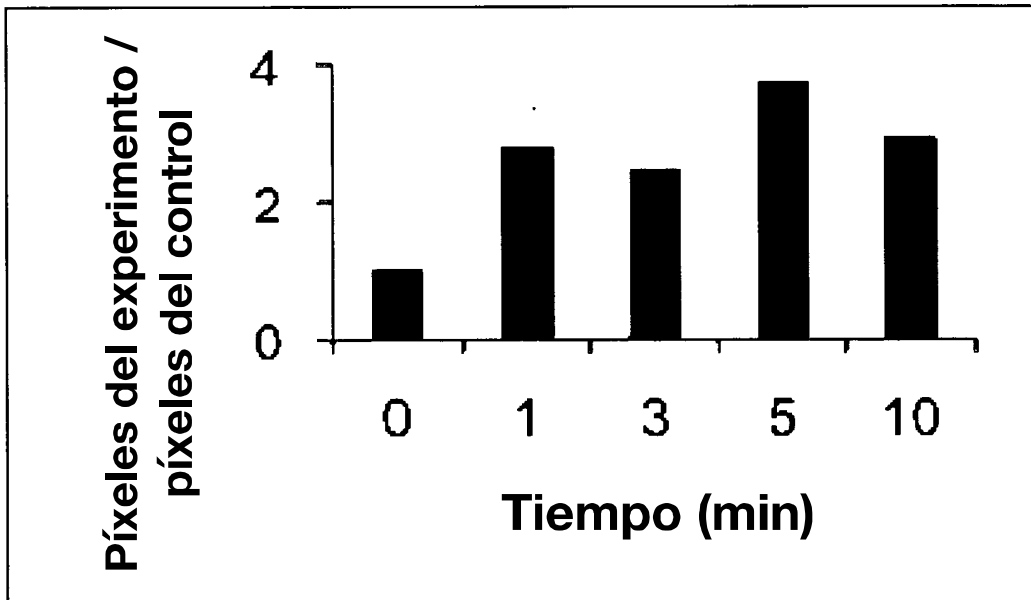
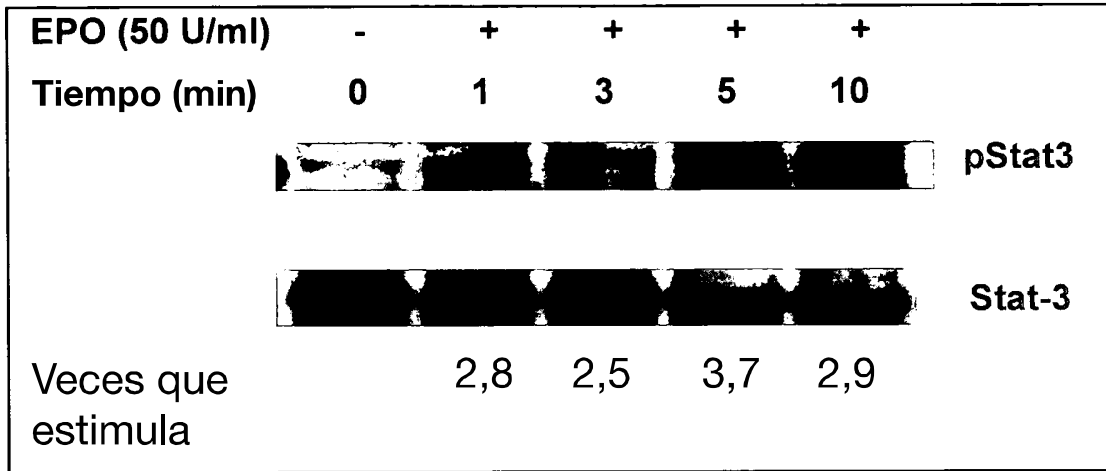


FIG. 33

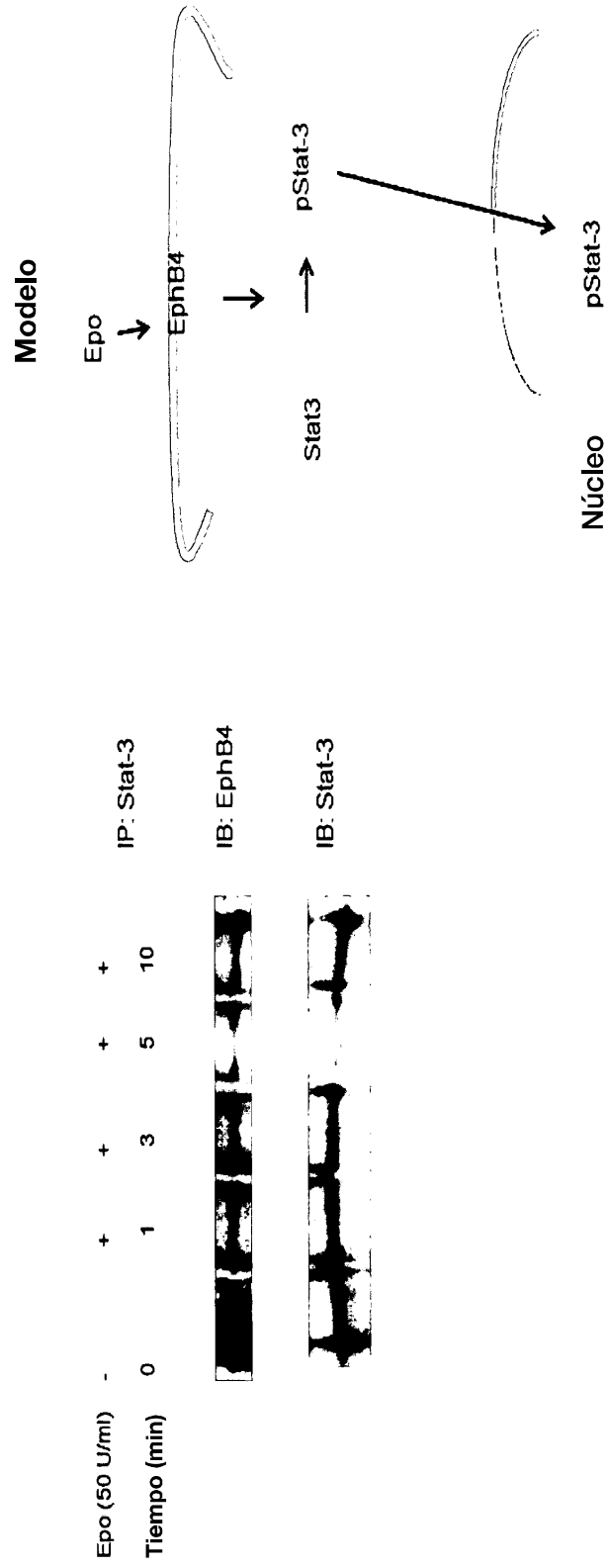


FIG 34

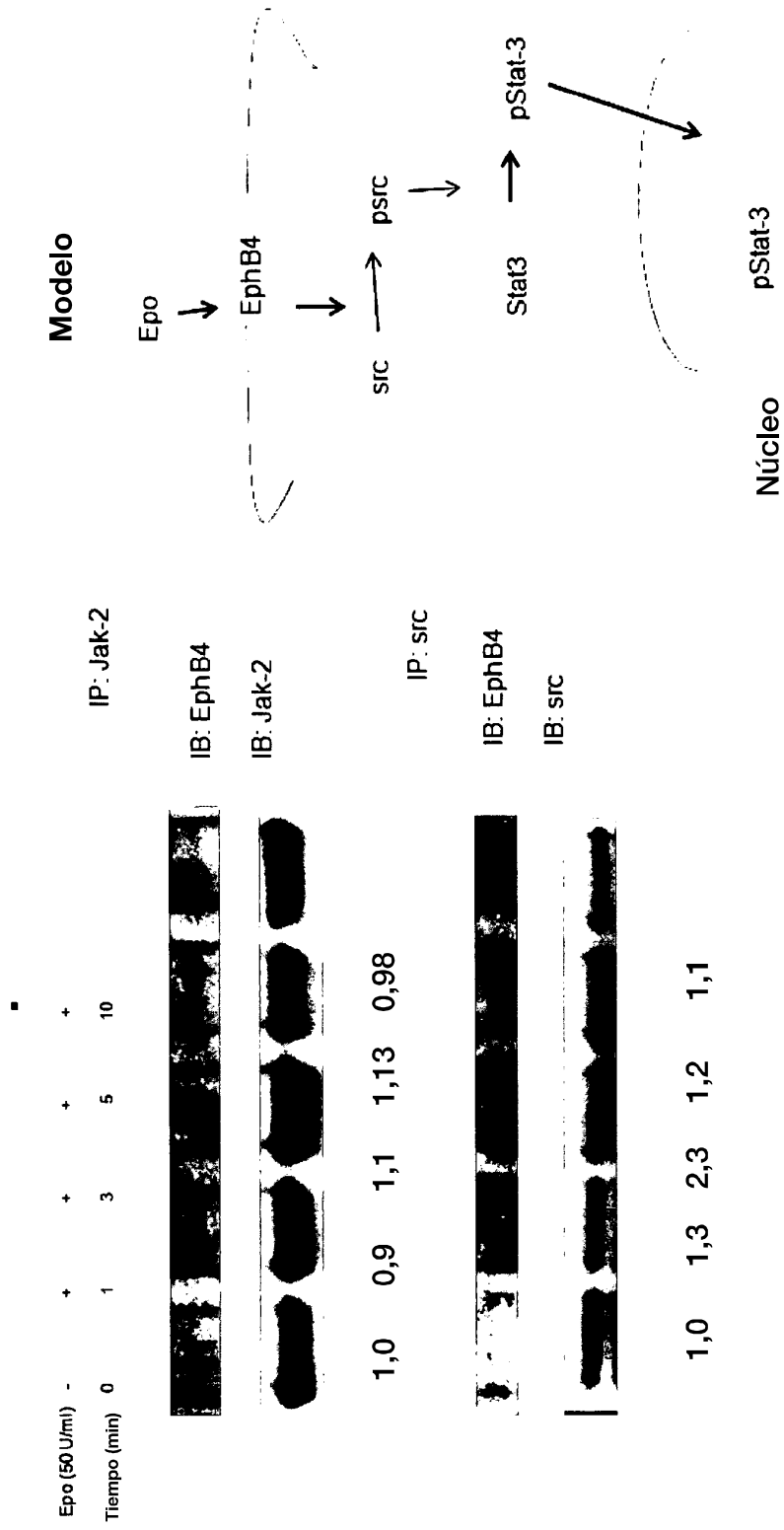
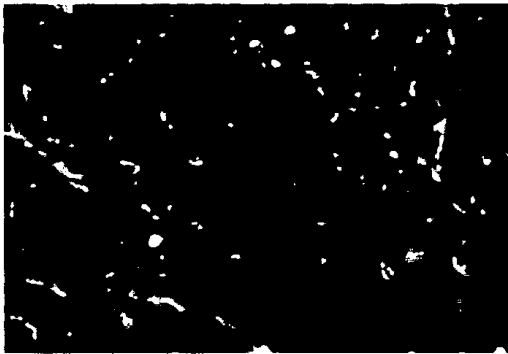
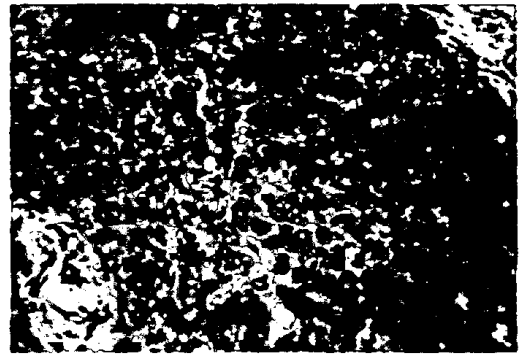


FIG. 35

**EpoR**

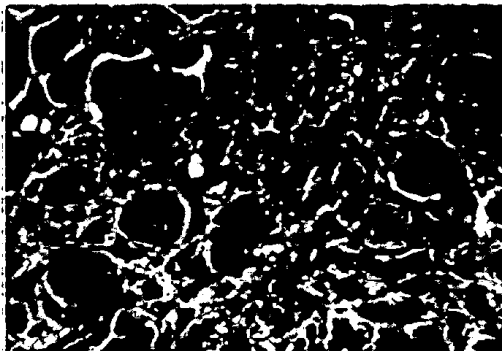


Alto

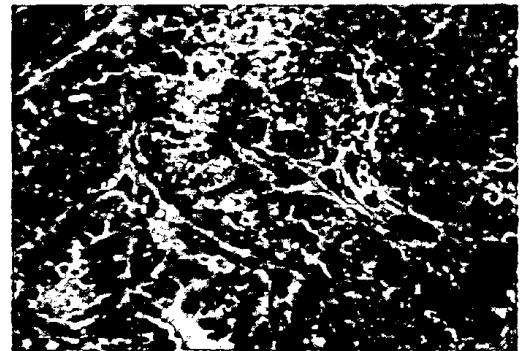


Bajo

**EphB4**



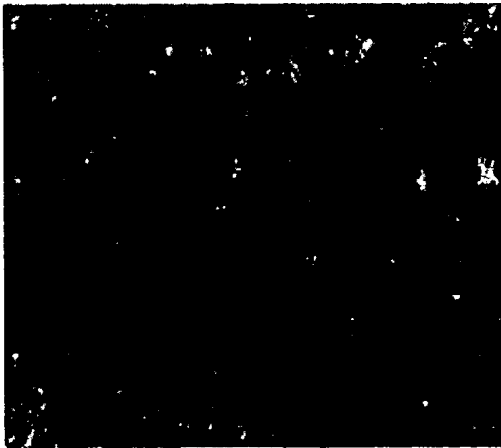
Alto



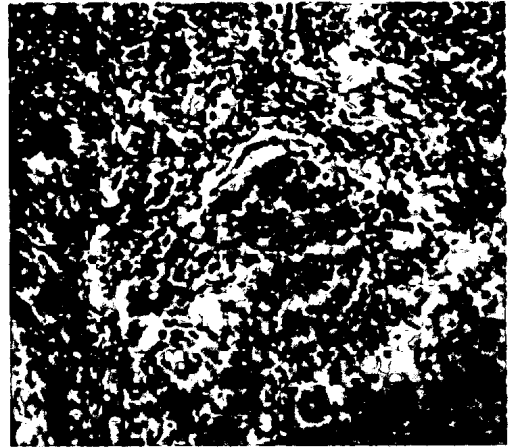
Bajo

FIG. 36

# EpoR

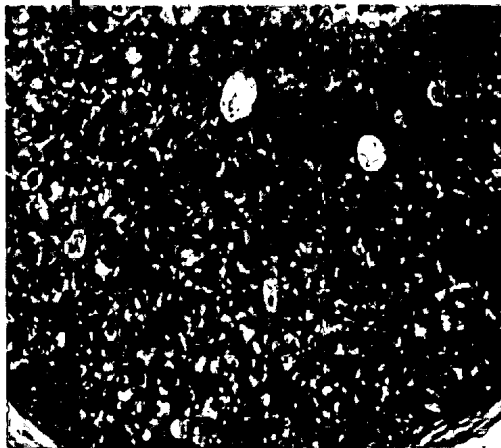


Alto

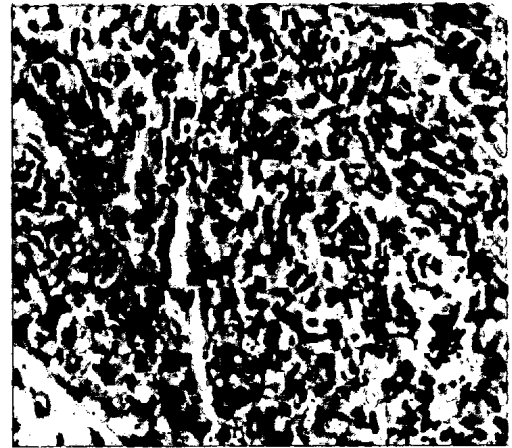


Bajo

# EphB4



Alto



Bajo

FIG. 37

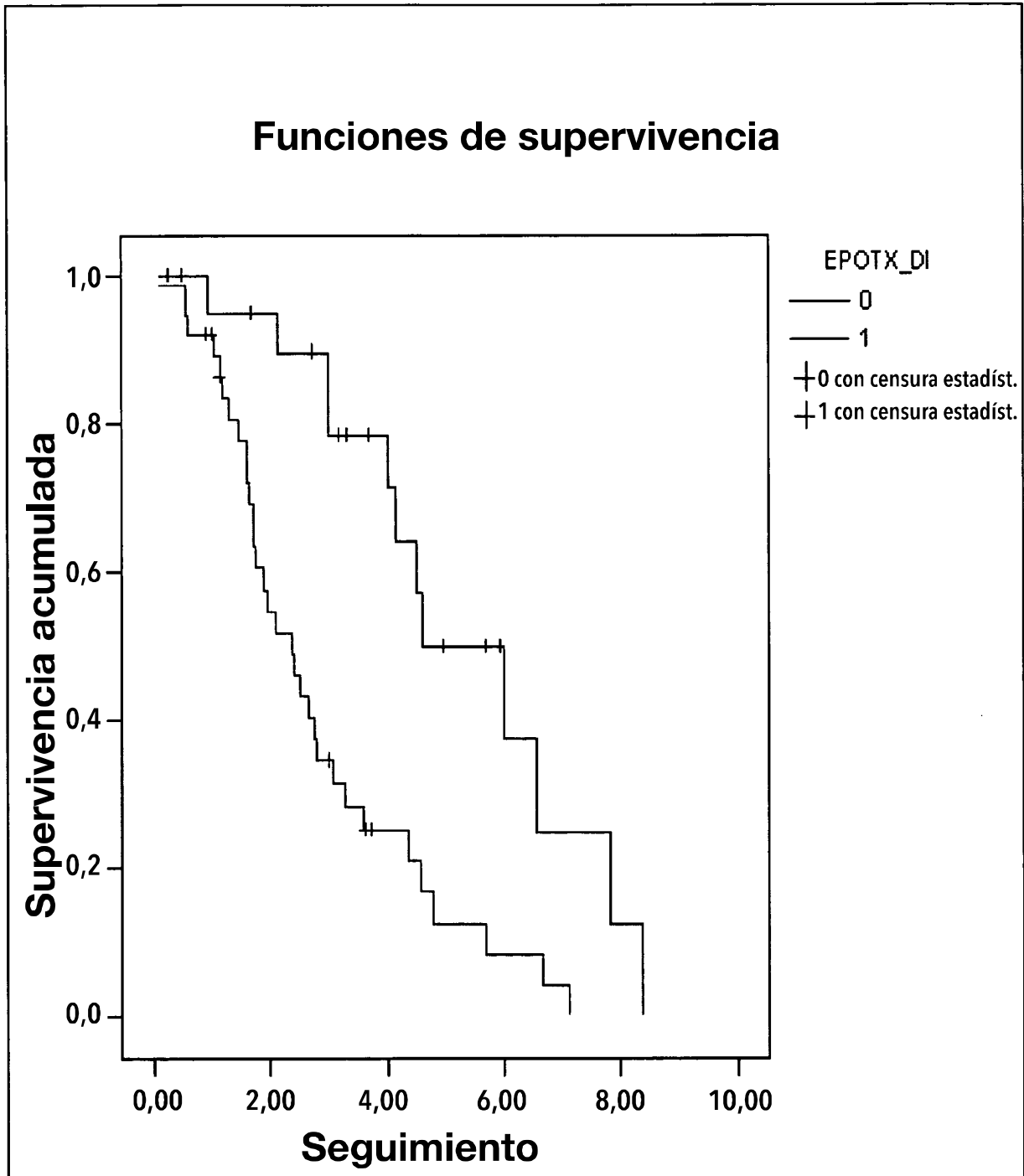


FIG. 38

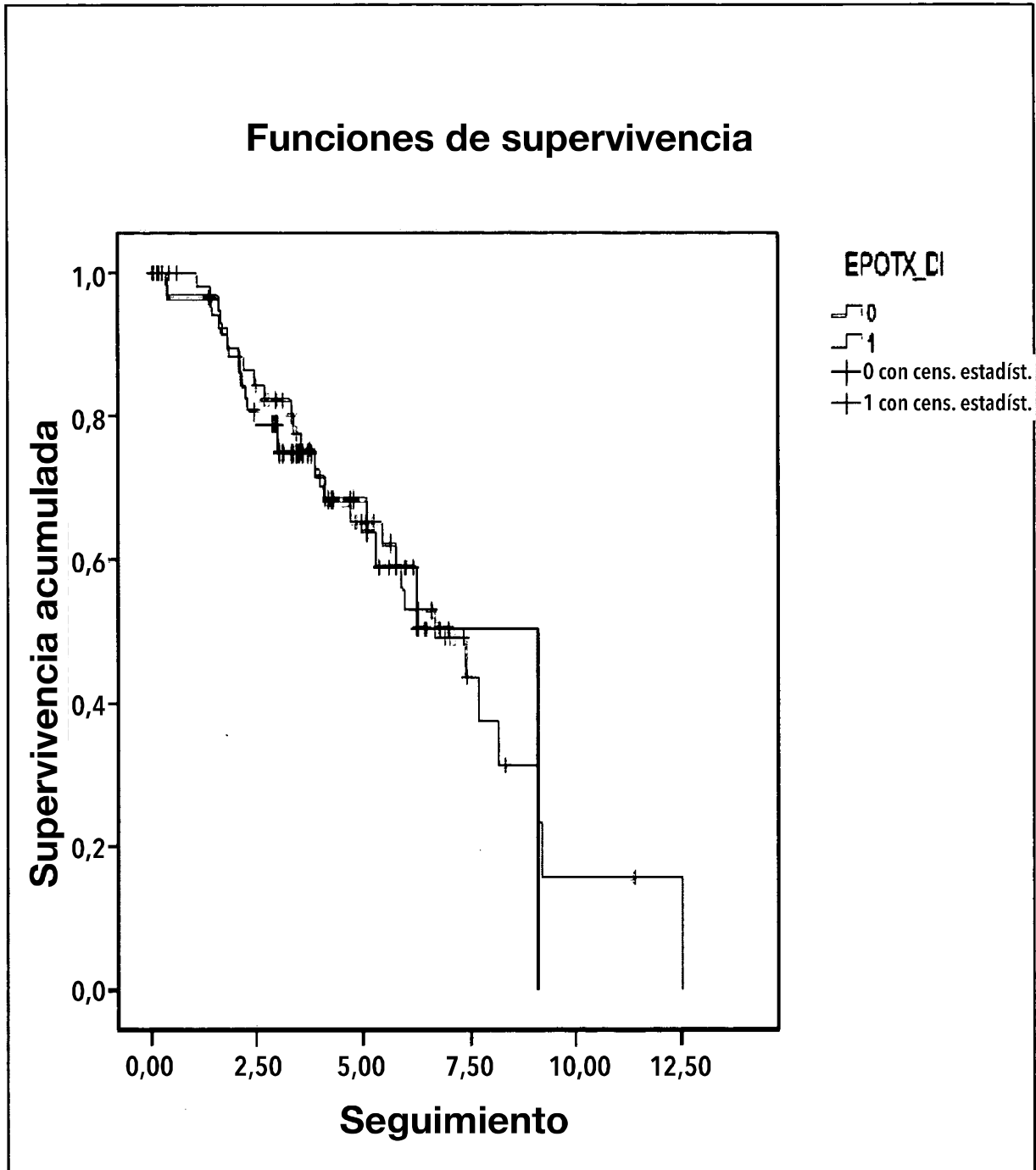


FIG. 39

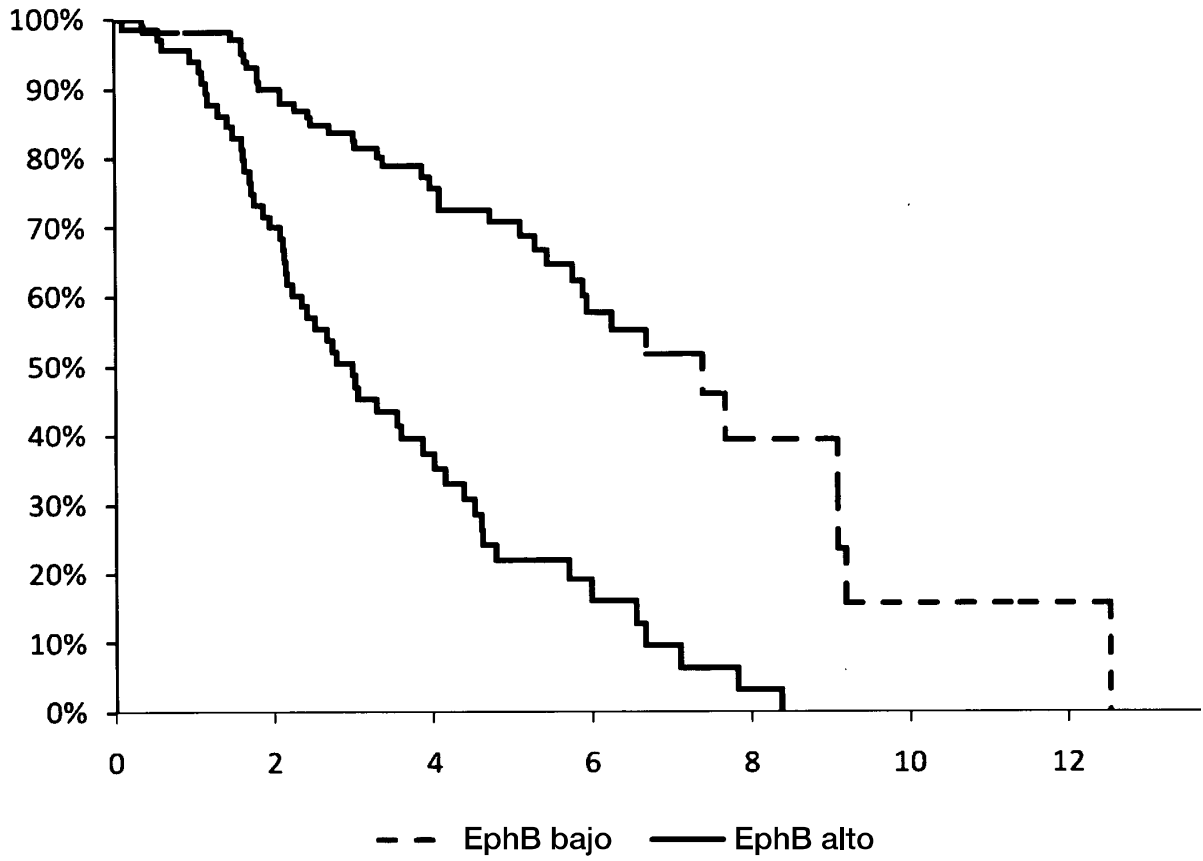


FIG. 40

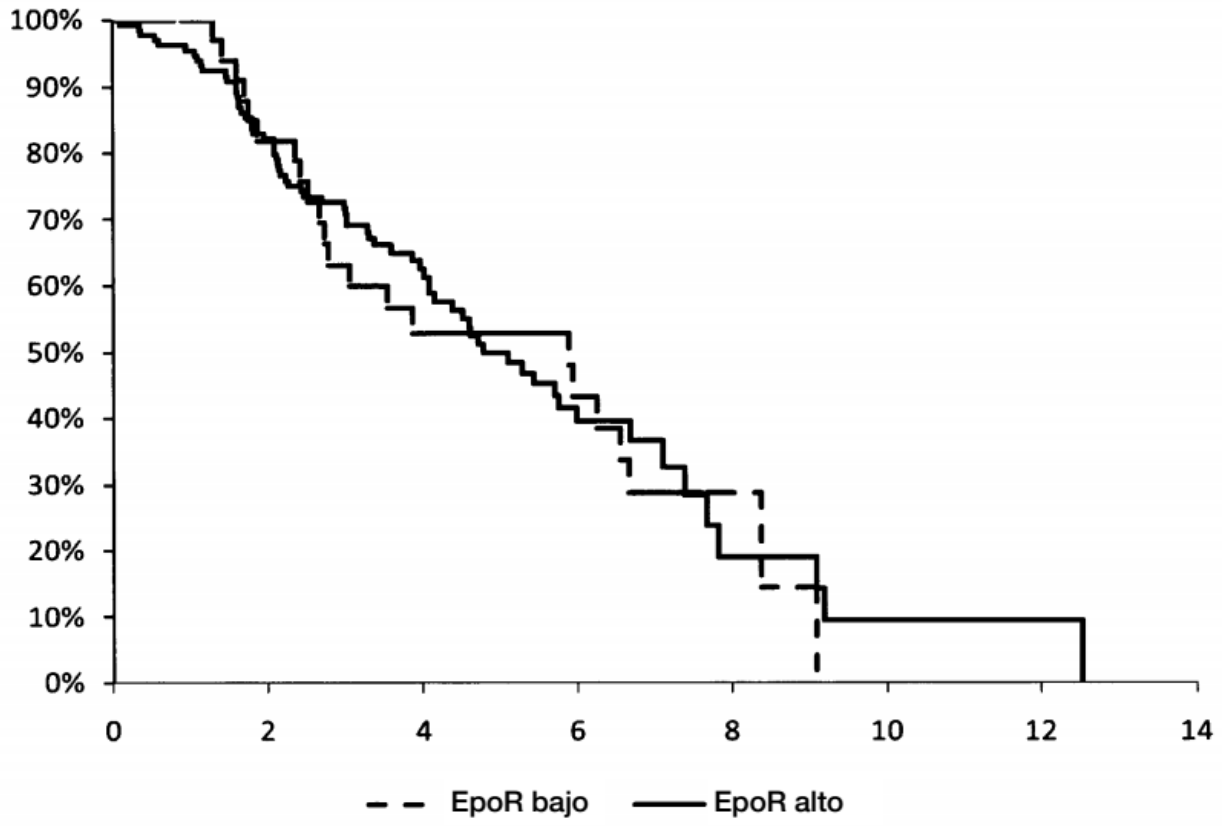


FIG. 41

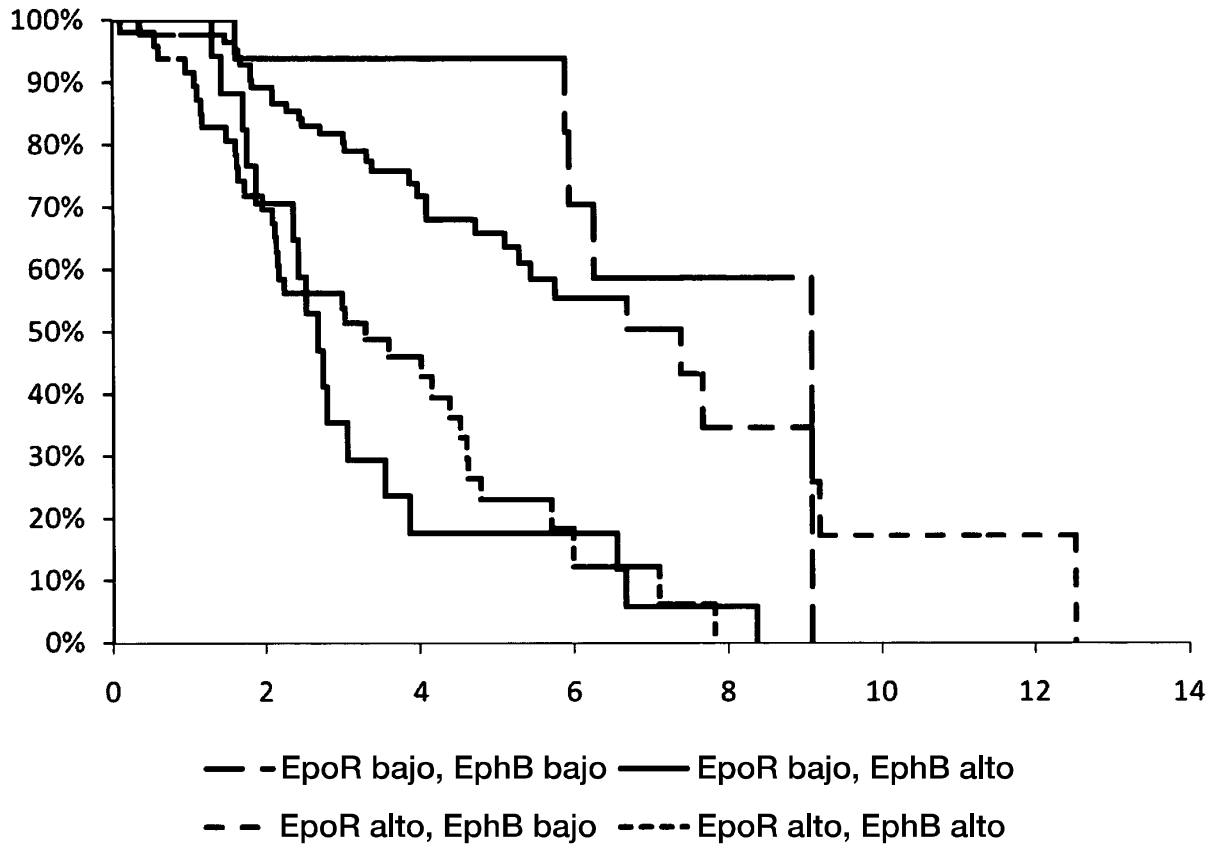


FIG. 42

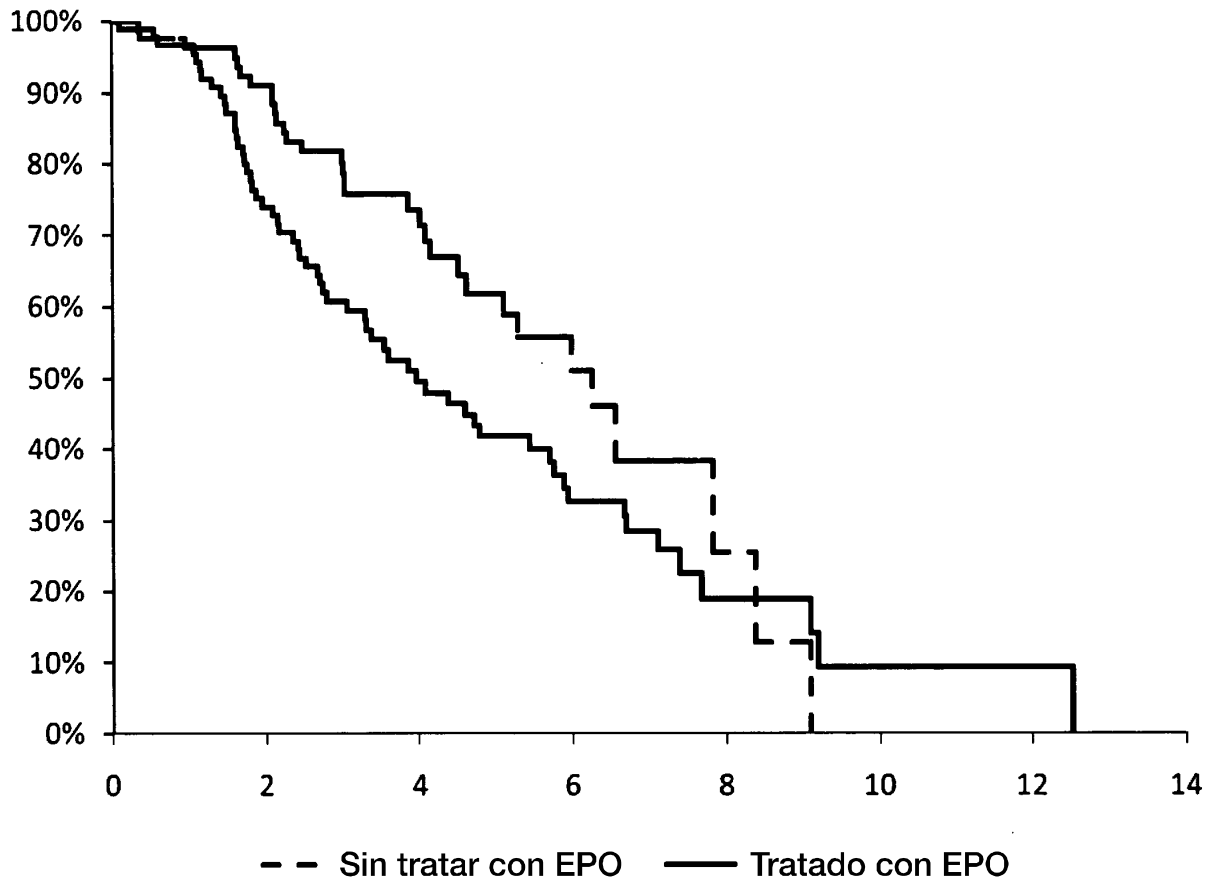


FIG. 43

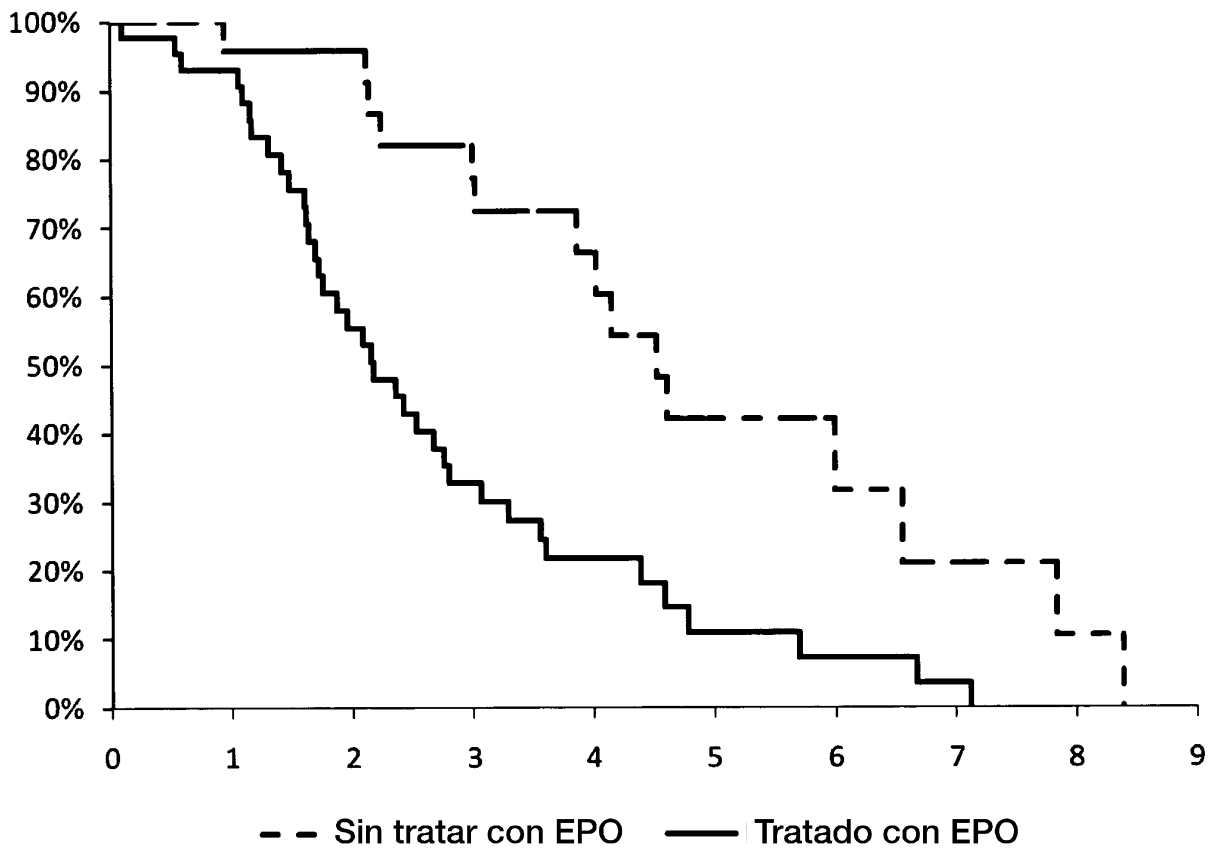


FIG. 44

