

B.T.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21 EXPEDIENTE No.

05-8131

54 TITULO

CITOKINAS RECOMBINANTES PROTECTORAS DE TEJIDO Y ACIDOS

NUCLEICOS CODIFICADORES DE LAS MISMAS PARA PROTECCION

RESTAURACION Y MEJORAMIENTO DE CELULAS, TEJIDOS Y

ORGANOS DE RESPUESTA

51 CLASIFICACION INTERNACIONAL

G01N 33/53

71 SOLICITANTE

THE KENNETH S. WARREN INSTITUTE y H. LUNDBECK A/S

DOMICILIO

Osining, Estado de New York, E.U.A.

74. APODERADO

LUIS FELIPE CASTILLO GIBSON

22 BOGOTA, D.C.,

01 FEB 2005

✓

PETITORIO



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO Radicación : 05000131 00000000 Fecha (MD): 2005-02-01 11:11:13 Trámite : 011 PCT-PATENT 370 FASE NACI 411 PRESENTAC Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES		Folios: 265
--	--	-------------

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

01-feb-2005

1	SOLICITUD DE:	
☒ Patente de Invención	☐ Patente de Modelo de Utilidad	

☒ Capítulo I	☐ Capítulo II
--	--------------------------------------

2	Nombre: THE KENNETH S. WARREN INSTITUTE y H. LUNDBECK A/S Dirección: 712 Kitchawan Road - Otisville, NY 9 Nacionalidad o domicilio: Ossining, Estado de New York, E.U.A. - Valby-Copenhague, Dinamarca Lugar de Constitución:	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
---	--	---

3	Nombre: LUIS FELIPE CASTILLO GIBSONE Dirección: Carrera 13 No. 37-43 Piso 12 Teléfono: 285 7480 Fax: 28 9287 E-mail: info@castillograu.com	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ Cual _____ Número 79.397.879 TP 68.995 del de Bogotá C.S.J.
---	--	--

4	Nombre: Ver hoja Anexa Dirección: Ver Hoja Anexa Nacionalidad o Domicilio: Ver Hoja Anexa	Folio 2
---	---	---------

5	PCT (56) Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2003/020964</u> Fecha: <u>01/07/03</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2004/003178 A3</u> Fecha: <u>08/01/04</u>	
---	--	--

6	Título (54) CITOQUINAS RECOMBINANTES PROTECTORAS DE TEJIDO Y ÁCIDOS NUCLEÍCOS CODIFICADORES DE LAS MISMAS PARA PROTECCIÓN, RESTAURACIÓN Y MEJORAMIENTO DE CÉLULAS, TEJIDOS Y ÓRGANOS DE RESPUESTA
---	---

7	Clasificación Internacional (51) G01N 33/53
---	---

8	Prioridad SI ☒ No ☐	(33) País de origen E.U.A.	(32) Fecha Julio 1, 2002 - Julio 3, 2002	(31) Número de Solicitud 60/392,455 - 60/393,423
---	---	-------------------------------	--	---

9	Comprobante de pago N°: _____ Fecha: _____
---	--

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

Continuación Solicitud de Patente PCT a favor de THE KENNETH S. WARREN
INSTITUTE y H. LUNDBECK A/S

NIELSEN, Jacob

Dannebrogsgade 17, 1.th.
Copenhagen, DK-1660
DK

CHRISTENSEN, Soren

Lystbaadevej 32
Jyllinge, DK-4040
DK

PEDERSEN, Jan Torleif

Holcks Plads 14, 1
Bronshøj, DK - 2700
DK

SAGER, Thomas

Stormosevej 35
Smørum, DK-2485
DK

GERWIEN, Jens

Haraldsgade 52, 1.tv
Copenhagen, DK-2100
DK

BRINES, Michael

1 Wepawaug Road
Woodbridge, CT 06525
US

BAY, Katrine

Allersgade 1, 2.th
Copenhagen, DK-2100
DK

CERAMI, Anthony

49 Bramblebush Drive
Croton-on-Hudson, NY 10520
US

PEDERSEN, Lars Ostergaard

Ved Vigen 14
Copenhagen, DK -2400
DK

CERAMI, Carla

121 Farrington Avenue
Sleepy Hollow, NY 10591
US

LEIST, Marcel

Kløverbladsgade 14,1
Valby, DK-2500
DK

GEIST, Marie Aavang

Sætorphsvej 44
Valby, DK-2500
DK

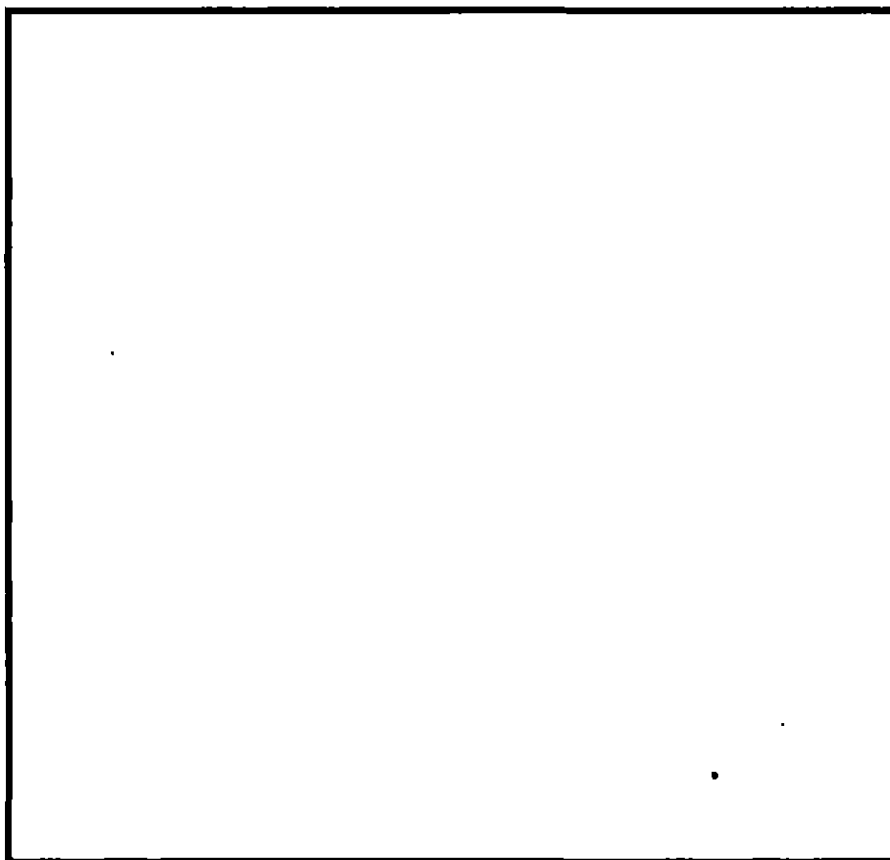
KALLUNKI, Pekka

Classengade 17, 3.th
Copenhagen, DK-2100
DK

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, al fuere el caso
- ☒ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Documento de Cesión del Inventor al solicitante o a su sucesante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito de material biológico.
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros

11

FIGURA CARACTERISTICA



12

Solicito la concesión de patente,

NOMBRE: _____

FIRMA: _____

C.C. 24.570.294
de BogotáT.P No. 68995
del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

4

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 05000131 00000000 Folios: 265
Fecha (AMD): 2005-02-01 11:11:13
Tramite : 011 PCT-PATENT 370 FASE NACT 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 7,354
FECHA : ENERO 31 DE 2005

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CASTILLO BRAU Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	32270850	31/01/2005	14,462,000.

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: **United States of America**
This public document
2. has been signed by **Gloria D'Amico**
3. acting in the capacity of **County Clerk**
4. bears the seal/stamp of the county of **Queens**

Certified

5. At New York, New York
6. the 06th day of August 2003
7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York
8. No. NYC-10251536A
9. Seal/Stamp
10. Signature

James Blizzarri

James Blizzarri
Special Deputy Secretary of State

Come Notario Venticinco del Circuito de
Bogotá, hago constar que esta copia
coincide con original que se ha presentado
Bogotá D.C. - Colombia.

27 ENE 2005

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VENTICINCO

Castillo Grau & Associates

LAW OFFICES
P.O. BOX 231473
BOGOTÁ, COLOMBIA

FOR PATENTS AND TRADE MARKS IN

COLOMBIA

PODER GENERAL

GENERAL POWER OF ATTORNEY

1 Applicant's name

(1) THE KENNETH S. WARREN
INSTITUTE, INC.

(1) THE KENNETH S. WARREN INSTITUTE, INC.

2 Applicant's Address

domiciliado en (2) 712 Kitchawan
Road, Ossining, New York,
Estados Unidos de Américadomiciled in (2)
712 Kitchawan Road
Ossining, NY 10562

3 Leave blank

nombre al Dr. (3) Germán Castillo Grau y o
Adriana Castillo Gibsons y o Luis Felipe Castillo
Gibsonshereby appoint Dr. (3) Germán Castillo Grau
and or Adriana Castillo Gibsons and/or Luis Felipe
Castillo Gibsons

4 Date

5 Applicant's signature

The applicant's signature
must be attested by a No-
tary Public through the
NOTARIAL CERTIFICATE:
In the "Individual",
when the signer is a natu-
ral person; and in the
"Corporate", when is
a legal one. The Notary's
signature must then be le-
galized by a Colombian
Consular Officer.

La firma del solicitante
debe ser atestada por un
Notario Público por me-
dio de la DECLARACION
NOTARIAL: en la "Indivi-
dual", cuando el fir-
mante es una persona na-
tural; y en la de "Corpo-
rativa", cuando es una
persona jurídica. La firma
del Notario deberá ser le-
galizada por el Consulado
Colombiano.

Con oficinas en la
Carrera 13 N° 37-43 Piso 12 en Bogotá, Colombia
como sus representantes con poder especial
amplio y suficiente, para recibir de las ofi-
cinas y autoridades Colombianas, administrati-
vas, judiciales o de policía, en primera o se-
gunda instancia, la extensión de Patentes de
Invención, Registro de Marcas, de Modelos y
de Dibujos Industriales, de Nombres Comer-
ciales y Etiquetas, lo mismo que trasposos, ex-
tensiones, renovaciones, cambios de nombre,
registro de licencias de explotación y registro
de licencias de uso referentes a tales actuaciones,
a cuyo efecto las faculta para dar ante
dichas autoridades todos los pasos neces-
arios al objeto indicado, otorgar solicitudes, for-
mular descripciones, enmiendas, protestas,
declaraciones, oposiciones y reclamos, solici-
tar la aplicación de medidas cautelares, acap-
tar en nuestro nombre y representación la Ce-
sión de derechos de invención y de patente
de invención que se nos haga por cualquier
persona, abonar todos los impuestos, costas
y pagos determinados por la ley, recibir todos
los documentos y valores dando el descargo
respectivo, llenar cualesquiera otros requisi-
tos, desistír y tomar en fin todas las medidas
que creyeran conducentes al resguardo de
nuestros intereses y en caso de presentarse
oposiciones para que intervengan como de-
mandantes o como demandados, con todas
las demás facultades legales necesarias. Este
poder comprende además las facultades de
recibir, desistír, transigir, comprometer, sus-
tituir, revocar sustituciones, recibir notifica-
ciones y nombrar apoderados judiciales o extra-
judiciales.

With
offices at Carrera 13 N° 37-43 Piso 12 in Bogotá
Colombia as our representatives with special,
ample and sufficient power to obtain from the
offices and Colombian authorities, adminis-
trative, judicial and police, in first or in second
instance, Privileged Patents of Invention, Re-
gistration of Trade Marks, of Models and In-
dustrial Drawings, of Commercial Names and
etiquettes, as well as assignments, extensions,
renewals, changes of name, registration of
licenses of exploitation and of licenses of use
referring to said actions, who are empowered
to take before said authorities all of the neces-
sary steps for the purposes indicated, to file
applications, to formulate descriptions, co-
rrections, protests, declarations, appeals and
claims, apply for precautionary measures, to
accept on our behalf and representation the
assignment of rights of invention and titles of
invention that may be done to us by any per-
son, to pay all taxes, quotas and payments
prescribed by law, to receive all the docu-
ments and proceeds giving the respective ac-
quittances or receipt; to fulfill any other requisi-
tes to desist and take in fact any other measu-
res that may be deemed conducive to the sa-
feguard of our interests, and in case opposi-
tions are presented to intervene as complai-
nant and defendant, with all necessary legal
faculties. This power of attorney includes the
faculties to receive, desist, compromise, tran-
sact substitute it in all or in part, to revoke
substitutions, to receive notifications and to
appoint extra-judicial or judicial attorneys.

Dado y firmado en (4) Junio. 13, 2003
Ossining, N.Y.Given and signed in (4) June. 13, 2003
Ossining, NY

(5)

Conjuntamente con la firma

Carla Cerami
Secretary

Como Notario Verificador del Censo de
Bogotá, hago constar que esta copia
conforme con original que se ha presentado
Bogotá D.C., Colombia.

27 ENE 2005

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VERIFICADOR

La declaración Notarial a la vuelta.
Notarial acknowledgment on other side.

DECLARACION NOTARIAL

(Individual)

A los. días del mes. de 19. comparecí. personalmente ante mí, Notario Público

a quien(es) doy fé de conocer y me consta que es (son) la(s) persona(s) descrita(s) y firmante(s) del documento que precede, declarando ante mí que otorga(n) el mismo para los fines y propósitos que en él se expresan.

El Notario Público,

NOTARIAL CERTIFICATE

(Individual)

On this. 13 day of June, 192003 personally appeared before me, a Notary Public. Carla A. Cerami

to me known, and known to me to be the person(s) described in and who executed the foregoing document, and he (they) duly acknowledged to me that he (they) executed same for the uses and purposes therein expressed.

Christine Galle
Notary Public.

Christine Galle
Notary Public, State of New York
No. 01GA5073833
Qualified in Queens County
Commission Expires March 3, 2007

(Sociedades)

El infrascrito Notario Certifica: que la firma que antecede y dice Carla Cerami

es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo de Secretaria

de The Kenneth S. Warren Institute, Inc.

que tiene facultad para otorgar este poder; y que dicha compañía está domiciliada en 712 Kitchawan Road, Ossining, New York, E.U. de A.

y actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de New York, E.U. de A.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fé.

Dado y firmado en Junio 13, 2003
Ossining, N.Y. 10562

(Corporations)

The undersigned Notary Public certifies; that the preceding signature reading Carla Cerami

is authentic; that the signer at present fills the post of Secretary

of THE KENNETH S. WARREN INSTITUTE, INC.

and that he is empowered to grant this power; and that said company is domiciled in 712 Kitchawan Road Ossining, NY 10562

and actually exists and is organized in accordance with the laws of New York

All the foregoing facts are known to the Notary due to his having examined the respective documents to which he, the Notary attests.

Granted and signed in June 13, 2003
Ossining, NY 10562

Christine Galle
Notary Public.
Christine Galle
Notary Public, State of New York
No. 01GA5073833
Qualified in Queens County
Commission Expires March 3, 2007

Con Notario Veintidós del Estado de Nueva York, para constar que esta copia coincide con original que se ha presentado.
Bogotá D.C. Colombia.

27.ENE.2005

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VENTISEIS

(With Consular legalization)

8

EN BLANCO
NOTARIA VEINTISEIS

EN BLANCO
NOTARIA VEINTISEIS

State of New York } ss.:
County of Queens }

Nº 77823

Form 1

I, GLORIA D'AMICO, Clerk of the County of Queens, and Clerk of the Supreme Court in and for said county, the same being a court of record having a seal, DO HEREBY CERTIFY THAT

CHRISTINE GALIS

whose name is subscribed to the annexed original instrument has been commissioned and qualified

as a NOTARY PUBLIC



and has filed his autograph signature in this office and that he/she was at the time of taking such proof or acknowledgment or oath duly authorized by the laws of the State of New York to take the same; that he is well acquainted with the handwriting of such public officer or has compared the signature on the certificate of proof or acknowledgment or oath with the autograph signature filed in his office by such public officer, and he believes that the signature on the original instrument is genuine.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand and my official seal this

day of JUL 31 2003

Gloria D'Amico

County Clerk, Queens County

Como Notario Veintiseis del Circuito de
Bogotá, hago constar que esta copia
coincide con original que se ha presentado
Bogotá D.C., Colombia.

27 ENE 2005

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

TRADUCCIÓN OFICIAL NO. 9054 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES, realizada por María Mercedes Uriceochea T., Traductora/Intérprete Oficial según Res. 10607 del 31 de diciembre de 1981 del Ministerio de Justicia. Bogotá, 19 de agosto de 2003.

LEGALIZACIONES DE UN PODER (MARCAS Y PATENTES) CON TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL, OTORGADO POR THE KENNETH S. WARREN INSTITUTE, INC. A LOS DOCTORES GERMAN CASTILLO GRAU Y/O ADRIANA CASTILLO GIBSON Y/O LUIS FELIPE CASTILLO GIBSON.

PODER FIRMADO en Ossining, N.Y. por Carla Cerami, Secretaria, el 13 de junio de 2003.

RECONOCIMIENTO NOTARIAL

FIRMA Y SELLO SECO de la Notaria Pública, Christine Galis. No. 01GA5073033 - Calificada en el Condado de Queens. Mi comisión vence el 3 de marzo de 2007.

LEGALIZACIONES

Estado de New York

Condado de Queens - Juramentado y Suscrito

Yo, GLORIA D'AMICO, Secretaria del Condado de Queens y Secretaria de la Corte Suprema en y para dicho Condado, siendo la misma una corte de registro con sello, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE CHRISTINE GALIS, cuyo nombre se ha suscrito al documento original adjunto, se encuentra comisionada y calificada como NOTARIA PUBLICA y ha registrado su firma autógrafa en esta oficina, y que en el momento de tomar dicha prueba o reconocimiento o juramento debidamente autorizada por las leyes del Estado de Nueva York estaba autorizada para tomar lo mismo; que reconozco la escritura de dicho funcionario público o he comparado la firma en el certificado de prueba o reconocimiento o juramento con la firma autógrafa registrada en esta oficina y verdaderamente creo que la firma en el documento original es auténtica.

Yo Notario Verificador del Circuito de Bogotá hago constar que esta copia coincide con original que se ha presentado Bogotá D.C., Colombia.

27 ENE 2005

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
No. 7782 NOTARIO VERIFICADOR

US María Mercedes Uriceochea
Res. No. 10607 Minjusticia
Traductora Juramentada

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, firmo y hago estampar mi sello oficial, hoy 31 de julio de 2003.

(FIRMA Y SELLO) GLORIA D'AMICO. *Secretaria de Condado, Condado de Queens*

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

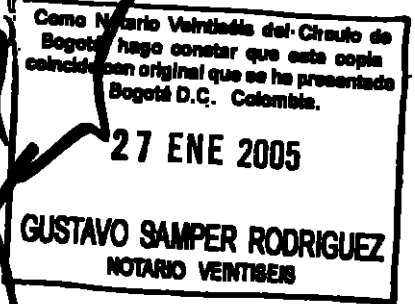
1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. fue suscrito por Gloria D'Amico

3. quien actúa en capacidad de Secretaria de Condado

4. lleva el sello del Condado de Queens



Certificado

4. en Nueva York, N.Y.

6. hoy 06 de agosto de 2003

7. por el Subsecretario Especial de Estado del Estado de Nueva York

8. No. NYC-10251536A

9. Sello

10. Firma

James Bizzari

Subsecretario Especial de Estado

LA ANTERIOR ES UNA TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA DE LA CUAL SE DEJA COPIA EN LOS ARCHIVOS DE LA CALLE 84 NO. 18-38 (OF. 201) PARA SU CONFRONTACIÓN. TEL. 218 1007 - 623 3301

MARIA MERCEDES URICOECHEA T.

C.C. 41.319.274 BOGOTA

TRADUCTORA/INTÉRPRETE OFICIAL

RES. 10607 DEL 31 DE DIBRE/81, MINJUSTICIA

FIN DE LA TRADUCCION OFICIAL NO. 9054

Maria Mercedes Uricoechea
Maria Mercedes Uricoechea
Res. No. 10607 del 31 de Dibre/81
Traductora Juramentada

EN BLANCO
NOTARIA VEINTISEIS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2003 AUG 21 A 11:08

184
JEFE DE LEGALIZACIONES
CONTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

474975
Morice dos Arcoedres
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENANDO
LAS FUNCIONES INDICADAS

Como Notaria Veintiseis del Círculo de
Bogotá, hago constar que esta copia
coincide con el original que se ha presentado
Bogotá D.C. - Colombia.

27 ENE 2005

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

EN BLANCO
NOTARIA VEINTISEIS

EN BLANCO
NOTARIA VEINTISEIS

11

**CITOQUINAS RECOMBINANTES PROTECTORAS DE TEJIDO Y ÁCIDOS
NUCLÉICOS CODIFICADORES DE LAS MISMAS PARA
PROTECCIÓN, RESTAURACIÓN Y MEJORAMIENTO DE CÉLULAS,
TEJIDOS Y ÓRGANOS DE RESPUESTA**

Esta invención reivindica prioridad a la Solicitud de patente U.S. provisional No. 60/392,455 radicada el 1 de julio de 2002 y a la Solicitud de patente U.S. provisional No. 60/393,423, radicada el 3 de julio de 2002, cuyo contenido total de cada una se incorpora por referencia en este contexto.

1. INTRODUCCIÓN

La presente invención está dirigida a citoquinas recombinantes de mutelna protectoras de tejido que tienen una o más sustituciones de amino ácidos, composiciones farmacéuticas que comprenden dichas citoquinas para proteger, mantener, mejorar o restaurar la función o viabilidad de células mamíferas de respuesta y sus células, ejidos y órganos asociados. Esto incluye la protección de tejido excitable, tal como tejido neuronal y cardíaco, de neurotoxinas, hipoxia y otros estímulos adversos, y el mejoramiento de la función del tejido excitable, tal como para facilitar el aprendizaje o la memoria. La presente invención también se dirige a composiciones para transportar o facilitar el transporte de una molécula por transcitosis a través de una barrera de células endoteliales que utiliza citoquinas recombinantes de mutelna protectoras de tejido.

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Durante muchos años, la única función fisiológica clara de eritropoyetina ha sido el control de la producción de glóbulos rojos. Recientemente, varios puntos de evidencia sugieren que eritropoyetina, miembro de la superfamilia de citoquinas, cumple otras funciones fisiológicas importantes las cuales pueden mediar por la interacción con el receptor de eritropoyetina (eritropoyetina-R). Estas acciones incluyen mitogénesis, modulación de influjo de calcio en las células del músculo blando y células neurales, acción vasoactiva, por ej: vasoconstricción/vasodilatación, hiperactivación de plaquetas y efectos en el metabolismo intermedio. Se cree que eritropoyetina proporciona respuestas compensatorias que sirven para mejorar microambientes celulares hipóxicos, así como para modular la muerte programada de células causada por estrés metabólico. Aunque algunos estudios han establecido que la eritropoyetina inyectada intracranealmente protege las neuronas contra lesión neuronal hipóxica, la administración intracraneal es

una ruta impráctica y en general, inaceptable para uso terapéutico, en particular para individuos normales. Es más, estudios previos de pacientes anémicos a quienes se les ha administrado eritropoyetina han concluido que la eritropoyetina administrada periféricamente no es transportada al cerebro (Marti et al., 1997, *Kidney Int.* 51:416-8; Juul et al., 1999, *Pediatr. Res.* 46:543-547; Buemi et al., 2000, *Nephrol. Dial Transplant.* 15:422-433).

Se han descrito varias formas modificadas de eritropoyetina con actividades dirigidas a mejorar la actividad eritropoyética de la molécula, tales como las que tienen amino ácidos alterados en el terminal de carboxi descritas en la Patente U.S. 5,457,089 y en la Patente U.S. 4,835,260; isoformas de eritropoyetina con varios números de residuos de ácido siálico por molécula, tales como las que se describen en la Patente U.S. 5,856,298; polipéptidos descritos en la Patente 4,703,008; agonistas descritos en la Patente U.S. 5,767,078; péptidos que se enlazan al receptor de eritropoyetina tal como se describen en las Patentes U.S. 5,773,569 y 5,830,851; y miméticos de moléculas pequeñas según se describen la Patente U.S. 5,835,382.

La patente se dirige al uso de citoquinas recombinantes protectoras de tejido para la protección, mantenimiento, mejoramiento restauración de células responsivas y células y tejidos asociados y órganos *in situ* así como *ex vivo*, y a la entrega de una citoquina recombinante protectora de tejido a través de una barrera de células endoteliales con el fin de proteger y mejorar células de respuesta y sus células, tejidos y órganos asociados distales a la vasculatura, o para transportar moléculas asociadas

3. BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención se dirige al uso de varias formas de citoquinas recombinantes protectoras de tejido para la preparación de composiciones farmacéuticas para la protección, mantenimiento, mejoramiento o restauración de la función o viabilidad de células mamíferas de respuesta y sus células, tejidos y órganos asociados. En un aspecto en particular, las células mamíferas de respuesta y sus células, tejidos u órganos están distales a la vasculatura en virtud de una barrera apretada de células endoteliales. En otro aspecto particular, las células, tejidos, órganos u otras partes del cuerpo se aíslan de un cuerpo mamífero, tales como aquellas para trasplante. A modo de ejemplos no limitantes, una célula o tejido de respuesta puede ser neuronal, retinal, muscular, del corazón, pulmón, riñón, hígado, intestino delgado, corteza adrenal, médula adrenal, endotelio capilar, testículos, ovario, páncreas, hueso, piel o célula o tejido del endometrio. Además, ejemplos no limitantes de células de respuesta incluyen fotorreceptoras (varas y conos), ganglios, bipolares, horizontales, amacrinas, Müller, Purkinje, miocardio, marcapasos, nodo sinoatrial, nodo del seno, tejido de articulación,

13

nodo atrioventricular, haz de His, hepatocitos, estelada, Kupffer, mesangial, epitelio renal intersticial tubular, glándula intestinal (criptas), endocrina enteral, glomerulosa, fasciculada, reticular, cromafina, pericito, Leydig, Sertoli, esperma, folículo de Graffian, folículo primordial, islotes de Langerbana, células- α , células- β , células- γ , células-F, osteoprogenitoras, osteoclastos, osteoblastos, estroma endometriales, células endometriales, células de tallo o endoteliales. Estos ejemplos de células de respuesta son solo para fines de ilustración. En un aspecto, la célula de respuesta o sus células, tejidos u órganos no son células, tejidos u órganos excitables, ni predominantemente comprenden células o tejidos excitables. En una realización en particular, la célula, tejido u órgano mamífero para el que se usa la citoquina recombinante protectora de tejido que se menciona arriba, es la célula, tejido u órgano que ha gastado que gastará un periodo de tiempo bajo al menos una condición adversa a la viabilidad de esa célula, tejido u órgano. En una realización en particular, la célula, tejido u órgano mamífero para el cual se utiliza la mencionada citoquina recombinante protectora de tejido, expresa el receptor EPO. Este tipo de condiciones incluye hipoxia traumática *in situ* o disfunción metabólica, hipoxia *in situ* inducida quirúrgicamente o disfunción metabólica, o exposición a toxinas *in situ*, esta última puede estar asociada con quimioterapia o terapia de irradiación. En una realización, las condiciones adversas son el resultado de un *bypass* cardiopulmonar (máquina corazón-pulmón) tal como se utiliza para algunos procedimientos quirúrgicos.

Las citoquinas recombinantes protectoras de tejido de esta invención son útiles para el tratamiento terapéutico o profiláctico de enfermedades humanas del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico que tengan principalmente síntomas neurológicos o psiquiátricos, así como enfermedades oftálmicas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cardiopulmonares, enfermedades respiratorias, enfermedades renales, urinarias y reproductivas, enfermedades gastrointestinales y anomalías endocrinas y metabólicas.

La invención también se dirige a composiciones farmacéuticas que comprenden las anteriores citoquinas recombinantes protectoras de tejido para ser administradas a un mamífero, preferiblemente a un ser humano. Dichas composiciones farmacéuticas pueden formularse para administración intranasal o parenteral, o en forma de una solución perfusada para mantener las viabilidades de células, tejidos u órganos *ex vivo*.

Las citoquinas recombinantes protectoras de tejidos útiles para los propósitos arriba mencionados pueden ser mutéfnas, o una eritropoyetina modificada genéticamente, es decir, una eritropoyetina para la cual exista al menos una modificación de la base amino ácida de la molécula nativa. "Proteína mutante", proteína variante" o mutéfna" significa una proteína que comprende una secuencia de amino ácido mutante e incluye polipéptidos que se diferencian de la secuencia amino ácida de la eritropoyetina debido a

14

eliminaciones, sustituciones de amino ácidos, o ambas. "Secuencia nativa" se refiere a una secuencia de amino ácido o ácido nucleico que es idéntica a una forma nativa o silvestre de un en o proteína. Además, en una realización, las citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la invención tienen actividad celular protectora, pero también tienen uno o más efectos de eritropoyetina en la médula ósea, es decir, más hematocritos (eritropoyesis), acción vasoactiva (vasoconstricción/vasodilatación), hiperactivación de plaquetas, mayor producción de trombocitos y actividades pro-coagulantes. En otra realización, las citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la invención tienen actividad celular protectora, pero no tiene uno o más de los efectos de eritropoyetina en la médula ósea es decir, más hematocrito (eritropoyesis) acción vasoactiva (vasoconstricción/vasodilatación), hiperactivación de plaquetas, mayor producción de trombocitos y actividades pro-coagulantes. Preferiblemente, a una citoquina recombinante celular protectora, protectora de tejido de la invención le falta al menos uno de los efectos de eritropoyetina en la médula ósea; más preferiblemente, a la citoquina recombinante protectora de tejido le faltan todos los efectos de eritropoyetina en la médula ósea.

A modo de ejemplos no limitantes, se pueden hacer cambios en uno o más amino ácidos o hacer supresiones o adiciones, a una molécula de eritropoyetina nativa. En una realización preferida, la citoquina recombinante protectora de tejido tiene una o más modificaciones en una o más de las siguientes regiones: VLQRY (amino ácidos 11-15 de eritropoyetina humana, nativa; SEP ID NO:1) y/o TKVNFYAW (amino ácidos 44-51 de eritropoyetina humana, nativa; SEQ ID NO: 2); y/o SGLRSLTTL (amino ácidos 100-108 de eritropoyetina humana nativa; SEQ ID NO: 3); y/o SNFLRF (amino ácidos 146-151 de eritropoyetina humana, nativa; SEQ ID NO: 4). Se pueden proveer otras mutaciones en los amino ácidos 7, 20, 21, 29, 33, 38, 42, 59, 63, 67, 70, 83, 96, 126, 142, 143, 152, 153, 55, 156 y 161 de SEQ ID NO: 10. Estas otras mutaciones pueden ser solas o en adición a al menos una mutación en al menos una de las regiones arriba mencionadas. En algunas realizaciones, los cambios en uno o más aminoácidos de TKVNFYAW (amino ácidos 44-51 de eritropoyetina humana, nativa; SEQ ID NO: 2) resultan en una molécula de eritropoyetina modificada con función parcial, es decir, que tiene menos actividad eritropoyética que rhu-EPO. En otras realizaciones, cambios en uno o más aminoácidos de SGRSLTTL (aminoácidos 100-108 de eritropoyetina; SEQ ID NO:3) resultan en una citoquina recombinante protectora de tejido con función parcial,, es decir, con menos actividad eritropoyética que rhu-EPO. Las citoquinas recombinantes protectoras de tejido arriba mencionadas exhiben actividad protectora de tejido o protectora celular. Con respecto a actividades eritropoyéticas, a las anteriores citoquinas recombinantes protectoras de tejidos les falta o presenta una reducción en una o más actividades eritropoyéticas. Ejemplos de actividad eritropoyética incluyen aumento de hematocrito,

vasoconstricción, hiperactivación de plaquetas, actividades pro-coagulantes y aumento en la producción de trombocitos. Las actividades eritropoyéticas pueden medirse por técnicas estándar en la técnica. Por ejemplo, los hematocrito pueden medirse utilizando ensayos de célula UT-7 según se describen en la Sección 6.17, o por medio de técnicas descritas en *Physicians' Desk Reference (Medical Economics Company, Inc. Montvale, NJ, 2000)* cuya publicación se incorpora en este contexto en su totalidad. En particular, las páginas 519-525 y 2125-2131 divulgan métodos que pueden emplearse para medir los niveles de hematocrito y se divulgan diferentes rangos de hematocrito que pueden utilizarse como objetivos para evitar toxicidad. Por ejemplo, en pacientes con falla renal crónica, el PDR recomienda dosificar eritropoyetina para lograr hematocrito objetivos no tóxicos entre 30% y 36% en un paciente (por ej: ver PDR pág. 523, col. 1, II. 17-96 y pág. 2129, col. 1, II. 8-93 y sus tablas en las columnas 2 y 3). El PDR observa que la toxicidad en forma de policitemia (una condición marcada por un aumento anormal en el número de glóbulos rojos circulantes) puede evitarse mediante un monitoreo cuidadoso de hematocrito y ajustar las dosis de EPO, reteniendo eritropoyetina si los hematocrito alcanzan el extremo alto del rango objetivo (36% para esta población de pacientes) o si aumenta en más de 4 puntos en cualquier periodo de 2 semanas, hasta que los hematocrito regresen al rango objetivo sugerido (30% a 36% para esta población de pacientes; ver PDR, pág 523, col.1 y pág 2129, col. 1 bajo "*Dose Adjustment*") Por el contrario, para pacientes de cáncer con quimioterapia, el PDR enseña ajustar la dosis a un nivel diferente de hematocrito, es decir, si los hematocrito exceden de 40% (ver pag 2129, col. 2 bajo "*Dose Adjustment*"). En una realización, la citoquina recombinante protectora de tejido tiene una o más actividades eritropoyéticas, pero a niveles que no son suficientes como para causar efectos adversos, es decir, efectos que pesen más que el beneficio terapéutico de la actividad protectora celular de una citoquina recombinante protectora de tejido. En una realización, las citoquinas recombinantes protectoras de tejido que poseen una o más actividades eritropoyéticas pueden aún utilizarse en los métodos de la invención, siempre y cuando se midan los niveles de actividad eritropoyética. En las realizaciones donde la citoquina recombinante protectora de tejido posee una o más actividades eritropoyéticas, éstas se pueden medir y la cantidad y/o régimen de dosificación de la citoquina se puede ajustar para garantizar que la citoquina recombinante protectora de tejido no sea tóxica. En las realizaciones en las que la citoquina recombinante protectora de tejido posee una o más actividades eritropoyéticas, éstas se pueden medir y la cantidad y/o régimen de dosificación de la citoquina se puede ajustar para garantizar que la citoquina recombinante protectora de tejido tenga toxicidad baja. En una realización, la citoquina recombinante protectora de tejido exhibe una disminución en una o más actividades eritropoyéticas en aproximadamente 1%, 2%, 4%,

6%, 8%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% en comparación con EPO recombinante.

La invención provee una citoquina recombinante protectora de tejido que le falta al menos una actividad seleccionada del grupo consistente en aumento de hematocrito, vasoconstricción, hiperactivación de plaquetas, actividades pro-coagulantes y aumento en la producción de trombocitos. La citoquina comprende al menos una actividad protectora celular de respuesta seleccionada del grupo consistente en proteger, mantener, mejorar o restaurar la función o viabilidad de una célula, tejido u órgano mamífero de respuesta.

En una realización de la invención, la citoquina recombinante protectora de tejido comprende uno o más residuos alterados de amino ácidos entre la posición 11 y 15 de la SEQ ID NO: 10 [SEQ ID NO:1], la posición 44 a 51 de la SEQ ID NO: 10 [SEQ ID NO:2]; la posición 100-108 de la SEQ ID NO: [SEQ ID NO:3], o la posición 146-151 de la SEQ ID NO:10 [SEQ ID NO:4].

En otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido comprende un residuo alterado de amino ácido en una o más de las siguientes posiciones de SEQ ID NO:10; 7, 20, 21, 29, 33, 38, 42, 59, 63, 67, 70, 83, 96, 126, 142, 143, 152, 153, 155, 156 o 161.

Aún en otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido comprende la secuencia amino ácida de SEQ ID NO:10 con uno o más de los siguientes cambios (a cada secuencia alterada se le ha asignado un número separado de identificación de secuencia); una alanina en el residuo 6 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:15); una alanina en el residuo 7 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:16); una serina en el residuo 7 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:17); una isoleucina en el residuo 10 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:18); una serina en el residuo 11 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:19); una alanina en el residuo 12 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:20); una alanina en el residuo 13 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:21); una alanina en el residuo 14 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:22); un ácido glutámico en el residuo 14 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:23); una glutamina en el residuo 14 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:24); una alanina en el residuo 15 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:25); una fenilalanina en el residuo 15 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:26); una isoleucina en el residuo 15 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:27); un ácido glutámico en el residuo 20 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:28); una alanina en el residuo 20 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:29); una alanina en el residuo 21 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:30); una lisina en el residuo 24 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:31); una serina en el residuo 29 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:32); una tirosina en el residuo 29 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:33); una asparagina en el residuo 30 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:34); una treonina en el residuo 32 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:35);

X

una serina en el residuo 33 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:36); una tirosina en el residuo 33 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:37); una lisina en el residuo 38 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:38); una lisina en el residuo 83 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:39); una asparagina en el residuo 42 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:40); una alanina en el residuo 42 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:41); una alanina en el residuo 43 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:42); una isoleucina en el residuo 44 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:43); un ácido aspártico en el residuo 45 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:44); una alanina en el residuo 45 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:45); una alanina en el residuo 46 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:46); una alanina en el residuo 47 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:47); una isoleucina en el residuo 48 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:48); una alanina en el residuo 48 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:49); una alanina en el residuo 49 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:50); una serina en el residuo 49 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:51); una fenilalanina en el residuo 51 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:52); una asparagina en el residuo 51 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:53); una alanina en el residuo 52 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:54); una asparagina en el residuo 59 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:55); una treonina en el residuo 62 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:56); una serina en el residuo 67 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:57); una alanina en el residuo 70 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:58); una arginina en el residuo 96 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:59); una alanina en el residuo 97 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:60); una arginina en el residuo 100 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:61); un ácido glutámico en el residuo 100 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:62); una alanina en el residuo 100 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:63); una treonina en el residuo 100 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:64); una alanina en el residuo 101 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:65); una isoleucina en el residuo 101 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:66); una alanina en el residuo 102 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:67); una alanina en el residuo 103 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:68); un ácido glutámico en el residuo 103 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:69); una alanina en el residuo 104 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:70); una isoleucina en el residuo 104 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:71); una alanina en el residuo 105 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:72); una alanina en el residuo 106 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:73); una isoleucina en el residuo 106 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:74); una alanina en el residuo 107 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:75); una leucina en el residuo 107 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:76); una lisina en el residuo 108 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:77); una alanina en el residuo 108 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:78); una serina en el residuo 108 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:79); una alanina en el residuo 116 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:80); una alanina en el residuo 126 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:81); una alanina en el residuo 132 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:82); una alanina en el

18

residuo 133 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:83); una alanina en el residuo 134 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:84); una alanina en el residuo 140 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:85); una isoleucina en el residuo 142 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:86); una alanina en el residuo 143 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:87); una alanina en el residuo 146 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:88); una lisina en el residuo 147 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:89); una alanina en el residuo 147 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:90); una tirosina en el residuo 148 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:91); una alanina en el residuo 148 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:92); una alanina en el residuo 149 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:93); una alanina en el residuo 150 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:94); un ácido glutámico en el residuo 150 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:95); una alanina en el residuo 151 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:96); una alanina en el residuo 152 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:97); un triptofan en el residuo 152 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:98); c una alanina en el residuo 154 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:100); una alanina en el residuo 155 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:101); una alanina en el residuo 158 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:102); una serina en el residuo 160 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:103); una alanina en el residuo 161 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:104); o una alanina en el residuo 162 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:105). En una realización, la citoquina recombinante protectora de tejido comprende la secuencia de amino ácidos SEQ ID NO: ID NO:10 con una o más de las sustituciones de residuos de amino ácidos de las SEQ ID NO: ID Nos: 1-105 y 119.

Aún en otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido comprende la secuencia de amino ácidos de la SEQ ID NO: ID NO: 10 con una supresión de residuos amino ácidos 44-49 de la SEQ ID NO: ID NO:10.

Aún en otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido comprende la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO: ID NO: 10 con al menos uno de los siguientes cambios (a cada secuencia alterada se le ha asignado un número separado de identificación de secuencia); (i) un ácido aspártico en el residuo 45, y un ácido glutámico en el residuo 100 de SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO:106); (ii) una asparagina en el residuo 30, una treonina en el residuo 32 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:107); (iii) un ácido aspártico en el residuo 45, un ácido glutámico en el residuo 150 de la SEQ ID NO:108); (iv) un ácido glutámico en el residuo 103, y una serina en el residuo 108 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:109); (v) una analina en el residuo 140 y una alanina en el residuo 52 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:110); (vi) una alanina en el residuo 140, una analina en el residuo 52, una alanina en el residuo 45 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NNO:111); (vii) una alanina en el residuo 97 y una alanina en el residuo 152 de la SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO:112); (iix) una alanina en el residuo 97, una alanina en el residuo

152, una alanina en el residuo 45 de la SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO:113); (ix) una alanina en el residuo 97, una alanina en el residuo 152, una alanina en el residuo 45, y una alanina en el residuo 52 de la SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO:114); (x) una alanina en el residuo 97, una alanina en el residuo 152, una alanina en el residuo 45, una alanina en el residuo 52 y una alanina en el residuo 140 de la SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO:115); (xi) una alanina en el residuo 97, una alanina en el residuo 152, una alanina en el residuo 45, una alanina en el residuo 52, una alanina en el residuo 140, una alanina en el residuo 154, una lisina en el residuo 24, una lisina en el residuo 38, una lisina en el residuo 83, una lisina en residuo 24 y una alanina en el residuo 15 de la SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO:116); (xii) una lisina en el residuo 24, una lisina en el residuo 38, y una lisina en el residuo 83 de la SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO:117); o (xiv) una lisina en el residuo 24 y una alanina en el residuo 15 de la SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO:118). En una realización, la citoquina recombinante protectora de tejido comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 10 con al menos una de las siguientes sustituciones de residuos de amino ácidos de SEQ ID Nos. 106-118.

Una realización de la invención se dirige a la citoquina recombinante protectora de tejido descrita arriba, que además comprende una modificación química de uno o más amino ácidos. En otra realización, la modificación química comprende alterar la carga de la citoquina recombinante protectora de tejido. Aún en otra realización, una carga positiva o negativa es agregada al residuo de amino ácido donde un residuo de amino ácido carado es modificado a un residuo no cargado.

Además, dichas citoquinas recombinantes protectoras de tejido pueden ser modificadas aún más mediante una modificación química de uno o más amino ácidos, tal como se describe en las siguientes solicitudes co-pendientes: solicitud PCT serie No. PCT/US01/49479, radicada el 28 de diciembre de 2001, Solicitud de Patente U.S. Serie No. 09/753,132 radicada el 29 de diciembre de 2000 y la Solicitud de Patente U.S. Caso No. KW00-009C02-US radicada el 3 de julio de 2002, cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad en este contexto. Estas otras modificaciones químicas pueden utilizarse para realzar las actividades protectoras de tejido de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido o para eliminar cualquier efecto que las citoquinas recombinantes protectoras de tejido puedan tener en la médula ósea. En otra realización, la modificación química adicional se provee para restaurar la solubilidad de la molécula que pueda reducirse como resultado de la modificación genética mencionada, tal como agregando químicamente una carga positiva o negativa a la molécula si un residuo de amino ácido cargado es cambiado por un residuo no cargado.

A modo de ejemplos no limitantes, las citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la invención incluyen mutéina de eritropoyetina humana S100E (SEQ ID

20

NO:5), muteína de eritropoyetina humana K45D (SEQ ID NO:6) y cualquiera de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido pero también protectoras celulares o las que puedan beneficiar a una célula, tejido u órgano de respuesta como las que describen Elliot et al., 1997, *Blood* 89:493-502; Oissel et al., *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, No. 21, págs 15983-15993 (1993); Wen et al., *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, No. 36, págs 22839-22846 (1994) y Syed et al., *Nature*, vol. 395, págs 511-516 (1996), las cuales se incorporan por referencia en su totalidad en este contexto. La presente invención se dirige a métodos para el uso de cualquiera de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido ya mencionadas para la protección, restauración y mejoramiento de células, tejidos y órganos de respuesta.

Otras citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la invención incluyen una eritropoyetina de las ya mencionadas que comprende al menos un amino ácido alterado genéticamente con al menos una modificación adicional que puede ser otra modificación de al menos un amino ácido adicional de la molécula de eritropoyetina, o una modificación de al menos un carbohidrato de la molécula de eritropoyetina. El amino ácido genéticamente alterado puede ser el, o entre los que se modifican adicionalmente. Naturalmente, las moléculas de la citoquina recombinante protectora de tejido, útiles para los propósitos de esta invención, pueden tener una pluralidad de modificaciones en comparación con la molécula de eritropoyetina nativa, tales como modificaciones múltiples de la porción de amino ácido de la molécula, modificaciones múltiples de la porción de carbohidrato de la molécula, o al menos una segunda modificación de la porción de amino ácido de la molécula y al menos una modificación de la porción de carbohidrato de la molécula. La molécula de la citoquina recombinante protectora de tejido retiene su capacidad de proteger, mantener, mejorar o restaurar la función o viabilidad de células mamíferas de respuesta, aunque otras propiedades de la citoquina recombinante protectora de tejido no relacionada con la característica deseada antes mencionada pueden estar ausentes en comparación con la molécula nativa. En una realización preferida, la citoquina recombinante protectora de tejido es no-eritropoyética.

En otra realización, las citoquinas recombinantes pueden modificarse mediante fucosilación para alterar los patrones de glicosilación en una glicoproteína.

Una realización de la invención se dirige a la citoquina recombinante protectora de tejido tal como se describe arriba es una muteína de eritropoyetina humana. En otra realización de la invención, la citoquina recombinante protectora de tejido es una muteína fenilglioxal de eritropoyetina humana. En otra realización de la invención, la citoquina recombinante protectora de tejido es una muteína asialoeritropoyetina humana.

En una realización, tal como se describe arriba, la citoquina recombinante protectora de tejido comprende al menos una actividad protectora celular de respuesta

21

seleccionada del grupo consistente en proteger, mantener, mejorar o restaurar la función o viabilidad de una célula, tejido u órgano mamífero humano. En este tipo de realización, la célula mamífera de respuesta comprende una célula neuronal, muscular, del corazón, pulmón, riñón, hígado, intestino delgado, corteza adrenal, médula adrenal, capilar, endotelio, testículos, ovario, endometrio o célula de tallo. En otras realizaciones, la célula comprende una célula fotorreceptora, ganglio, bipolar, horizontal, amacrina, Müller, miocardio, marcapasos, nodo sinusal, nodo del seno, nodo atrioventricular, haz de His, hepatocitos, estelada, Kupffer, mesangial, de copa, glándula intestinal, endocrina enteral, glomerulosa, fasciculada, reticular, cromafina, pericito, Leydig, Sertoli, espermatozoides, folículo de Graafian, folículo primordial, estroma endometrial o células endometriales.

Según otro aspecto de la invención, la citoquina recombinante protectora de tejido, que se describe arriba, puede atravesar una barrera de células endoteliales. En una realización de este tipo, la barrera de células endoteliales comprende la barrera sangre-cerebro, la barrera sangre-ojo, la barrera testículos-sangre, la barrera sangre-ovario, sangre-placenta, sangre-corazón, sangre-riñón y la barrera sangre-útero.

En otra realización de la invención, la citoquina recombinante protectora de tejido que se describe arriba se modifica aún más. En una realización, la citoquina recombinante protectora de tejido es seleccionada del grupo compuesto por: (i) una citoquina que tiene un número reducido o ningún medio de ácido siálico; (ii) una citoquina que tiene un número reducido o ningún carbohidrato enlazado-N o enlazado-O; (iii) una citoquina que tiene al menos un contenido de carbohidrato reducido en virtud del tratamiento de la citoquina nativa con al menos una glicosidasa; (iv) una citoquina que tiene al menos uno o más carbohidratos oxidados; (v) una citoquina que tiene al menos uno o más carbohidratos oxidados y está reducida químicamente; (vi) una citoquina que tiene al menos uno o más residuos de arginina modificados; (vii) una citoquina que tiene al menos uno o más residuos de lisina modificados o una modificación del grupo amino de terminal-N de una molécula de citoquina; (viii) una citoquina que tiene al menos un residuo de tirosina modificado; (ix) una citoquina que tiene al menos un residuo de ácido aspártico o ácido glutámico modificado; (x) una citoquina que tiene un residuo de triptofan modificado; (xi) una citoquina a la que se le ha retirado al menos un grupo de amino ácido; (xii) una citoquina que tiene al menos una abertura de al menos uno de los enlaces de cistina en la molécula de citoquina; (xiii) una citoquina troncada; (xiv) una citoquina que tiene fijada al menos una molécula de polietilen glicol; (xv) una citoquina que tiene al menos un ácido graso fijado; (xvi) una citoquina que tiene un patrón de glicosilación no mamífero en virtud de la expresión de una citoquina recombinante en células no mamíferas; y (xvii) una citoquina que tiene al menos un amino ácido marcado con histidina para facilitar purificación.

22

En una realización, la citoquina recombinante protectora de tejido de la invención tiene un número reducido de medios de ácido siálico, o ningún medio de ácido siálico. En una realización preferida, la citoquina recombinante protectora de tejido es la forma asialo de una eritropoyetina (es decir no tiene ningún medio de ácido siálico), y más preferiblemente, una asialoeritropoyetina humana. En otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 medios de ácido siálico. El número de sitios disponibles para sialilación puede alterarse por la presencia de uno o más amino ácidos alterados o modificados en la citoquina recombinante protectora de tejido. Por lo tanto, la presente invención cubre realizaciones en donde la citoquina recombinante protectora de tejido es hiposialilada o hipersialilada. En un aspecto preferido, la mutéina de eritropoyetina tiene más que los 14 medios de ácido siálico presentes en eritropoyetina nativa.

En una realización, la citoquina recombinante protectora de tejido es una eritropoyetina sin ningún carbohidrato N enlazado. En otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido es una eritropoyetina con un número reducido de carbohidratos N enlazados. En una realización, la citoquina recombinante protectora de tejido es una eritropoyetina sin ningún carbohidrato O enlazado. En otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido es una eritropoyetina con un número reducido de carbohidratos O enlazados.

En otra realización, las citoquinas recombinantes protectoras de tejido pueden modificarse mediante fucosilación para alterar los patrones de glicosilación en una glicoproteína.

Aún en otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido es tratada al menos con una glicosidasa. En otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido tiene al menos un contenido reducido de carbohidrato como resultado del tratamiento de la citoquina recombinante protectora de tejido con al menos una glicosidasa.

Aún en otra realización, la porción de carbohidrato de la citoquina recombinante protectora de tejido tiene al menos un patrón de glicosilación no mamífero como resultado de la expresión de una eritropoyetina recombinante en células no mamíferas. En realizaciones preferidas, las citoquinas recombinantes protectoras de tejidos son expresadas en células de insectos, células de plantas, células de bacterias o células de levadura.

Aún en otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido tiene además al menos uno o más carbohidratos oxidados que también pueden ser reducidos químicamente. En una realización preferida, la citoquina recombinante protectora de tejido es una eritropoyetina oxidada con periodato. En ciertas realizaciones, la

23

eritropoyetina oxidada con periodato es reducida químicamente con cianoborohidruro sódico.

Aún en otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido para los usos ya mencionados tiene al menos uno o más residuos de arginina modificada. En una realización, la citoquina recombinante protectora de tejido comprende un medio R-glioxal en el o más residuos de arginina, en donde R es un medio arilo o alquilo. Aún en otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido es fenilglioxal-eritropoyetina. Aún en otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido es una eritropoyetina en la que el residuo de arginina es modificado mediante la reacción con una dicetona vecinal, tal como, pero sin limitar, 2,3-butanediona y ciclohexanediona. Aún en otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido es una eritropoyetina en la que un residuo de arginina es reaccionado con 3-deoxiglucosona.

Aún en otra realización, la citoquina recombinante comprende al menos uno o más residuos de lisina modificada o una modificación del grupo amino de terminal N de la molécula de eritropoyetina, dichas modificaciones como las que resultan de la reacción del residuo de lisina o del grupo amino de terminal N con un agente modificador del grupo amino. El residuo de lisina modificada puede ser reducido químicamente aún más. En una realización preferida, una citoquina recombinante protectora de tejido es biotinilada o carbamilada o acilada, tal como acetilada, por medio de uno o más grupos de lisina. En otra realización preferida, la lisina es reaccionada con aldehído o azúcar reductora para formar una imina, la cual puede estabilizarse mediante reducción como con cianoborohidruro sódico para formar una lisina N-alquilada tal como glucitolil lisina, o que en el caso de azúcares reductoras puede estabilizarse mediante rearreglo Amadori o Heyns para formar un azúcar alfa-deoxi alfa-amino tal como alfa-deoxi-alfa-fructosillisina. En otra realización preferida, el grupo de lisina es carbamilo (carbamilo) tal como en virtud de una reacción con ión de cianato, alquil-carbamilo, aril-carbamilo o aril-tiocarbamilado con un alquil-isocianato, aril-isocianato o aril-isotiocianato, respectivamente, o puede acilarse por medio de un ácido alquilcarboxílico reactivo o un derivado de ácido alquilcarboxílico, tal como mediante reacción con anhídrido acético, anhídrido succínico, o anhídrido ftálico. Al menos un grupo de lisina también puede ser trinitrofenil, modificado mediante reacción con un ácido trinitrobencenosulfónico, o preferiblemente con sus sales. En otra realización, los residuos de lisina pueden modificarse mediante reacción con un derivado de glioxal, tal como reacción con glioxal, metilglioxal o 3-deoxiglucosona, para formar los correspondientes derivados de alfa-carboxialquil. En una realización relacionada, la citoquina carbamilada comprende alfa-N-carbamiloeritropoyetina; N-epsilon-carbamiloeritropoyetina; alfa-N-carbamilo, N-epsilon-carbamiloeritropoyetina; alfa-N-

24

carbamoilasialeritropoyetina; N-epilson-carbamoilasialeritropoyetina; alfa-N-carbamoil, N-epilson-carbamoilasialeritropoyetina; alfa-N-carbamoilhiposialoeritropoyetina; N-epilson-carbamoilhiposialeritropoyetina; y alfa-N-carbamoil, N-epilson-carbamoilhiposialeritropoyetina; y alfa-N-carbamoil, N-epilson-carbamoilhiposialeritropoyetina. Aún en otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido comprende al menos un residuo de lisina acilado. Aún en otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido comprende al menos un residuo de lisina acilado. Aún en otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido comprende al menos un residuo de lisina acilado. En una realización asociada, la citoquina acetilada comprende alfa-N-acetileritropoyetina; N-epilson-acetileritropoyetina; alfa-N-acetil, N-epilson-acetileritropoyetina; alfa-N-acetilasialoeritropoyetina; N-epilson-acetilasialoeritropoyetina; alfa-N-acetil, N-epilson-acetilasialoeritropoyetina; alfa-N-acetilhiposialoeritropoyetina; N-epilson-acetilhiposialoeritropoyetina; alfa-N-acetil, N-epilson-acetilhiposialeritropoyetina; alfa-N-acetilhipersialoeritropoyetina; N-epilson-acetilhipersialoeritropoyetina; alfa-N-acetil, y N-epilson-acetilhipersialoeritropoyetina.

Aún en otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido tiene un residuo de lisina que está succinilado. En una realización asociada, la citoquina succinilada comprende alfa-N-succinileritropoyetina; N-epilson-succinileritropoyetina; alfa-N-succinil, N-epilson-succinileritropoyetina; alfa-N-succinilasialoeritropoyetina; n-epilson-succinilhiposialoeritropoyetina; alfa-N-succinil, N-epilson-succinilhiposialoeritropoyetina; alfa-N-succinilhipersialoeritropoyetina; N-epilson-succinilhipersialoeritropoyetina; y N-epilson-succinilpiersialoeritropoyetina.

En una realización, al menos un residuo de tirosina de una citoquina recombinante protectora de tejido puede modificarse en una posición de anillo aromático por medio de un reactivo electrofílico, tal como por nitración o iodinación. En una realización asociada, la citoquina recombinante protectora de tejido que se describe arriba comprende al menos un residuo de lisina modificado por 2,4,6 trinitrobencenosulfonato sódico u otra sal de lo mismo.

En otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido comprende al menos un residuo de tirosina nitrado o iodinado.

En otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido comprende un residuo de ácido aspártico o de ácido glutámico que es reaccionado con una carbodiimida seguida por reacción con una amina. En una realización asociada, la amina es glicinamida.

25

En una realización, al menos un residuo de triptofan de una citoquina recombinante protectora de tejido es modificado, tal como mediante reacción con n-bromosuccinimida o n-clorosuccinimida.

En otra realización, se provee una citoquina recombinante protectora de tejido a la que se le ha retirado al menos un grupo amino de eritropoyetina, tal como mediante reacción con ninhidrina, seguida por reducción del grupo carbonilo resultante por reacción con borohidruro.

Aún en otra realización, se provee una citoquina recombinante protectora de tejido que tiene al menos una abertura de al menos uno de los enlaces de cistina en la molécula mediante reacción con agente reductor tal como ditioneol, seguida por la reacción de los sulfhidrilos subsiguientes con iodoacetamida, ácido iodoacético u otro electrófilo para prevenir la reformación de los enlaces de disulfuro.

Aún en otra realización, la citoquina recombinante protectora de tejido es sometida a una proteólisis química limitada que identifica residuos específicos, por ejemplo, para adherirse luego de los residuos de triptofan. En esta patente se incluyen estos fragmentos de citoquina recombinante protectora de tejido.

Tal como se dijo arriba, una citoquina recombinante protectora de tejido útil para los propósitos que se exponen aquí, puede tener opcionalmente una de las modificaciones químicas mencionadas además del(los) amino ácido(s) alterado(s) genéticamente, pero puede tener más de una de las anteriores modificaciones. A modo de ejemplo de una citoquina recombinante protectora de tejido con una modificación a la porción de carbohidrato de la molécula y una modificación a la porción de amino ácido, una citoquina recombinante protectora de tejido es una asialeritropoyetina que tiene sus residuos de lisina biotinilados, acilados (como acetilados) o carbamilados. Las citoquinas recombinantes protectoras de tejido también pueden modificarse por la adición de cadenas de ácido graso. En otra realización, una citoquina recombinante protectora de tejido es modificada mediante pegalación, para crear citoquinas protectoras de tejido pegiladas mediante la adición de polietilen glicol (PEG).

Según un aspecto de la invención, se provee una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleótida que codifica un polipéptido que comprende la citoquina recombinante protectora de tejido que se describe arriba. En una realización, la molécula aislada de ácido nucleico comprende la secuencia nucleótida de los residuos nucleótidos 5461 a 6041 de la construcción del vector de la SEQ ID NO:208, residuos nucleótidos 5461 a 6041 de la SEQ ID NO:209; residuos nucleótidos 5461 a 6041 de la SEQ ID NO: 210; residuos nucleótidos 5461 a 6041 de la SEQ ID NO:211, o residuos nucleótidos 5461 a 6041 de la SEQ ID NO:212.

En una realización de la invención, se provee una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica (es decir un cADN, una secuencia nucleotídica interrumpida por intrones, o ininterrumpida por intrones), que codifica un polipéptido que comprende o consiste de la citoquina recombinante antes descrita, con la salvedad, de que la molécula de ácido nucleico no codifica una citoquina recombinante protectora de tejido que comprenda una o más de las siguientes sustituciones de amino ácido: I6A, C7A, K20A, P42A, D43A, K45D, D45A, F48A, Y49A, K52A, K49A, S100E, R103E A, K116A, T132A, I133A, K140A, N147K, N147A, R150A, R150E, G151A, K152A, K154A, G158A, C161A o R162A. En una realización asociada, se provee una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que comprende una citoquina recombinante protectora de tejido tal como se describe arriba, con la salvedad de que la molécula de ácido nucleico no codifica una citoquina recombinante protectora de tejido que comprenda cualquiera de las siguientes combinaciones de sustituciones: N24K/N38K/N83K o A30N/N32T. En una realización, la secuencia nucleotídica que codifica la citoquina recombinante protectora de tejido, es sintetizada utilizando codones preferidos que facilitan la expresión óptima en una célula anfitriona en particular. Dichos codones preferidos pueden ser óptimos para expresión en células de una especie de plata, bacteria, levadura, mamífera, fungal o de insecto.

La invención también provee un vector que comprende la molécula de ácido nucleico. La invención también provee un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico y al menos una región reguladora enlazada operativamente a la molécula de ácido nucleico. En una realización, el vector es un vector pCiNeo. En otra realización, la invención provee una célula que comprende el vector de expresión. Aún en otra realización, se provee una célula diseñada genéticamente que comprende la molécula de ácido nucleico.

Según otro aspecto de la invención, se provee una composición farmacéutica que comprende una citoquina recombinante protectora de tejido como la que se describe arriba, a la que le falta al menos una actividad eritropoyética seleccionada del grupo consistente en aumento de hematocritos, vasoconstricción, hiperactivación de plaquetas, actividades pro-coagulantes y aumento en la producción de trombocitos. Según otro aspecto de la invención, se provee una composición farmacéutica que comprende una citoquina recombinante protectora de tejido como la ya descrita, pero a la citoquina no le falta al menos una actividad eritropoyética seleccionada del grupo consistente en aumento de hematocritos, vasoconstricción, hiperactivación de plaquetas, actividades pro-coagulantes y aumento en la producción de trombocitos. La citoquina comprende al menos una actividad protectora celular de respuesta, seleccionada del grupo consistente

27

en proteger, mantener, mejorar o restaurar la función o viabilidad de una célula, tejido u órgano mamífero de respuesta. La citoquina recombinante de la composición farmacéutica puede comprender la secuencia amino ácida de la SEQ ID NO:10 con al menos uno de los siguientes cambios, es decir, sustituciones, (a cada cambio o combinación de cambios se le ha asignado un número separado de identificación de la secuencia): (i) un ácido aspártico en el residuo 45, y un ácido glutámico en el residuo 100 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:106); una asparagina en el residuo 30, una treonina en el residuo 32 de la SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO:107); (iii) un ácido aspártico en el residuo 45, un ácido glutámico en el residuo 150 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:108); (iv) un ácido glutámico en el residuo 103, y una serina en el residuo 108 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:109); (v) una alanina en el residuo 140, y una alanina en el residuo 52 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:110); (vi) una alanina en el residuo 140, una alanina en el residuo 52, una alanina en el residuo 45 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:110); (vii) una alanina en residuo 97 y una alanina en el residuo 153 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:112); (ix) una alanina en el residuo 97, una alanina en el residuo 152, una alanina en el residuo 45 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:113); (ix) una alanina en el residuo 97, una alanina en el residuo 152, una alanina en el residuo 45, y una alanina en el residuo 52 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:114); (x) una alanina en el residuo 97, una alanina en el residuo 152, una alanina en el residuo 45, una alanina en el residuo 52, y una alanina en residuo 140 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:115); (xi) una alanina en el residuo 97, una alanina en el residuo 152, una alanina en el residuo 45, una alanina en el residuo 52, una alanina en residuo 140, una alanina en el residuo 154, una lisina en el residuo 24, una lisina en el residuo 38, una lisina en el residuo 83, una lisina en el residuo 24 y una alanina en el residuo 15 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:116); (xii) una lisina en el residuo 24, una lisina en el residuo 38, y una lisina en el residuo 83 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:117); o (xiv) una lisina en el residuo 24 y una alanina en el residuo 15 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:118).

Según otro aspecto de la invención, se provee una composición farmacéutica para proteger, mantener, mejorar o restaurar la función o viabilidad de células mamíferas de respuesta y sus células, tejidos y órganos asociados, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una citoquina recombinante protectora de tejido, que comprende al menos una de las siguientes sustituciones de amino ácido: (a cada cambio o combinación de cambios se le ha asignado un número separado de identificación de la secuencia): un triftopan en el residuo 152 de la SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO:98); una alanina en el residuo 14 y una alanina en el residuo 15 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:119); una alanina en el residuo 6 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:15); una alanina en el residuo 7 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:16); una alanina en el residuo 43 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:42); una alanina en el residuo 42 de la SEQ ID NO:10

25

(SEQ ID NO:41); una alanina en el residuo 48 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:49); una alanina en el residuo 49 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:50); una treonina en el residuo 32 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:50); una treonina en el residuo 32 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:35); una alanina en el residuo 133 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:83); una alanina en el residuo 134 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:84); una alanina en el residuo 147 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:90); una alanina en el residuo 148 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:92); una alanina en el residuo 150 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:94); una alanina en el residuo 151 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:96); una alanina en el residuo 158 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:102); una alanina en el residuo 161 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:104); o una alanina en el residuo 162 de la SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:105).

En una realización, la composición farmacéutica arriba descrita es formulada para administración oral, intranasal o parenteral. En otra realización, la composición farmacéutica es formulada como una solución perfusada.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención para proteger, mantener, mejorar o restaurar la función o viabilidad de células mamíferas de respuesta y sus células, tejidos y órganos asociados, comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de una citoquina recombinante, que comprende al menos una sustitución de residuos amino ácidos de una secuencia amino ácida de eritropoyetina humana, nativa.

En otras realizaciones, una composición farmacéutica de la invención para proteger, mantener, mejorar o restaurar la función o viabilidad de células mamíferas de respuesta y sus células, tejidos y órganos asociados, comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una citoquina recombinante protectora de tejido, que comprende actividad protectora celular puede faltarle una o más actividades o efectos eritropoyéticos tales como aumento de hematocrito, acción vasoactiva (vasoconstricción/vasodilatación) hiperactivación de plaquetas, actividades pro-coagulantes y aumento en la producción de trombocitos.

En otras realizaciones, una composición farmacéutica de la invención para proteger, mantener, mejorar o restaurar la función o viabilidad de células mamíferas de respuesta y sus células, tejidos y órganos asociados, comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una citoquina recombinante protectora de tejido, que comprende actividad protectora celular, también tiene una o más actividades o efectos eritropoyéticos tales como aumento de hematocritos, acción vasoactiva (vasoconstricción/vasodilatación), hiperactivación de plaquetas, actividades pro-coagulantes y aumento en la producción de trombocitos.

29

Según un aspecto de la invención, se provee un método para proteger, mantener o mejorar la viabilidad de una célula, tejido u órgano aislado de un cuerpo mamífero, que comprende exponer dicha célula, tejido u órgano a una composición farmacéutica que comprende una citoquina recombinante protectora de tejido que comprende una eritropoyetina a la que le falta al menos una actividad eritropoyética seleccionada del grupo consistente en aumentar hematocrito, acción vasoactiva (vasoconstricción/vasodilatación), hiperactivación de plaquetas, actividad pro-coagulante y aumento en la producción de trombocitos. En ciertas realizaciones, la protección no afecta la medula ósea.

La invención también provee un método para proteger, mantener o mejorar la viabilidad de una célula, tejido u órgano aislado de un cuerpo mamífero, que comprende exponer dicha célula, tejido u órgano a una composición farmacéutica que comprende una citoquina recombinante protectora de tejido, como se describe arriba a la que le falta al menos una actividad eritropoyética seleccionada del grupo consistente en aumentar hematocrito, acción vasoactiva (vasoconstricción/vasodilatación), hiperactivación de plaquetas, actividad pro-coagulante y aumento en la producción de trombocitos.

La invención provee además el uso de una citoquina recombinante protectora de tejido como la que se describe antes, a la que le falta al menos una actividad eritropoyética seleccionada del grupo consistente en aumento de hematocritos, acción vasoactiva (vasoconstricción/vasodilatación), hiperactivación de plaquetas, actividad pro-coagulante y aumento en la producción de trombocitos, para la preparación de una composición farmacéutica para la protección y prevención de una lesión de tejido así como para la restauración y rejuvenecimiento de tejidos y función de tejidos en un mamífero. En una realización, la lesión es causada por un ataque, esclerosis múltiple, hipotensión, arresto cardíaco, isquemia, infarto del miocardio, inflamación, pérdida de la función cognitiva asociada con la edad, daño por radiación, parálisis cerebral, enfermedad neurodegenerativa, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, mal de Leigh, demencia por SIDA, pérdida de la memoria, esclerosis lateral, alcoholismo, trastorno del ánimo, ansiedad, déficit en la atención, hiperactividad, autismo, mal de Creutzfeld-Jakob, trauma o isquemia cerebral o de la columna vertebral, *bypass* corazón-pulmón, falla cardíaca crónica, degeneración macular, neuropatía diabética, retinopatía diabética, glaucoma, isquemia retinal o trauma retinal.

Según otro aspecto de la invención, se provee un método para facilitar la transcitosis de una molécula a través de una barrera de célula endotelial en un mamífero que comprende la administración a dicho mamífero de una composición que comprende dicha molécula junto con una citoquina recombinante protectora de tejido como la que se describe arriba, a la que le falta al menos una actividad seleccionada del grupo

9

consistente en aumento de hematocrito, acción vasoactiva (vasoconstricción/vasodilatación), hiperactivación de plaquetas, actividad pro-coagulante y aumento en la producción de trombocitos. En una realización, la asociación es un enlace covalente lábil, un enlace covalente estable, o una asociación no covalente con un sitio de enlace para dicha molécula. Según otro aspecto de la invención, se provee un método para facilitar la transcitosis de una molécula a través de una barrera de células endoteliales en un mamífero, que comprende la administración a dicho mamífero de una composición que comprende dicha molécula junto con una citoquina recombinante protectora de tejido tal como la que se describe arriba, y que tiene la capacidad seleccionada del grupo consistente en aumento de hematocritos, acción vasoactiva (vasoconstricción/vasodilatación), hiperactivación de plaquetas, actividad pro-coagulante y aumento en la producción de trombocitos. En una realización, la asociación es un enlace covalente lábil, un enlace covalente estable, o una asociación no covalente con un sitio de enlace para dicha molécula. En otra realización, la barrera de células endoteliales es seleccionada del grupo compuesto por la barrera sangre-cerebro, sangre-ojo, sangre-testículos, sangre-ovario, sangre-corazón, sangre-riñón y sangre-placenta. Aún en otra realización, la molécula es un agonista receptor u hormona antagonista, un factor neurotrófico, un agente antimicrobiano, un agente antiviral, un radiofarmacéutico, oligonucleótido antisentido, un anticuerpo, inmunodepresivo, un colorante, un marcador o un fármaco anticancerígeno.

Según otro aspecto de la invención, se provee una composición para transportar una molécula por medio de transcitosis a través de una barrera de células endoteliales que comprenden dicha molécula junto con una citoquina recombinante protectora de tejido como la que se describe arriba, a la que le falta al menos una actividad eritropoyética seleccionada del grupo consistente en aumento de hematocritos, acción vasoactiva (vasoconstricción/vasodilatación), hiperactivación de plaquetas, actividad pro-coagulante y aumento en la producción de trombocitos. Según otro aspecto de la invención, se provee una composición para transportar una molécula por medio de transcitosis a través de una barrera de células endoteliales que comprende dicha molécula junto con una citoquina recombinante protectora de tejido tal como la que se describe arriba, a la que le falta al menos una actividad eritropoyética seleccionada del grupo consistente en aumento de hematocritos, acción vasoactiva (vasoconstricción/vasodilatación), hiperactivación de plaquetas, actividad pro-coagulante y aumento en la producción de trombocitos. En una realización, la asociación es un enlace covalente lábil, un enlace covalente estable, o una asociación no covalente con un sitio de enlace para dicha molécula. En otra realización, la molécula es un agonista receptor u hormona antagonista, un factor neurotrófico, un agente antimicrobiano, un agente antiviral, un

radiofarmacéutico, oligonucleótido antisentido, un anticuerpo, inmunodepresivo, un colorante, un marcador o un fármaco anticancerígeno.

La invención también provee el uso de una citoquina recombinante protectora de tejido tal como la que se describe arriba, a la que le falta al menos una actividad eritropoyética seleccionada del grupo consistente en aumento de hematocritos, acción vasoactiva (vasoconstricción/vasodilatación), hiperactivación de plaquetas, actividad pro-coagulante y aumento en la producción de trombocitos. En una realización, la asociación es un enlace covalente lábil, un enlace covalente estable, o una asociación no covalente con un sitio de enlace para dicha molécula. En otra realización, la molécula es un agonista receptor u hormona antagonista, un factor neurotrófico, un agente antimicrobiano, un agente antiviral, un radiofarmacéutico, oligonucleótido antisentido, un anticuerpo, inmunodepresivo, un colorante, un marcador o un fármaco anticancerígeno.

Por ello, la invención se dirige a un uso protector celular de cualquier citoquina recombinante protectora de tejido con una alteración en al menos un amino ácido de la eritropoyetina nativa opuesta, en donde la citoquina recombinante protectora de tejido tiene actividad protectora celular tal como se describe aquí. Dicha actividad protectora celular incluye, más no se limita a actividad neuroprotectora. La invención también se dirige al uso de cualquiera de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido antes mencionadas en el tratamiento de una célula, tejido u órgano de respuesta, en particular, para el tratamiento de una condición o enfermedad que involucre a dicha célula, tejido u órgano de respuesta. En este tipo de realización, las citoquinas recombinantes protectoras de tejido tienen al menos una actividad seleccionada del grupo consistente en aumento de hematocritos, acción vasoactiva (vasoconstricción/vasodilatación), hiperactivación de plaquetas, actividad pro-coagulante y aumento en la producción de trombocitos. Una citoquina recombinante protectora de tejido según la invención mantiene preferiblemente la conformación tridimensional de la eritropoyetina nativa. La citoquina recombinante protectora de tejido puede tener o no tener actividad eritropoyética.

En una realización de la invención, la citoquina recombinante protectora de tejido es creada como una proteína recombinante con fusión del terminal N de su etiqueta His (residuos 6xHis). En algunas realizaciones, se pueden agregar secuencias adicionales de amino ácidos como espaciadores. En una realización específica, las muteínas de la citoquina recombinante protectora de tejido marcadas con histidina, según la invención, incluyen, más no se limitan a: K45D-6xHis y S100-6xHis.

En otro aspecto de la invención, cualquiera de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido puede utilizarse en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento *ex vivo* de células, tejidos y órganos con el fin de proteger, mantener, mejorar o restaurar la función o viabilidad de células mamíferas de respuesta y sus

32 ✓

correspondientes células, tejidos y órganos. Este tipo de tratamiento *ex vivo* es útil, por ejemplo, para la preservación de células, tejidos u órganos para trasplante, bien sea autotrasplante o xenotrasplante. Las células, tejido u órgano pueden bañarse en una solución que comprende muteínas de eritropoyetina o citoquinas recombinantes protectoras de tejido, o infundir el perfusado en el órgano por medio de la vasculatura u otros medios, para mantener el funcionamiento celular durante el periodo en el que las células, tejido u órgano no están integrados con la vasculatura del donante o recipiente. La administración del perfusado puede hacerla el donante antes de recoger el órgano, como también al órgano recogido y al receptor. Además, el anterior uso de cualquier citoquina recombinante es útil cuando una célula, tejido u órgano queda aislado de la vasculatura del individuo y por lo tanto, que esencialmente exista *ex vivo* durante un periodo de tiempo; la expresión "aislado" se refiere a restringir o grapar la célula, tejido, órgano o parte corporal, tal como se hace en cirugía, incluida en particular, cirugía de *bypass* cardio-pulmonar, *bypass* de la vasculatura de la célula, tejido, órgano o parte corporal; remoción de célula, tejido, órgano o parte corporal del cuerpo del mamífero, como lo que se hace antes de xenotrasplante o antes y durante autotrasplante; o amputación traumática de una célula, tejido, órgano o parte corporal. Por ello, este aspecto de la invención se refiere a la perfusión con una muteína de eritropoyetina tanto *in situ* como *ex vivo*. *Ex vivo*, la citoquina recombinante protectora de tejido puede proveerse en una solución de preservación de la célula, tejido u órgano. Para cualquier aspecto, la exposición puede ser a modo de perfusión continua, perfusión pulsátil, infusión, baño, inyección o cateterización.

Aún en otro aspecto, la invención se dirige a un método para proteger, mantener, mejorar o restaurar la viabilidad de una célula, tejido, órgano o parte corporal de un mamífero que incluya una célula o tejido de respuesta, en el cual la célula, tejido, órgano o parte corporal queda aislada del cuerpo del mamífero. El método incluye al menos exponer la célula, tejido, órgano o parte corporal aislada del mamífero a una cantidad de una muteína de eritropoyetina o citoquina recombinante protectora de tejido durante el tiempo que sea efectiva para proteger, mantener, mejorar o restaurar la mencionada viabilidad. En ejemplos no limitantes, aislado se refiere a restringir o grapar la vasculatura de la célula, tejido, órgano o parte corporal tal como se hace en cirugía, incluida en particular, cirugía de *bypass* cardio-pulmonar, *bypass* de la vasculatura de la célula, tejido, órgano o parte corporal; remoción de célula, tejido, órgano o parte corporal del cuerpo del mamífero, como lo que se hace antes de xenotrasplante o antes y durante autotrasplante; o amputación traumática de una célula, tejido, órgano o parte corporal. Por ello, este aspecto de la invención se refiere a la perfusión con una muteína de eritropoyetina tanto *in situ* como *ex vivo*. *Ex vivo*, la citoquina recombinante protectora de tejido puede proveerse en una solución de preservación de la célula, tejido u órgano.

Para cualquier aspecto, la exposición puede ser a modo de perfusión continua, perfusión pulsátil, infusión, baño, inyección o cateterización.

A modo de ejemplos, la célula o tejido de respuesta *ex vivo* puede ser neuronal, retinal, muscular, del corazón, pulmón, riñón, hígado, intestino delgado, corteza adrenal, médula adrenal, endotelio capilar, testículos, ovario, páncreas, hueso, piel o célula o tejido del endometrio. Estos ejemplos de células de respuesta son meramente ilustrativos.

Preferiblemente, todos los anteriores métodos y usos son aplicables a seres humanos, pero también son útiles para uso en cualquier mamífero, tales como, pero sin limitar, a animales de compañía, animales domesticados, ganado y animales salvajes. Las rutas de administración de las anteriores composiciones farmacéuticas incluyen vía intravenosa, intranasal, tópica, intraluminal, inhalación o administración parenteral, esta última incluye administración intravenosa, intra-arterial, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, submucosal o intradermal. Para uso *ex vivo*, se prefiere una solución perfusada o en baño. Esto incluye perfusar una porción aislada de la vasculatura *in situ*.

Aún en otro aspecto de la invención, cualquiera de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido antes mencionadas son útiles en la preparación de una composición farmacéutica para restaurar una célula, tejido u órgano disfuncional cuando es administrada luego del comienzo de la enfermedad o condición responsable por la disfunción. A modo de ejemplo no limitante, la administración de una composición farmacéutica que comprende una citoquina recombinante protectora de tejido, restaura la función cognitiva en animales que previamente hayan tenido trauma cerebral, aún cuando se administre largo tiempo después (por ej: uno, dos tres, cinco días, una semana, un mes o más) del trauma inicial. La presente invención abarca composiciones farmacéuticas para el tratamiento (es decir, aliviar o revertir los síntomas o efectos) y prevención (como retardar el comienzo, inhibir o detener) de daño posterior a células y tejidos que resulten de trauma inicial. Las citoquinas recombinantes protectoras de tejido útiles para este tipo de aplicaciones incluyen cualquiera de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido. Cualquier forma de citoquina recombinante protectora de tejido capaz de beneficiar células de respuesta se incluye en este aspecto de la invención.

Aún en otra realización, la invención provee métodos para el uso de la citoquina recombinante protectora de tejido ya mencionada, para restaurar una célula, tejido u órgano disfuncional cuando es administrada al comienzo de la enfermedad o condición responsable por la disfunción. A modo de ejemplo no limitante, los métodos de administración de una composición farmacéutica que comprenda una citoquina recombinante protectora de tejido restablece la función cognitiva en animales que hayan tenido previamente trauma cerebral, aún cuando la composición sea administrada tiempo después (como tres días, cinco días, una semana, un mes, o más) de que el trauma haya

34

amainado. Las citoquinas recombinantes protectoras de tejido y otras modificaciones de las mismas son según se describe anteriormente. Cualquier forma de citoquina recombinante protectora de tejido capaz de beneficiar células de respuesta se incluye en este aspecto de la invención.

Aún en otro aspecto de la presente invención, se provee métodos para facilitar la transcitosis de una molécula a través de una barrera de células endoteliales en un mamífero mediante la administración de una composición de una molécula junto con una muteína de eritropoyetina o una citoquina recombinante protectora de tejido como la que se describe arriba.

La asociación entre la molécula a ser transportada y la citoquina recombinante puede ser, por ejemplo, un enlace covalente lábil, un enlace covalente estable, o una asociación no covalente con un sitio de enlace para la molécula. La citoquina recombinante protectora de tejido y una proteína que vayan a ser transportadas pueden expresarse como un polipéptido de fusión. Las barreras de células endoteliales pueden ser la barrera sangre-cerebro, sangre-corazón, sangre-riñón, sangre-ojo, sangre-testículos, sangre-ovario y sangre-placenta. Moléculas adecuadas para el transporte mediante el método de la presente invención incluyen hormonas tales como la hormona del crecimiento, antibióticos y agentes anticancerígenos.

En otro aspecto de la presente invención, se provee una composición para facilitar la transcitosis de una molécula a través de una barrera de células endoteliales en un mamífero; dicha composición comprende dicha molécula junto con una citoquina recombinante protectora de tejido como la que se describe arriba.

Aún en otros aspecto de la presente invención, cualquiera de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido ya mencionadas es útil ene la preparación de una composición farmacéutica para facilitar la transcitosis de una molécula a través de una barrera de células endoteliales en un mamífero; dicha composición comprende dicha molécula junto con una citoquina recombinante protectora de tejido como la que se describe arriba.

La asociación puede ser, por ejemplo, un enlace covalente lábil, un polipéptido de fusión, un enlace covalente estable, o una asociación no covalente con un sitio de enlace para la molécula. Las barreras de células endoteliales pueden ser la barrera sangre-cerebro, sangre-corazón, sangre-riñón, sangre-ojo, sangre-testículos, sangre-ovario y sangre-placenta. Moléculas adecuadas para el transporte mediante el método de la presente invención incluyen hormonas tales como la hormona del crecimiento, factores neurotróficos, antibióticos, antivirales o antifungales tales como los que normalmente se excluyen del cerebro y otros órganos con barrera, radiofarmacéuticos péptidos, drogas

antisentido, anticuerpos contra agentes biológicamente activos, productos farmacéuticos, tintes, marcadores y agentes anticancerígenos.

Estos y otros aspectos de la presente invención se apreciarán mejor haciendo referencia a las siguientes Figuras y Descripción Detallada.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la distribución de un receptor de eritropoyetina en un cerebro humano normal, en secciones delgadas manchadas con un anticuerpo de anti-eritropoyetina.

La Figura 2 es una ampliación de alta potencia de la imagen de la Figura 1.

La Figura 3 muestra, utilizando anticuerpos secundarios marcados en dorado, la distribución ultramicroscópica de receptores de eritropoyetina

La Figura 4, preparada similarmente a la Figura 3, muestra receptores de eritropoyetina de alta densidad en las superficies lumbales y anti-lumbales de las capilares del cerebro humano.

La Figura 5 muestra la translocación de eritropoyetina administrada parenteralmente en el fluido cerebro espinal.

Las Figuras 6 A y 6B indican los resultados del estudio de neuroprotección de células neuroblastomas SK-N-SH (contra rotenona) para eritropoyetina, así como las citoquinas recombinantes protectoras de tejido con citoquinas recombinantes protectoras de tejido K45D y S100E. El eje-y en la gráfica indica las lecturas de absorbancia, y los datos son rango $\pm$ medios de determinaciones duplicadas. La gráfica dentro de la Figura 6 A indica claramente que la viabilidad de las células dentro de las muestras K45D y S100E mantuvieron su viabilidad demostrando su efecto protector celular. La Figura 6B muestra el mapa plásmido de HEPO-6xHisTag-PciNeo.

La Figura 7 compara la eficacia *in vitro* de eritropoyetina y asialoeritropoyetina en la viabilidad de células P19 privadas de suero.

La Figura 8 es otro experimento que compara la eficacia *in vitro* de eritropoyetina y asialoeritropoyetina sobre la viabilidad de células P19 privadas de suero.

La Figura 9 muestra la protección de eritropoyetina y asialoeritropoyetina en un modelo de isquemia cerebral focal en rata.

La Figura 10 muestra una respuesta de dosis que compara la eficacia de eritropoyetina humana y asialoeritropoyetina humana en la oclusión de la arteria cerebral media en un modelo de ataque isquémico.

La Figura 11 muestra la actividad de eritropoyetina iodinada en el estudio P19.

La Figura 12 muestra el efecto de eritropoyetina y asialoeritropoyetina biotinilada en el estudio P19.

La Figura 13 compara la eficacia *in vitro* de eritropoyetina con eritropoyetina modificada con fenilglioxal sobre la viabilidad de células P19 privadas de suero.

La Figura 14 muestra el efecto de citoquinas protectoras de tejido en el estudio de intoxicación de agua.

La Figura 15 muestra el mantenimiento de la función de un corazón preparado para transplante por una eritropoyetina.

La Figura 16 muestra la protección del miocardio contra daño isquémico por eritropoyetina luego de oclusión vascular temporal.

Las Figura 17 A, 17B, 17C y 17D muestran los efectos de un tratamiento de eritropoyetina en un modelo de glaucoma en rata.

La Figura 18 muestra el grado de conservación de la función retinal por una eritropoyetina en el modelo de glaucoma en rata.

La Figura 19 muestra la restauración de la función cognitiva luego de trauma cerebral mediante la administración de una eritropoyetina comenzando cinco días después del trauma.

La Figura 20 muestra la restauración de la función cognitiva luego de trauma cerebral mediante la administración de eritropoyetina comenzando 30 días después del trauma.

La Figura 21 muestra la eficacia de asialoeritropoyetina humana en un modelo kainate de toxicidad cerebral.

La Figura 22 muestra la eficacia de citoquinas protectoras de tejido en un modelo de lesión de columna vertebral den rata.

La Figura 23 muestra la eficacia de citoquinas protectoras de tejido dentro de un modelo de lesión de columna vertebral en conejo.

Las Figuras 24A, 24B y 24C muestran una sección coronal de la capa cortical cerebral manchada con hematoxilina y eosina

Las Figuras 25A, 25B y 25C muestran secciones coronales de la corteza frontal adyacente a la región del infarto manchadas con un anticuerpo GFAP.

Las Figuras 26A y 26B muestran secciones coronales de capa cortical cerebral por el anticuerpo OX-42.

Las Figuras 276A y 27B muestran secciones coronales de capa cerebral adyacente a la región de infarto manchada con el anticuerpo OX-42.

La Figura 28 muestra la eficacia de una eritropoyetina contra inflamación en un modelo EAE.

La Figura 29 compara los efectos de dexametasona y una eritropoyetina en la inflamación del modelo EAE.

Las Figuras 30A y 30B muestran que la eritropoyetina elimina la inflamación asociada con muerte neuronal.

La Figura 31 muestra que la eritropoyetina humana y las citoquinas recombinantes protectoras de tejido R130E y R150E reducen efectivamente la muerte celular inducida por NMDA cuando se agregan a los cultivos de células neuronales primarias del hipocampo antes de tratamiento con NMDA. Las células tratadas con R103E (5 nM) exhibieron muerte celular considerablemente más baja en comparación con células de control de vehículo ($p=0,01$). Las células tratadas con R103E (5 nM) exhibieron muerte celular considerablemente más baja en comparación con las células de control de vehículo ($p=0,01$). Las células tratadas con R150E (5 nM) exhibieron aproximadamente una reducción de 20% en muerte celular en comparación con células de control de solvente ($p=0,001$). Estadística: ANOVA más prueba post-hoc de Tukey.

La Figura 32 muestra protección neuronal de retiro de suero en células P19. El porcentaje de células apoptóticas disminuyó para células pretratadas con Epo, Epo WT, y la citoquina recombinante protectora de tejido S100E. Células tratadas con Epo exhibieron aproximadamente una reducción de 20% en muerte de células apoptóticas en comparación con células de control no tratadas. Células tratadas con EpoWT y S100E exhibieron ambas una disminución de 10% en muerte de células apoptóticas en comparación con células de control no tratadas.

Las Figuras 33A y 33B muestran el efecto de pre-incubación con S100E en células PC12 sometidas a retiro de NGF en dos experimentos independientes. Las células PC12 diferenciadas fueron pretratadas con S100E a las concentraciones indicadas durante 24 horas, Figura 33 A (3 pM), Figura 33B (0,00003 pM-3pM). La viabilidad se midió en el estudio MTT. NGF (100 ng/ml) se utilizó como control positivo y el medio libre de NGF (-NGF) como control negativo. Los datos presentados en la Figura 33 se presentan como % de viabilidad del control positivo (+NGF) ($n=8$ en ambos experimentos). Hay un aumento estadísticamente importante en la viabilidad de células tratadas con S100E en comparación con las células de control negativo (-NGF) mediante el uso de ANOVA de una vía y prueba Bonferroni post-hoc. *** $p<0,001$, * $p<0,05$. Los efectos observados con

38

S100E fueron similares a los de Epo en este sistema de prueba con respecto a la potencia y eficacia.

Las Figuras 34^a, 34B y 34C muestran el efecto de pre-incubación con Epo en células PC12 diferenciadas sometidas a retiro de NGF. Las células PC12 diferenciadas fueron pre-tratadas con Epo, S100E o Epo carbamylado (30 pM-30 nM) durante 24 horas. La molécula Epo modificada químicamente, AA24496, tiene una actividad 10000 veces más baja que EPO en el estudio de células UT-7. La viabilidad se midió en el estudio MTT. NGF (100 ng/ml) se utilizó como control positivo y el medio libre de NGF (-NGF) como control negativo.

La Figura 35 muestra las curvas de respuesta de concentración de Epo, K45D y S100E en células UT-7. Diferentes concentraciones de Epo, EpoWT, K45D y S100E se agregaron a las células UT-7. La viabilidad se midió 48 horas más tarde en el estudio WST-1. Los datos son promedio $\pm$ SD de tres experimentos diferentes cada uno por duplicado. La curva es un ajuste no lineal de curva de regresión.

La Figura 36 muestra curvas de respuesta de dosis de Epo, R103E y R150E en células UT-7. Diferentes concentraciones de Epo, EpoWT, R103E y R150E fueron agregadas a las células UT-7. La viabilidad se midió 48 horas más tarde en el estudio WST-1. Los datos son promedio $\pm$ SD de tres experimentos diferentes cada uno por duplicado. La curva es un ajuste no lineal de curva de regresión.

La Figura 37 es un gráfico que muestra las clasificaciones locomotoras de las ratas que se recuperan de trauma en la columna vertebral durante un periodo de 42w días. Como puede observarse, a las ratas que se les administró S100E se recuperaron de la lesión más fácilmente y demostraron una mejor recuperación general de la lesión que las ratas de control y las ratas administradas.

La Figura 38 muestra la relación de la latencia del ojo lesionado sobre la latencia del ojo normal para los varios regímenes de tratamiento. La rata tratada con EPO demostró una latencia de 1,2, que es mejor que el de la rata tratada con salina. Cada una de las cuatro citoquinas recombinantes protectoras de tejido resultó en resultados de latencia iguales o mejores que EPO con R103E, R150E y S100E demostrando una mejora estadística sobre EPO.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a citoquinas recombinantes de muteína protectoras de tejido. En particular, la presente invención provee composiciones que comprenden moléculas aisladas de ácido nucleico que codifican muteínas de citoquina recombinante protectora de tejido, así como células aisladas y/o recombinantes y vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico. La invención abarca además polipéptidos aislados de citoquina recombinante de muteína protectora de tejido, a la que la falta al menos una actividad eritropoyética seleccionada del grupo consistente en aumento de hematocrito, acción vasoactiva (vasoconstricción/vasodilatación), hiperactivación de plaquetas, actividades pro-coagulantes y aumento en la producción de trombocitos; la citoquina tiene al menos una actividad protectora celular de respuesta seleccionada del grupo consistente en proteger, mantener, mejorar o restaurar la función o viabilidad de una célula, tejido u órgano mamífero de respuesta. La invención también abarca métodos para proteger, mantener o mejorar la viabilidad de una célula, tejido u órgano aislado de un cuerpo mamífero mediante el uso de las muteínas de citoquina recombinante protectora de tejido de la invención y el uso de dichas muteínas en el tratamiento y prevención de enfermedades y condiciones.

"Célula de respuesta" se refiere a una célula mamífera cuya función o viabilidad puede ser mantenida, estimulada, mejorada, regenerada o beneficiada de cualquier otra forma, mediante exposición a una eritropoyetina. Ejemplos no limitantes de dichas células incluyen células neuronales retinales, musculares, del corazón, pulmón, riñón, hígado, intestino delgado, corteza adrenal, médula adrenal, endotelial capilar, testículos, ovario, páncreas, óseas, cutáneas y endometriales. En particular, las células de respuesta incluirían, sin limitación, células neuronales; células Purkinje; células retinales: fotorreceptoras (varas y conos), ganglio, pipolares, horizontales, amacrinas y células Müller; células musculares; células cardíacas: miocardio, marcapasos, nodo sinoatrial, nodo del seno y células de tejidos de unión (nodo atrioventricular y haz de his); células pulmonares; células del hígado: hepatocitos, esteladas y células Kupffer; células renales: mesangiales, renales, epiteliales y tubular intestinales; células del intestino delgado: células de copa, glándula intestinal (criptas) y células enterales endocrinas; células de la corteza adrenal: glomerulosa, fasciculadas y reticulares; células de la médula adrenal: células cromafinas, células capilares: células pericitas; células testiculares: Leydig, Sertoli y glándulas de esperma y sus precursoras; células ováricas: folículo Graffiano y células de folículo primordial; células del páncreas: islotes de Langerhans, células- α , células- β , células- γ y células-F; células óseas_ osteocoprogenitoras, osteoclastos y osteoblastos; células de la piel; células endometriales: estroma endometrial y endometrio; así como las células tallo y endoteliales presentes en los órganos mencionados. Además,

40

dichas células de respuesta y los beneficios que se proveen a ellas por una citoquina recombinante protectora de tejido pueden ampliarse para proveer protección o mejorar indirectamente otras células que no sean directamente de respuesta, o de tejidos u órganos que contengan dichas células que no sean de respuesta. Estas otras células, tejidos u órganos que se benefician indirectamente del mejoramiento de células de respuesta se presentan como parte de las células, tejido u órgano como células, tejidos y órganos "asociados". Por ello, los beneficios de una citoquina recombinante protectora de tejido como la que se describe aquí pueden proveerse como resultado de la presencia de un pequeño número o proporción de células de respuesta en un tejido u órgano, por ejemplo, un tejido excitable o neuronal presente en dicho tejido, o las células Leydig de los testículos, que hacen la testosterona. En un aspecto, la célula de respuesta o sus células, tejidos u órganos asociados no son células, tejidos u órganos excitables ni comprenden predominantemente células o tejidos excitables.

Los métodos de la invención contemplan la protección o mejoramiento local o sistémico de células, tejidos u órganos dentro de un cuerpo mamífero, bajo una amplia variedad de condiciones normales y adversas, o protección de las que están destinadas para la reubicación a otro cuerpo mamífero. Se contempla además la restauración o regeneración de una disfunción. Tal como se menciona arriba, la capacidad de una mutelna de eritropoyetina o de una citoquina recombinante protectora de tejido de cruzar una barrera apretada de células endoteliales y ejercer sus efectos positivos en células de respuesta (así como en otros tipos de células) distales a la vasculatura, ofrece el potencial de prevenir al igual que tratar una amplia variedad de condiciones y enfermedades que de otra forma causarían daño considerable en la célula y tejido en un animal, incluidos seres humanos, y además, permitirían el éxito de procedimientos quirúrgicos hasta ahora no obtenidos para los cuales tradicionalmente el riesgo pesaba más que los beneficios. La duración y grado de condiciones adversas inducidas para beneficio final, tales como quimioterapia en altas dosis, terapia de irradiación, supervivencia prolongada de trasplante *ex vivo* y periodos prolongados de isquemia inducida quirúrgicamente, pueden lograrse sacando provecho de la presente invención. Sin embargo, la invención no es tan limitada, sino que incluye como un aspecto, métodos y composiciones por medio de los cuales las células objetivo de respuesta son distales a la vasculatura en virtud de una barrera de células endoteliales o de apretadas uniones endoteliales. En general, la invención está dirigida a cualquier célula de respuesta y células, tejidos y órganos asociados que se puedan beneficiar de la exposición a una citoquina recombinante protectora de tejido. Además, la disfunción de la célula, tejido u órgano puede restaurarse o regenerarse luego de un evento adverso agudo (como trauma) mediante exposición a una citoquina recombinante protectora de tejido.

41

Por lo tanto, la invención está dirigida generalmente al uso de citoquinas recombinantes protectoras de tejido para la preparación de composiciones farmacéuticas para los fines antes mencionados en los que se mantenga, estimule, mejore regenere o de otra forma se beneficie la función celular. La invención también se dirige a métodos para mantener, mejorar, estimular o regenerar la función celular mediante la administración a un mamífero, de una cantidad efectiva de una citoquina recombinante protectora de tejido tal como se describe en este contexto. La invención se dirige también a métodos para mantener, estimular, mejorar o regenerar la función celular *ex vivo* mediante exposición de una célula, tejido u órgano a una citoquina recombinante protectora de tejido. La invención también se dirige a una composición perfusada que comprende una citoquina recombinante protectora de tejido para uso en la preservación de órganos o tejidos.

Los varios métodos de la invención utilizan una composición farmacéutica que incluye al menos una citoquina recombinante a una cantidad efectiva para la ruta de administración en particular y duración de la exposición para ejercer efectos positivos o beneficios en células de respuesta dentro o retiradas de un cuerpo mamífero. Cuando la célula, tejido u órgano objetivo de la terapia requiera que la citoquina recombinante protectora de tejido cruce una barrera de células endoteliales, la composición farmacéutica incluye la citoquina recombinante protectora de tejido a una concentración que pueda, luego de cruzar la barrera de células endoteliales, ejercer sus efectos deseados en las células de respuesta. Las moléculas que pueden interactuar con un receptor de eritropoyetina y modular la actividad protectora celular dentro de la célula son útiles en el contexto de la presente invención.

5.1 ÁCIDOS NUCLEÍCOS DE LA INVENCION

Una citoquina recombinante protectora de tejido que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención incluye ácidos nucleicos que codifican citoquinas protectoras de tejido que comprenden una muteína de eritropoyetina a la que le falta o que exhibe una reducción en al menos una actividad eritropoyética seleccionada del grupo consistente en aumento de hematocrito, acción vasoactiva (vasoconstricción/vasodilatación), hiperactivación de plaquetas, actividades pro-coagulantes y aumento en la producción de hematocrito; la citoquina tiene al menos una actividad protectora celular seleccionada del grupo consistente en proteger, mantener, mejorar o restaurar la función o viabilidad de una célula, tejido u órgano mamífero de respuesta. Una citoquina recombinante protectora de tejido que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención incluye ácidos nucleicos que codifican la muteína de eritropoyetina, con la actividad descrita arriba, que comprende uno o más residuos de amino ácidos alterados entre la posición 11-15 de la SEQ ID NO:10 [SEQ ID NO:1]; la posición 44-51 de la SEQ ID NO:10 [SEQ ID NO:2]; la posición 100-108 de la SEQ ID

42 ✓

NO:10 [SEQ ID NO:3], o la posición 146-151 de la SEQ ID NO:10 [SEQ ID NO:4]. Una citoquina recombinante protectora de tejido que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención incluye ácidos nucleicos que codifican la muteína de eritropoyetina, con la actividad arriba descrita, que comprenden un residuo de ácido nucleico alterado en una o más de las siguientes posiciones de SEQ NO: 10: 7, 20, 21, 29, 33, 38, 42, 59, 63, 67, 70, 83, 96, 126, 142, 143, 152, 153, 155, 156 ó 161. Una citoquina recombinante protectora de tejido que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención incluye ácidos nucleicos que codifican la muteína de eritropoyetina, con la actividad arriba descrita, que comprenden la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO:10 con uno o más de los siguientes cambios: una alanina en el residuo 6 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 7 de la SEQ ID NO:10; una isoleucina en el residuo 10 de la SEQ ID NO:10, una serina en el residuo 11 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 14 de la SEQ ID NO:10, un ácido glutámico en el residuo 14 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 15 de la SEQ ID NO:10, una fenilalanina en el residuo 15 de la SEQ ID NO:10, una isoleucina en el residuo 15 de la SEQ ID NO:10, un ácido glutámico en el residuo 20 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 20 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 21 de la SEQ ID NO:10, una lisina en el residuo 24 de la SEQ ID NO:10, una serina en el residuo 29 de la SEQ ID NO:10, una tirosina en el residuo 29 de la SEQ ID NO:10, una asparagina en el residuo 30 de la SEQ ID NO:10, una treonina en el residuo 32 de la SEQ ID NO:10, una serina en el residuo 33 de la SEQ ID NO:10, una tirosina en el residuo 33 de la SEQ ID NO:10, una lisina en el residuo 38 de la SEQ ID NO:10, una lisina en el residuo 83 de la SEQ ID NO:10, una asparagina en el residuo 42 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 42 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 43 de la SEQ ID NO:10, una isoleucina en el residuo 44 de la SEQ ID NO:10, un ácido aspártico en el residuo 45 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 45 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 46 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 47 de la SEQ ID NO:10, una isoleucina en el residuo 48 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 48 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 49 de la SEQ ID NO:10, una serina en el residuo 49 de la SEQ ID NO:10, una fenilalanina en el residuo 51 de la SEQ ID NO:10, una asparagina en el residuo 51 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 52 de la SEQ ID NO:10, una asparagina en el residuo 59 de la SEQ ID NO:10, una treonina en el residuo 62 de la SEQ ID NO:10, una serina en el residuo 67 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 70 de la SEQ ID NO:10, una arginina en el residuo 96 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 97 de la SEQ ID NO:10, una arginina en el residuo 100 de la SEQ ID NO:10, un ácido glutámico en el residuo 100 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 100, una treonina en el residuo 100 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 101 de la SEQ ID NO:10, una isoleucina en el residuo 101 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 102 de la

SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 103 de la SEQ ID NO:10, un ácido glutámico en el residuo 103 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 104 de la SEQ ID NO:10, una isoleucina en el residuo 104 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 105 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 106 de la SEQ ID NO:10, una isoleucina en el residuo 106 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 107 de la SEQ ID NO:10, una leucina en el residuo 107 de la SEQ ID NO:10, una lisina en el residuo 108 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 108 de la SEQ ID NO:10, una serina en el residuo 108 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 116 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 126 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 132 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 133 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 134 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 140 de la SEQ ID NO:10, una isoleucina en el residuo 142 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 143 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 146 de la SEQ ID NO:10, una lisina en el residuo 147 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 147 de la SEQ ID NO:10, una tirosina en el residuo 148 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 148 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 149 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 150 de la SEQ ID NO:10, un ácido glutámico en el residuo 150 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 151 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 152 de la SEQ ID NO:10, un triptofan en el residuo 152 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 153 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 154 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 155 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 158 de la SEQ ID NO:10, una serina en el residuo 160 de la SEQ ID NO:10, una alanina en el residuo 161 de la SEQ ID NO:10, o una alanina en el residuo 162 de la SEQ ID NO:10.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen además secuencias nucleótidas que codifican muteínas de eritropoyetina recombinante que tienen al menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 85%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o una identidad de secuencia de amino ácida más alta a una de las muteínas de eritropoyetina arriba descritas. Para determinar la identidad de porcentaje de dos secuencias de amino ácidos o de dos ácidos nucleicos que codifican muteínas de eritropoyetina, las secuencias son alineadas para propósitos de comparación óptima (por ej: se pueden introducir espacios en la secuencia de una primera secuencia de amino ácido o de ácido nucleico para alineación óptima con una secuencia amino ácida o de ácido nucleico). En seguida se comparan los residuos de amino ácido o nucleótidos en posiciones amino ácidas nucleótidas correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia es ocupada por el mismo residuo amino ácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. La identidad de porcentaje entre las dos secuencias es una función del

44

número de las posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, identidad % = # de posiciones idénticas que traslapan/# total de posiciones que traslapan x 100%). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud.

Las moléculas de amino ácido de la invención incluyen además secuencias nucleótidas que codifican muteínas de eritropoyetina recombinante, en donde la secuencia de amino ácido que codifica eritropoyetina que es alterada por una o más de las sustituciones, supresiones o modificaciones arriba descritas, comprende al menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% de la identidad de secuencia a la SEQ ID NO:7. Las moléculas de ácido nucleico de la invención también incluyen secuencias nucleótidas que codifican muteínas de eritropoyetina recombinante, en donde la eritropoyetina que codifica la secuencia de ácido nucleico que es alterada por una o más de las sustituciones, supresiones o modificaciones arriba descritas, es una eritropoyetina no humana que codifica ácido nucleico.

La determinación de identidad de porcentaje entre dos secuencias también puede hacerse utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido, no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* 87:2264-2268, modificada como en Karlin y Altschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Dicho algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410. Las búsquedas del nucleótido BLAST pueden hacerse con el programa NBLAST, puntaje = 100, longitud de palabras = 12, para obtener secuencias nucleótidas homólogas a una molécula de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de la proteína BLAST pueden hacerse con el programa XBLAST, puntaje = 50, longitud de palabra = 3, para obtener las secuencias de amino ácido homólogas a una molécula de proteína de la invención. Para obtener alineaciones espaciadas para fines de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST tal como se describe en Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. Alternativamente, PSI-Blast puede utilizarse para hacer una búsqueda iterada que detecte relaciones distantes entre moléculas (Altschul et al., 1997, *supra*). Cuando se utilicen programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, pueden utilizarse los parámetros predeterminados de los respectivos programas (por ej: XBLAST y NBLAST) (ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Otro ejemplo preferido, no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, 1998, *CABIOS* 4:11-17. Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) el cual forma parte del paquete de software de alineación de la secuencia GCG. Cuando se utilice el programa ALIGN para

45

comparar secuencias de amino ácidos, se puede utilizar una tabla de residuos de peso PAM120, una pena de longitud de espacio de 12, y una pena de espacio de 4.

La identidad de porcentaje entre dos secuencias puede determinarse utilizando técnicas similares a las arriba descritas, con o sin dejar espacios. Para calcular la identidad de porcentaje, típicamente solo se cuentan las correspondencias exactas.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen además: (a) cualquier secuencia nucleótida que hibridice a una muteína de eritropoyetina o a una citoquina recombinante protectora de tejido que codifique la molécula de ácido nucleico de la invención arriba descrita, bajo condiciones estrictas, por ej: hibridación para filtrar ADN en 6x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C seguida por una o más lavadas en 0,2xSSC/0,1 SDS a aproximadamente 50-65°C , o (b) bajo condiciones altamente estrictas, por ej: hibridación para filtrar ácido nucleico en 6xSSC a aproximadamente 45°C seguida por una o más lavadas en 0,1x SSC/0,2 SDS a aproximadamente 68°C , o bajo otras condiciones de hibridación las cuales serán aparentes para las personas versadas en la técnica (ver por ejemplo, Ausubel F.M. et al., eds. 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. Y John Wiley & Sons, Inc. New York, págs 6.3.1-6.3.6 y 2.10.3). Preferiblemente, muteína de eritropoyetina que codifica la molécula de ácido nucleico que se hibridiza bajo las condiciones descritas en (a) y (b) anteriores, es una que comprende el complemento de una molécula de ácido nucleico que codifica una muteína de eritropoyetina. En una realización preferida, las moléculas de ácido nucleico que se hibridizan bajo las condiciones (a) y (b) anteriores, codifican productos de proteína, por ej: productos de proteína funcionalmente equivalentes, es decir, que tengan una o más de las actividades de eritropoyetina arriba descritas, a una muteína de eritropoyetina. Preferiblemente, los ácidos nucleicos de la invención son humanos.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen además las anteriores secuencias nucleótidas que se hibridizan a una muteína de eritropoyetina o a una citoquina recombinante protectora de tejido tal como se describe arriba y que además les falta o exhiben una reducción en al menos una actividad eritropoyética seleccionada del grupo consistente de aumento de hematocrito, acción vasoactiva (vasoconstricción/vasodilatación), hiperactivación de plaquetas, actividades pro-coagulantes y aumento en la producción de trombocitos; la citoquina o muteína comprende al menos una actividades protectora celular de respuesta seleccionada del grupo consistente en proteger, mantener, mejorar o restaurar la función o viabilidad de una célula, tejido u órgano mamífero de respuesta. La reducción puede ser una leve disminución o casi falta de una de las actividades eritropoyéticas. Dichas reducciones pueden medirse por técnicas estándar conocidas en la técnica (Gruber et al., 2001, J.

46

Biol. Chem. 277(81): 27581-27584; Page et al., 1996, *Cytokine* 8(1):66-69; Park et al., 1997, *Mol. Cells* 7(6):699-704; Wolf et al., 1997, *Thromb Haemost* 78:1505-1509; y Dale et al., 2002, *Nature* 415:175-179. Los estudios de célula UT-7 descritos en la Sección 6.17 son un ejemplo no limitante de una técnica para medir actividad eritropoyética reducida o disminuida.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención comprenden además los complementos de los ácidos nucleicos arriba descritos.

Fragmentos de las moléculas de ácido nucleico de muteína de eritropoyetina se refieren a secuencias de ácido nucleico de muteína de eritropoyetina arriba descritas que pueden ser al menos 10, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1050 o nucleótidos más contiguos en longitud. Alternativamente, los fragmentos pueden comprender secuencias que codifican al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o más residuos de amino ácidos contiguos de la muteína de eritropoyetina. En una realización, la molécula de ácido nucleico de la muteína de eritropoyetina codifica un producto de gen que exhibe al menos una actividad biológica de una muteína de eritropoyetina correspondiente. Fragmentos de moléculas de ácido nucleico de la muteína de eritropoyetina también se refieren a porciones de muteína de eritropoyetina que codifican regiones que codifican dominios de, o muteína de eritropoyetina madura.

La eritropoyetina derivada de otros organismos puede utilizarse para crear las muteínas de eritropoyetina de la invención. Con respecto a la clonación de variantes de la muteína de eritropoyetina o de ácidos nucleicos de citoquina recombinante protectora de tejido homólogos y ortólogos de otras especies, las secuencias de ácido nucleico de eritropoyetina aislada que se describen aquí pueden rotularse para filtrar una librería cADN construida de mRNA obtenida de células o tejidos apropiados derivados del organismo en cuestión. Las condiciones de hibridación utilizadas, deben ser generalmente menos severas cuando la librería cADN es derivada de un organismo diferente del tipo de organismo del cual se derivó la secuencia rotulada, y rutinariamente, puede determinarse con base en por ej: relativa relación de los organismos objetivos y de referencia.

Alternativamente, el fragmento rotulado puede utilizarse para filtrar una librería genómica derivada del organismo de interés nuevamente, utilizando condiciones de severidad adecuadas. La persona versada en la técnica conocerá las condiciones de severidad adecuadas y variará, dependiendo de los organismos específicos de los cuales se derivan la librería y las secuencias rotuladas. Para guía con respecto a dichas condiciones, ver por ejemplo, Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold. Spring Harbor Press, N.Y.; y Ausubel et al., 1988-1989, *Current*

Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience N.Y., ambas publicaciones se incorporan por referencia en este contexto.

En una realización preferida, para hacer una citoquina recombinante protectora de tejido el ADN se puede amplificar de cADN genómico o cADN (es decir la SEQ ID NO:7) mediante amplificación de la reacción de la cadena de polimerasa (PCR) utilizando primeros diseñados de la secuencia conocida de una citoquina recombinante protectora de tejido asociada u homóloga. PCR se utiliza para amplificar la secuencia ADN deseada en ADN clon o una librería cADN genómica, antes de la selección. PCR puede hacerse por ejemplo, mediante el uso de un ciclador térmico y polimerasa Taq (Gene Amp®). La reacción de cadena de polimerasa (PCR) se utiliza comúnmente para obtener genes o fragmentos de genes de interés. Por ejemplo, una secuencia nucleótida que codifique una citoquina recombinante protectora de tejido de cualquier longitud deseada puede generarse utilizando primeros PCR que colinden con la secuencia nucleótida que codifica el marco de lectura abierto. Alternativamente, una citoquina recombinante protectora de tejido puede separarse en sitios apropiados con endonucleasa(s) de restricción si dichos sitios están disponibles, liberando un fragmento de ADN que codifica el gen de la citoquina recombinante protectora de tejido. Si no hay sitios de restricción convenientes disponibles, se pueden crear en las posiciones apropiadas mediante mutagénesis dirigida en sitio y/o métodos de amplificación de ADN conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Shankarappa et al., 1992, *PCR, Method Appl.* 1: 277-278). El fragmento de ADN que codifica la citoquina recombinante es luego aislado y ligado en el vector de expresión apropiado, teniendo cuidado de asegurarse que se mantenga el marco de lectura de traslación correcto.

Cualquier técnica de mutagénesis conocida en la técnica puede utilizarse para modificar nucleótidos individuales en una secuencia ADN, con el fin de hacer sustituciones de amino ácidos en la secuencia péptida expresada, o para crear/eliminar sitios de restricción para facilitar futuras manipulaciones. Dichas técnicas incluyen, más no se limitan a mutagénesis química, mutagénesis dirigida en sitio *in vitro*, (Hutchinson et al., 1978, *Biol. Chem.* 253: 6551), mutagénesis dirigida por oligonucleótido (Smith, 1985, *Ann. Rev. Genet.* 19:423-463; Hill et al., 1987, *Methods Enzymol.* 155:558-568) y según se describe en la Sección 6.3, extensión de traslapo basada en PCR (Ho et al., 1989, *Gene* 77:51-59), mutagénesis de megaprimer basadas en PCR (Sarkar et al., 1990, *Biotechniques*, 8: 404-407), etc. Se pueden confirmar modificaciones, por ejemplo por secuenciación ADN dideoxinucleótida de doble hebra.

La invención también incluye moléculas de ácido nucleico, preferiblemente moléculas ADN que sean complementos de las secuencias nucleótidas de los anteriores párrafos.

246

En algunas realizaciones las moléculas de ácido nucleico de la invención se presentan como parte de moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de ácido nucleico que contienen o codifican secuencias heterólogas (por ej: vector, vector de expresión o proteína de fusión).

5.2 CITOQUINAS RECOMBINANTES PROTECTORAS DE TEJIDO DE LA INVENCION

Las citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la invención incluyen muteínas de eritropoyetina que mantienen actividad eritropoyética total o parcial. Eritropoyetina es una hormona de glicoproteína que en seres humanos tiene un peso molecular de aproximadamente 34 kDa. La proteína madura comprende 165 amino ácidos y los residuos de glicosil comprende aproximadamente 40% del peso de la molécula. Las formas de citoquina recombinante protectora de tejido útil en la práctica de la presente invención abarcan al menos un cambio de amino ácido en formas sintéticas y recombinantes que ocurren naturalmente, de las siguientes moléculas humanas y otras mamíferas asociadas con eritropoyetina: eritropoyetina, asialoeritropoyetina, eritropoyeina deglicosilada, análogos de eritropoyetina, miméticos de eritropoyetina, fragmentos de eritropoyetina, moléculas de eritropoyetina híbridas, moléculas de enlace receptor de eritropoyetina, agonistas de eritropoyetina, eritropoyetina renal, eritropoyeina cerebral, oligómeros y multímeros de lo mismo, y congéneres de lo mismo. Dichas citoquinas recombinantes protectoras de tejido equivalentes incluyen eritropoyetinas mutantes, las cuales pueden contener sustituciones, supresiones, incluidas supresiones internas, adiciones, incluidas adiciones que produzcan proteínas de fusión o sustituciones conservadoras de residuos de amino ácidos dentro y/o adyacentes a la secuencia de amino ácido, pero que resulten en un cambio "silente", en el sentido de que el cambio produzca una muteína de eritropoyetina o citoquina recombinante funcionalmente equivalente. En una realización preferida, la citoquina recombinante protectora de tejido es no-eritropoyética, es decir, le falta o exhibe una actividad eritropoyética reducida. Las sustituciones conservadoras de amino ácidos pueden hacerse con base de similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilicidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos del caso. Por ejemplo, amino ácidos no polares (hidrofóbicos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofan y metionina; amino ácidos neutrales polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteina, tirosina, asparagina y glutamina; amino ácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; y amino ácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Alternativamente, se pueden utilizar cambios de amino ácido no conservadores e inserciones y supresiones más grandes para crear citoquinas

49

recombinantes protectoras de tejido alteradas funcionalmente. Dichos mutantes también pueden utilizarse para alterar las propiedades de eritropoyetina en las formas que se desee. Por ejemplo, en una realización, una eritropoyetina útil para la práctica de la invención puede ser una citoquina recombinante protectora de tejido alterada en uno o más amino ácidos dentro de los cuatro dominios funcionales de eritropoyetina que afectan el enlace receptor: VLQRY (SEQ ID NO:1) y/o TKVNFYAW (SEQ ID NO:2) y/o SGLRSLTTL (SEQ ID NO:3) y/o SNFLRG (SEQ ID NO:4). En otra realización, se pueden utilizar eritropoyetinas que contienen mutaciones en las áreas circundantes de la molécula que afecta la cinética o las propiedades de enlace del receptor de la molécula. La determinación de qué alteraciones o qué posiciones en los dominios afectarán el enlace se puede hacer utilizando métodos estándar. Por ejemplo, los dominios pueden alterarse por mutaciones de alanina en pares (mutagénesis de scan-ala) seguidas por medición de cinética de enlace de mutantes para examinar el efecto en enlace a un receptor (Bernat et al., 2003, PNAS 100:952-957; Wells et al., 1989, *Science* 244:1081-1085).

El término "citoquina recombinante protectora de tejido" así como "una citoquina recombinante protectora de tejido" puede utilizarse en forma intercambiable o conjunta, para abarcar las citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la invención y otras modificaciones de las mismas, tales como formas deglicosiladas, asialiladas y otras formas parcialmente glicosiladas de la citoquina recombinante protectora de tejido, o modificaciones químicas de los amino ácidos. Ejemplos no limitantes de dichas variaciones se describen en Tsuda et al., 1990 *Eur J.Biochem.* 188:405-411, la cual se incorpora en este contexto por referencia. Las citoquinas son altamente flexibles, y en el caso de la hormona de crecimiento humana se sabe que se requiere tal flexibilidad para la activación funcionalidad equivalente (Wells et al., 1989, *Science* 244:1081-1085). Por ello, las mutaciones que estabilizan la estructura tri-dimensional de una citoquina, evitando la activación normal del receptor de eritropoyetina se incluyen en la presente invención. Además, se puede utilizar una variedad de sistemas anfitriones para la expresión y producción de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido, incluidos, más no limitados a sistemas celulares de bacterias, levadura, insectos, plantas y mamíferos, incluidos los sistemas mamíferos humanos. Por ejemplo, la eritropoyetina recombinante producida en bacterias, que no glicosidan, asialilan o glicosilan parcialmente el producto podrían utilizarse para producir formas no glicosiladas de la citoquina recombinante protectora de tejido o se pueden glicosilar posteriormente utilizando métodos conocidos en la técnica, tales como, más no limitando a las técnicas que se divulgan en las solicitudes de Patente Nos. US 2003/0040037 A1 y US 2003/0003529 para el uso de fucosilación con el fin de ajustar la glicosilación de las proteínas. Alternativamente, la citoquina recombinante protectora de tejido puede ser

55

producida en otros sistemas capaces de glicosilar las proteínas expresadas, por ej: células de plantas, incluidas células humanas.

Tal como se dice arriba, la invención abarca cualquier molécula moduladora de actividad del receptor de eritropoyetina capaz de ejercer actividad positiva en células de respuesta, independientemente de la relación estructural de la molécula con la eritropoyetina.

Además, la citoquina recombinante protectora de tejido puede modificarse de acuerdo con sus actividades para un tejido o tejidos en particular. Varias estrategias no limitantes que pueden hacerse para lograr esta especificidad de tejido deseada incluyen modificaciones que acortan la vida promedio de circulación y por ello, reducen el tiempo en que la citoquina recombinante protectora de tejido puede interactuar con precursores eritroides, o modificación de la estructura primaria de la molécula de proteína de eritropoyetina o citoquina recombinante protectora de tejido. Un enfoque para reducir la vida media de circulación es remover o modificar los medios de glicosilación, de los cuales eritropoyetina tiene tres enlazados-N y uno enlazado-O. Dichas variantes de una citoquina glicosilada puede producirse de varias formas. Por ejemplo, técnicas para modificar la estructura primaria de eritropoyetina para generar las citoquinas protectoras de tejido de la presente invención son bastantes, e incluyen la sustitución de uno o más amino ácidos específicos, es decir, por mutación de los amino ácidos en los sitios de glicosilación de enlace N o de enlace O y/o modificación química de uno o más amino ácidos, o adición de otras estructuras que interfieren con la interacción de eritropoyetina con cualquiera de sus receptores. El uso de dichas formas de citoquinas recombinantes protectoras de tejido se incluye en su totalidad en esta invención. Los ácidos siálicos que terminan en el extremo de las cadenas de azúcar pueden removerse por sialidasas específicas, dependiendo del enlace químico que conecta el ácido siálico con la cadena de azúcar. Alternativamente, la estructura glicosilada deshacerse de varias formas utilizando otras enzimas que se separen en enlaces específicos. En una realización preferida, la vida promedio de la citoquina recombinante protectora de tejido de la invención se reduce en aproximadamente el 90% en comparación con la de la eritropoyetina nativa.

No obstante, algunas de estas citoquinas recombinantes protectoras de tejido imitarán las acciones de la eritropoyetina en sí en otros tejidos u órganos. Por ejemplo una 17-mer que contenga la secuencia de amino ácidos de 31-47 de eritropoyetina nativa es inactiva para eritropoyesis pero totalmente activa para células neurales *in vitro* (Campana & O'Brien, 1998: *Int. J Mol. Med.* 1:235-41).

Además, las moléculas derivadas de citoquina recombinante protectora de tejido deseables para los usos descritos aquí pueden generarse mediante guanidinación, amidinación, carbamilación (carbamoilación), trinitofenilación, acilación, tal como

acetilación o succinilación, nitración o modificación de residuos de arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, tirosina, triptofan o cisteína o grupos carboxilo, entre otros procedimientos, tales como proteólisis limitada, remoción de grupos amino y/o sustitución mutacional de residuos de arginina, lisina, tirosina, triptofan o cisteína por medio de técnicas biológicas moleculares para producir muteínas de eritropoyetina o citoquinas recombinantes protectoras de tejidos que mantengan un nivel adecuado de actividades para los órganos o tejidos específicos, pero no para otros, tales como eritrocitos (por ej: Satake et al.; 1990, *Biochim. Biophys. Acta* 1038:125-9, la cual se incorpora en este contexto en su totalidad). Un ejemplo no limitante como el que se describe a continuación, es la modificación de residuos de arginina de eritropoyetina mediante reacción con un glioxal tal como fenilglioxal (de acuerdo con el protocolo de Takahashi, 1977, *J. Biochem.* 81:395-402). Como se verá a continuación, dicha molécula de citoquina recombinante protectora de tejido retiene totalmente el efecto neurotrófico de la eritropoyetina. Dichas moléculas de citoquina recombinante protectora de tejido se incluyen totalmente para los varios usos y composiciones que se describen aquí. Además, estas modificaciones químicas pueden utilizarse posteriormente para mejorar los efectos protectores de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido o para neutralizar cambios en la carga de la molécula que resulten de la mutación de amino ácido de la eritropoyetina nativa. Dichas modificaciones se describen en las solicitudes co-pendiente, serie No. PCT/US01/49479, radicada el 28 de diciembre de 2001; serie No. 09/753,132, radicada el 29 de diciembre de 2000 y Expediente *Attorney's Docket*) No.KW00-009C02-US, radicado el 3 de julio de 2002, todo lo cual se incorpora por referencia en este contexto.

Moléculas sintéticas y recombinantes, tales como eritropoyetina cerebral y eritropoyetina renal, formas mamíferas recombinantes de eritropoyetina, así como sus isoformas que ocurran naturalmente, derivadas de tumores y recombinantes, tales como las moléculas expresadas en forma recombinante y las preparadas por recombinación homóloga se proveen en esta invención. Además, la presente invención incluye moléculas incluidos péptidos que enlazan el receptor de eritropoyetina, así como constructores recombinantes u otras moléculas que poseen parte o todas las propiedades estructurales y/o biológicas de eritropoyetina, incluidos fragmentos y multímeros de eritropoyetina o sus fragmentos. Muteínas de eritropoyetina u otras citoquinas recombinantes protectoras de tejido que tengan números adicionales o reducidos de sitios de glicosilación también se incluyen aquí. Tal como se dice arriba, los términos "eritropoyetina" y "miméticos", así como los otros términos se utilizan de manera intercambiable para referirse a las moléculas protectoras y mejoradoras de células de respuesta relacionadas con eritropoyetina, así como a moléculas que pueden atravesar barreras de células endoteliales. Además, las moléculas producidas por animales

52

transgénicos también se incluyen aquí. Debe observarse que las moléculas de eritropoyetina que se incluyen en este contexto no necesariamente se asemejan estructuralmente, ni de otro modo, a eritropoyetina, salvo por la capacidad de interactuar con el receptor de eritropoyetina o modular la actividad del receptor de eritropoyetina o activar cascadas de señales activadas por eritropoyetina, tal como se describe aquí.

A modo de ejemplos no limitantes, formas de citoquinas recombinantes protectoras de tejidos útiles para la práctica de la presente invención incluyen citoquinas recombinantes protectoras de tejidos tales como aquellas con amino ácidos alterados en el terminal carboxi descritas en la Patente U.S. 5,457,089 y en la Patente U.S. 4,835,260; isoformas de asialoeritropoyetina y eritropoyetina en varios números de residuos de ácido siálico por molécula, tales como las que se describen en la Patente U.S. 5,856,298; polipéptidos descritos en la Patente U.S. 4,703,008; agonistas descritos en la Patente U.S. 5,767,078; péptidos que se enlazan al receptor de eritropoyetina según se describe en las Patentes U.S. Nos. 5,773,569 y 5,830,851; miméticos de moléculas pequeñas que activan el receptor de eritropoyetina tal como se describen en la Patente U.S. 5,835,382; y análogos de eritropoyetina descritos en WO 9505465, WO 9718318 y WI 9818296. Todas estas citaciones se incorporan en este contexto en la medida que las mismas se refieran a las varias formas o procesos alternos para preparar dichas formas de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la presente invención.

La eritropoyetina se puede obtener comercialmente, por ejemplo, bajo las marcas de PROCRT, de Ortho Biotech, Inc. Raritanm, NJ y EPOGEN, de Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA.

La actividad (en unidades) de eritropoyetina (EPO) y moléculas parecidas a eritropoyetina se define tradicionalmente con base en su efectividad para estimular la producción de glóbulos rojos en modelos roedores (y tal como se deriva de las normas internacionales de eritropoyetina). Una unidad (U) de eritropoyetina regular (MV entre 30,000 y 34,000) es ~ 8 ng de proteína (1 mg de proteína es aproximadamente 125,000 U). Sin embargo, como el efecto sobre eritropoyesis es incidental a las actividades que se desean en este contexto y pueden ser no necesariamente una propiedad detectable de algunas de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la invención, la definición de actividad basada en eritropoyesis es inadecuada. Por ello, tal como se utiliza aquí, la unidad de actividad de eritropoyetina o de moléculas de eritropoyetina se define como la cantidad de proteína requerida para provocar la misma actividad en sistemas neurales y otros sistemas celulares de respuesta como la que provoca la eritropoyetina internacional estándar de la OMS en el mismo sistema. La persona versada en la técnica determinará fácilmente las unidades de una citoquina recombinante

protectora de tejido no eritropoyética o molécula asociada luego de la guía que se ofrece aquí.

Las muteínas de citoquina recombinante protectora de tejido incluyen, pero no se limitan a aquellas proteínas y polipéptidos codificados por las secuencias de ácido nucleico de eritropoyetina que se describen en la Sección 6.3. La invención abarca muteínas que son funcionalmente equivalentes al producto del gen de eritropoyetina que se describe en la Sección 6.3. Dichos productos del gen de eritropoyetina pueden contener una o más supresiones, adiciones o sustituciones de residuos amino ácidos de eritropoyetina dentro de la secuencia de amino ácido codificada por una secuencia de ácido nucleico de eritropoyetina, pero que resultan en un cambio silente, produciendo de este modo un producto del gen de eritropoyetina funcionalmente equivalente. Las sustituciones de amino ácido pueden hacerse sobre la base de similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliicidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos en cuestión.

Las muteínas de la citoquina recombinante protectora de tejido de la invención pueden generarse por mutagénesis, por ej: por mutación o truncación en un punto separado,. Una muteína de eritropoyetina recombinante de la invención conserva las actividades biológicas protectoras celulares de la forma que ocurre naturalmente, pero le puede faltar una o más actividades eritropoyéticas de la forma de la proteína que ocurre naturalmente. Por ello, los efectos biológicos específicos pueden provocarse mediante la adición de una muteína de función limitada.

La modificación de la estructura de las muteínas de la citoquina recombinante protectora de tejido puede ser con el fin de mejorar la eficacia, estabilidad o modificaciones post-translacionales (por ej: para alterar el patrón de fosforilación de las muteínas). Dichas muteínas de citoquina recombinante protectora de tejido, cuando son diseñadas para retener al menos una actividad protectora celular de la forma de la proteína que ocurre naturalmente, o para producir antagonistas específicos de la misma, son consideradas equivalentes funcionales de las muteínas de la citoquina recombinante protectora de tejido. Dichas muteínas de citoquina recombinante protectora de tejido modificadas pueden producirse, por ejemplo, mediante sustitución, supresión o adición de amino ácidos.

Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina o reemplazo similar de un amino ácido con un amino ácido relacionado estructuralmente (es decir, mutaciones isotéricas y/o isoelectricas) no tendrán un efecto mayor en la actividad biológica de la molécula resultante.

Si un cambio en la secuencia amino ácida de una muteína de citoquina recombinante protectora de tejido resulta en una homóloga funcional o en una homóloga no funcional (es decir, si le faltan una o más de las actividades de la citoquina no mutada), se puede determinar fácilmente evaluando la capacidad de la muteína variante para producir una respuesta en células de una manera parecida a la citoquina silvestre, o para inhibir dicha respuesta. Las muteínas de citoquina recombinante protectoras de tejido en las que se puede hacer más de un reemplazo pueden probarse del mismo modo.

Las muteínas de la invención que exhiben funciones alteradas pueden identificarse escogiendo librerías combinatorias de mutantes, por ej: mutantes de truncación, de la citoquina recombinante protectora de tejido para la actividad deseada o falta de la misma. En una realización, una librería abigarrada de variantes se genera por la mutagénesis combinatoria en el nivel de ácido nucleico y es codificada por una librería de genes abigarrados. Una librería abigarrada de variantes puede producirse por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias amino ácidas de modo que un conjunto degenerado de secuencias potenciales de proteínas sea expresable como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ej: para exhibición de fagos). Existe una variedad de métodos que se pueden utilizar para producir librerías de variantes potenciales de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la invención a partir de una secuencia oligonucleótida degenerada. En la técnica se conocen los métodos para la sintetización de oligonucleótidos degenerados (ver por ej: Narang, 1983 *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al., 1984, *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al., 1984, *Science* 198:1056; Ike et al., 1983, *Nucleic Acid Res.* 11:477).

Además, librerías de fragmentos de la secuencia codificadora de una citoquina recombinante protectora de tejido según la invención puede utilizarse para generar una población abigarrada de citoquinas recombinantes protectoras de tejido para filtrar y seleccionar muteínas. Por ejemplo, una librería de fragmentos de codificación de secuencia puede generarse tratando un fragmento PCR de doble hebra de la secuencia de codificación en cuestión con una nucleasa bajo condiciones en donde el corte ocurra solo una vez por molécula, desnaturalizando el ADN de doble hebra, remadurando el ADN para formar el ADN de doble hebra el cual puede incluir pares sentido/antisentido de diferentes productos cortados, removiendo las porciones de una sola hebra de dúplex reformados mediante tratamiento con nucleasa SI, y ligando la librería de fragmentos resultante en un vector de expresión. Mediante este método se puede derivar una librería de expresión que codifique fragmentos de terminal N e internos de varios tamaños de muteínas de citoquina recombinante protectora de tejido en cuestión.

5

En la técnica se conocen varias técnicas para seleccionar productos de gen de librerías combinatorias hechas por mutaciones o truncaciones de punto, y para seleccionar librerías cADN para productos de gen que tengan una propiedad seleccionada. Las técnicas utilizadas más ampliamente, susceptibles a análisis procesado, para la selección de librerías grandes de genes, incluyen típicamente la clonación de la librería del gen en vectores de expresión replicables, transformando células apropiadas con la librería de vectores resultante, y expresando los genes combinatorios bajo condiciones en las cuales la detección de una actividad deseada facilite el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. La mutagénesis de conjunto recursiva (*recursive ensemble mutagenesis*) (REM), una técnica que mejora la frecuencia de mutantes funcionales en las librerías, puede utilizarse en combinación con los estudios de selección para identificar muteínas de una citoquina recombinante protectora de tejido de la invención (Arkin y Yourvan, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delgrave et al., 1993, *Protein Engineering* 6(3):327-331).

Se puede crear una molécula aislada de ácido nucleico que codifica una muteína introduciendo una o más sustituciones, adiciones o supresiones nucleótidas en la secuencia nucleótida de eritropoyetina, de modo que se pueda introducir una o más sustituciones, adiciones o supresiones de amino ácido en la citoquina recombinante protectora de tejido codificada. Las mutaciones pueden introducirse mediante técnicas estándar, tales como por mutagenesis dirigida en sitio y mutagenesis mediada por PCR. En resumen, se diseñan primeros PCR que eliminen el codon trinucleótido del amino ácido que se vaya a cambiar y reemplazarlo con el codon trinucleótido del amino ácido que se vaya a incluir. Este primero se utiliza en la amplificación PCR de ADN que codifica la citoquina recombinante protectora de tejido de interés. El fragmento es luego aislado e insertado en el cADN de longitud completa que codifica la citoquina protectora de tejido de interés y se expresa de manera recombinante. La citoquina recombinante protectora de tejido resultante incluye ahora el reemplazo de amino ácido.

Se pueden hacer sustituciones de amino ácido conservadoras o no conservadoras en uno o más residuos de amino ácido. Se pueden hacer sustituciones tanto conservadoras como no conservadoras. Reemplazos conservadores son los que tienen lugar dentro de una familia de amino ácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los amino ácidos codificados genéticamente pueden dividirse en cuatro familias: (1) ácidos = aspartato, glutamato; (2) básicos = lisina, arginina, histidina; (3) no polares = alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofan; y (4) polares no cargados = glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. De igual forma, el repertorio de amino ácidos puede agruparse como (1) ácidos = aspartato, glutamato; (2) básicos = lisina, arginina, histidina; (3) alifáticos

56

= glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, agrupando serina y treonina por separado como alifático-hidroxil; (4) aromáticos = fenilalanina, tirosina, triptofan; (5) amidas = asparagina, glutamina; y (6) cisteina que contiene sulfuro y metionina. (Ver por ej: *Biochemistry*, 4 edición, por L. Stryer, WH Freeman y Co, 1995).

Alternativamente, se pueden introducir mutaciones aleatorias a lo largo o parte de la secuencia de codificación de una citoquina recombinante protectora de tejido, tal como por mutagenesis de saturación, y seleccionar los mutantes resultantes para actividad biológica con el fin de identificar mutantes que retengan actividad. Luego de la mutagenesis, la proteína codificada puede expresarse de manera recombinante y se puede determinar la actividad de la citoquina recombinante protectora de tejido.

Además de las modificaciones de eritropoyetina ya mencionadas, la siguiente es una ampliación acerca de las varias citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la invención. Tal como se describe en Elliot et al., Boissel et al. y Wen et al., arriba mencionados, las siguientes muteinas de eritropoyetina son útiles para los fines descritos y pueden proveerse en una composición farmacéutica para los métodos aquí descritos. En la nomenclatura de muteina que se utiliza aquí, el amino ácido cambiado se muestra primero con el código de una letra del amino ácido nativo, seguido por su posición en la molécula de eritropoyetina, seguido por el código de una letra del amino ácido de reemplazo. Por ejemplo, eritropoyetina humana S100E" o citoquina recombinante protectora de tejido S100E" se refiere a una molécula de eritropoyetina en la cual el amino ácido 100, se ha cambiado una serina por ácido glutámico. Dichas muteinas útiles para la práctica de la presente invención incluyen pero no se limitan a eritropoyetina humana con al menos uno de los siguientes cambios de amino ácido:

16A, C7A, C7S,
R101, V11S, L12A, E13A, R14A, R14E, R14Q, Y15A, Y15F, Y15I,
K20E, K20A,
E21A,
N24K, C29S, C29Y, A30N, H32T,
C33S, CEEY, N38K, N83K,
P42N,
P42A, D43A, T44I, K45D, K45A, V46A, N47A, F48I, F48A, Y49A, Y49S, supresión
44-49,
W51F, W51N, K52A,
Q59N,
E62T,
L67S,
L70A,
D96R, K97A,

52

S100R, S100E, S100A, S100T, G101A, G101I, L102A, R103 A, R103E, S104A, S104I,
L105A, T106A, T106I, T107A, T107L, L108K, L108 A, L108S,
K116A,
S126A,
T132A,
I133A, T134A,
K140A,
F142I,
R143A,
S146A, N147K, N147A, F148Y, P148A, L149A, R150A, R150A, R150E, G151A,
K152A, K152W,
L153A,
K154A,
K155A, G158A,
C160S, C161A o R162A.

En realizaciones preferidas, una muteína de eritropoyetina o una citoquina recombinante protectora de tejido de la invención comprende una o más de las sustituciones anteriores. En otras realizaciones, la muteína de eritropoyetina u otra citoquina recombinante protectora de tejido de la invención comprende una de las sustituciones anteriores o una combinación de las mismas.

En otra realización, las citoquinas recombinantes protectoras de tejido, composiciones farmacéuticas, uso y métodos de tratamiento de la invención comprenden una o más de las sustituciones anteriores con la salvedad de que no comprenden una o más de las siguientes sustituciones: I6A, C7A, K20A, P42A, D43A, K45D, K45A, F48A, Y49A, K52A, K49 A, S100E, R103A, K116A, T132A, I133A, K140A, N147K, N147A, R150A, R150E, G151A, K152A, K154A, G158A, C161A ni R162A. En una realización asociada de la invención, las citoquinas recombinantes protectoras de tejido, composiciones farmacéuticas, uso y métodos de tratamiento de la invención comprenden una o más de las sustituciones anteriores, con la salvedad de que no comprenden ninguna de las siguientes combinaciones de sustituciones: N24K/N38K/N83K o A30N /H32T.

En ciertas realizaciones, más de uno de los cambios de amino ácido anteriores pueden combinarse para hacer una muteína. Ejemplos de dichas combinaciones incluyen, más no se limitan a: K45D/S100E, A30N/H32T, K45D/R150E, R103E/L108S, K140A/K52A, K140A/K52A/K45A, K97A/K152A, K97A/K152A/K45A, K97A/K152A/K45A/K52A, K97A/K152A/K45A/K52A/K140A, K97A/K152A/K45A/K52A/K140A/K154A, N24K/N38K/N83K y N24K/Y15A. En ciertas realizaciones, la muteína de la citoquina recombinante protectora de tejido de la invención no comprende una o más de las sustituciones múltiples anteriores. En ciertas

58

realizaciones, la composición farmacéutica de la invención que comprende la citoquina recombinante protectora de tejido de la invención no comprende una o más de las anteriores sustituciones múltiples. En ciertas realizaciones, el uso y métodos de tratamiento de la invención que utilizan la muteína de citoquina recombinante protectora de tejido de la invención no comprenden una o más de las anteriores sustituciones múltiples.

Algunas modificaciones o combinaciones pueden afectar la flexibilidad de una muteína de eritropoyetina de hacer el enlace a un receptor, tal como el receptor de eritropoyetina al cual se enlaza la eritropoyetina o la muteína de eritropoyetina. Ejemplos de dichas modificaciones o combinaciones de lo mismo útiles en las composiciones y métodos de la invención incluyen, más no se limitan a: K152W, R41A/Y15A, I6A, C7A, D43 A, P42 A, F48A, Y49A, T132A, I133A, T134A, N147A, P148A, R150A, G151A, G158A, C161 A y R162A. Se sabe que las mutaciones correspondientes son perjudiciales para la hormona de crecimiento humano (Wells et al.). En ciertas realizaciones, la muteína de citoquina recombinante protectora de tejido de la invención no comprende una o más de las sustituciones anteriores. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención que comprenden la muteína de citoquina recombinante protectora de tejido de la invención, no comprenden una o más de las sustituciones anteriores. En ciertas realizaciones, el uso y métodos de tratamiento de la invención que utiliza la muteína de citoquina recombinante protectora de tejido de la invención no comprenden una o más de las sustituciones anteriores.

Además de una de las anteriores modificaciones de amino ácido, una citoquina recombinante protectora de tejido de la invención también puede tener al menos ningún medio de ácido siálico, referida como muteína de asialoeritropoyetina. Preferiblemente, la muteína de asialoeritropoyetina de la invención es asialoeritropoyetina humana. En otras realizaciones, la citoquina recombinante protectora de tejido de la invención puede tener al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ó 13 residuos de ácido siálico. Se puede preparar mediante desialilación de una citoquina recombinante protectora de tejido utilizando sialidasa, tal como se describe en el empaque del fabricante para Sialydase A de ProZyme Inc., San Leandro, California. Típicamente, PROZYME® GLYCOPRO®, SIALYDASE A™ grado de secuencia (N-acetilneuraminato glicohidrolasa, EC 3.2.18) se utiliza para separar todos los residuos de ácido siálico que no se reduzcan, de carbohidratos complejos y glicoproteínas tal como eritropoyetina. También separan ácidos siálicos ramificados (enlazados a un residuo interno). Sialydase A es aislada de un clon de *Arthrobacter ureafaciens*.

Un ejemplo no limitante de sialilación de un glicopéptido se encuentra en la Solicitud de Patente US No. US 2003/0040037, la cual divulga los métodos de

59

sialilación utilizando sialiltransferasas mamíferas o humanas. Otro ejemplo no limitante de métodos de sialilación y alteración de patrones de sialilación en glicoproteínas se encuentra en la Solicitud de Patente US No. US 2002/0160460 A1 y en la US 6,399,336 B1. Allí, se divulgan métodos *in vitro* para sialilar glicoproteínas recombinantes en donde un medio donante de ácido siálico es combinado con una glicoproteína que tiene un medio de aceptor de galactosa o N-acetilgalactosamina. En dichos métodos, una sialiltransferasa combinada con el aceptor o donante, fijan un ácido siálico a un sacárido.

Una citoquina recombinante protectora de tejido de la invención puede tener al menos un número reducido de carbohidratos enlazados N. Para retirar los carbohidratos con enlace N, una citoquina recombinante protectora de tejido se puede tratar con hidracina, de acuerdo por ejemplo, con los métodos descritos por Hermentin et al., 1996, *Glycobiology* 6(2):217-30. Como ya se dijo antes, eritropoyetina tiene 3 medios de carbohidrato de enlace N; la presente invención abarca esas eritropoyetinas con dos, uno o ningún carbohidrato de enlace N.

Una citoquina recombinante protectora de tejido de la invención puede tener al menos un carbohidrato como resultado de tratamiento de una citoquina recombinante protectora de tejido con al menos una glicosidasa. Por ejemplo, se puede seguir el procedimiento de Chen y Evangelista, 1998, *Electrophoresis*, 19(15):2639-44. Además, la remoción del carbohidrato de enlace O puede hacerse siguiendo los métodos descritos en Hokke et al. *Eur. J. Biochem.*:228(3):981-1008.

La porción de carbohidrato de una molécula de citoquina recombinante protectora de tejido puede tener al menos un patrón de glicosilación no mamífero como resultado de la expresión de una muteína de citoquina recombinante protectora de tejido en células no mamíferas. Preferiblemente, las citoquinas recombinantes de la invención son expresadas en células vegetales o de insectos. A modo de ejemplo no limitante, la expresión de una citoquina recombinante protectora de tejido en células de insectos utilizando un sistema de expresión de baculovirus puede hacerse de acuerdo con Quelle et al., 1989, *Blood* 74(2):652-657. Otro método se describe en la Patente U.S. 5,637,477.

La expresión en un sistema vegetal se puede hacer de acuerdo con el método de Matsumoto et al., 1993, *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(8):1249-1252. Alternativamente, la expresión en bacterias resultará en formas no glicosiladas de una citoquina recombinante protectora de tejido. Estos son meramente métodos de ejemplo útiles para la producción de una citoquina recombinante protectora de tejido de la invención y no son limitantes en modo alguno.

Un ejemplo no limitante de modificación de patrones de glicosilación es utilizar fucosilación, tal como se divulga en la Solicitud de Patente U.S. No. US 2003/0040037 A1 y en la Solicitud de Patente U.S. No. US2003/0003529 A1. Allí se divulgan métodos

para modificar un patrón de glicosilación de un glicopéptido contactando un glicopéptido que tenga un medio aceptor para una fucosiltransferasa, con una mezcla de reacción que tenga un medio donante de fucosa para modificar el patrón de glicosilación del glicopéptido. Se divulgan métodos para modificación de patrones de glicosilación utilizando un glicopéptido recombinante.

Una citoquina recombinante protectora de tejido de la invención puede tener al menos uno o más carbohidratos oxidados que también puedan reducirse químicamente. Por ejemplo, la citoquina recombinante protectora de tejido puede ser una muteína de eritropoyetina oxidada con periodato; la muteína de eritropoyetina oxidada con periodato también puede ser reducida químicamente con una sal de borohidruro, tal como borohidruro sódico o cianoborohidruro sódico. La oxidación de periodato de la muteína de eritropoyetina puede hacerse, por ejemplo, por los métodos descritos por Linsley et al., 1994, *Anal. Biochem.* 219(2):207-17. Se puede hacer reducción química luego de la oxidación con periodato siguiendo los métodos de Tonelli y Meints, 1978, *J. Supramol. Struct.* 8(1):67-78.

Debe observarse que algunas de las modificaciones de amino ácido a una eritropoyetina nativa, antes mencionadas y las que siguen, podrán no ser posibles ya que el amino ácido objetivo en particular para modificación química en la molécula nativa ha sido alterado para formar la citoquina recombinante protectora de tejido de la invención. Naturalmente, el amino ácido alterado puede someterse a modificación química por derecho propio, y la presente invención abarca todas esas moléculas. Una persona versada en la técnica podrá determinar fácilmente los residuos de amino ácido disponibles de una citoquina recombinante protectora de tejido de la invención y las modificaciones que se le puedan hacer.

Una citoquina recombinante protectora de tejido para los usos arriba mencionados tiene al menos uno o más residuos de arginina modificados. Por ejemplo, la citoquina recombinante protectora de tejido puede comprender un medio R-glioxal en uno o más de los residuos de arginina, donde R puede ser un grupo arilo, heteroarilo, alquilo bajo, alcoxi bajo o cicloalquilo, o un grupo alfa-deoxiglicitol. Tal como se utiliza en este contexto, el término "alquilo" bajo significa un grupo hidrocarburo alifático saturado de cadena recta o ramificada que preferiblemente contiene de 1 a 6 átomos de carbono. Representativos de dichos grupos son metilo, etilo, isopropilo, isobutilo, butilo, pentilo, hexilo y similares. El término "alcoxi" significa un grupo alquilo bajo tal como se define arriba, fijado al resto de la molécula por oxígeno. Ejemplos de alcoxi incluyen metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi y similares. El término "cicloalquilo" se refiere a grupos alquilo cíclicos con 3 hasta 8 carbonos, incluidos por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo y similares. El término "arilo" se refiere a grupos fenilo y naftilo. El término

6

“heteroarilo” se refiere a grupos heterocíclicos que contienen de 4 a 10 miembros de anillo y 1-3 heteroátomos seleccionados del grupo compuesto por oxígeno, nitrógeno y sulfuro. Ejemplos incluyen, más no se limitan a isoxazolilo, fenilisoxazolilo, furilo, pirimidinilo, quinolilo, tetrahydroquinolilo, piridilo, imidazolilo, pirrolidonilo, 1,2,4-triazolilo, tiazolilo, tienilo y similares. El grupo R puede sustituirse, como por ejemplo el grupo 2,3,4-trihidroxibutil de 3-deoxiglucosona. Ejemplos típicos de compuestos R-glioxal son glioxal, metilglioxal, 3-deoxiglucosona y fenilglioxal. Compuestos R-glioxal preferidos son metilglioxal o fenilglioxal. Un método de ejemplo de dicha modificación se puede encontrar en Werber et al., 1975, *Isr. J. Med. Sci.* 11(11):1169-70, utilizando fenilglioxal.

En otro ejemplo, al menos un residuo de arginina puede modificarse mediante reacción con una dicetona vecinal tal como 2,3-butanediona o ciclohexanediona, preferiblemente en tamponador de borato ca. 50 milimolar a un pH entre 8 y 9. Un procedimiento para esta última modificación con 2,3-butanediona puede hacerse de acuerdo con Riordan, 1973, *Biochemistry* 12(20):3915-3923; y con ciclohexanona, de acuerdo con Pathy et al., 1975, *J. Biol. Chem* 250(2):565-9.

Una citoquina recombinante protectora de tejido de la invención puede comprender al menos uno o más residuos de lisina modificados o una modificación en el grupo amino de terminal N de la molécula de eritropoyetina; dichas modificaciones son como las que resultan por la reacción del residuo de lisina con un agente modificador del grupo amino. En otra realización, los residuos de lisina pueden modificarse por reacción con derivados de glioxal, tal como reacción con glioxal, metilglioxal y 3-deoxiglucosona para formar derivados de alfa-carboxialquilo. Ejemplos son reacción con glioxal para formar carboximetil lisina como en Glomb y Monnier, 1995, *J. Biol. Chem.* 270(17):10017-26, o con metilglioxal para formar (1-carboxietil)lisina como en Degenhardt et al., 1998, *Cell. Mol. Biol.* (Noisy-le-grand) 44(7):1139-45. El residuo de lisina modificado puede reducirse químicamente además. Por ejemplo, una citoquina recombinante protectora de tejido se puede biotinilar por medio de grupos de lisina, en los cuales, D-biotinoil-e-ácido aminocapróico-N-hidrosuccinimida éster se reacciona con eritropoyetina, seguido por la remoción de biotina sin reaccionar por filtración de gel en una columna Centricon 10, tal como describen Wojchowski y Caslake, 1989, *Blood*, 74(3):952-8. En esta publicación, los autores utilizan tres métodos diferentes para biotinilar eritropoyetina, cualquiera de los cuales se puede utilizar para la preparación de las eritropoyetinas para los usos que se describen aquí. Se puede agregar biotina a (1) los medios de ácido siálico, (2) los grupos carboxilato, o (3) grupos amino.

En otra realización preferida, la lisina se puede reaccionar con un aldehído o azúcar reductora para formar una imina, la cual puede estabilizarse por reducción como

2
6

con cianoborohidruro sódico para formar una lisina N-alquilada, tal como glucitolil lisina, o que en el caso de azúcares reductoras pueda estabilizarse mediante rearreglo Amadori o Heyns para formar un azúcar alfa-deoxi alfa-amino tal como alfa-deoxi-alfa-fructosil lisina. Como ejemplo, la preparación de una proteína modificada con fructosil lisina mediante incubación con 0,5M de glucosa en tamponador de fosfatosódico a un pH de 7,4 durante 60 días, se describe en Makita et al., 1992, *J. Biol. Chem.* 267:5133-5138. En otro ejemplo, el grupo lisina puede ser carbamilado, tal como en virtud de reacción con ión de cianato, o carbamilado con alquilo o arilo o -tiocarbamilado con alquilo- o arilo-isocianato o -isotiocianato, o puede acilarse por medio de un derivado de ácido alquil o arilcarboxílico, tal como por reacción con anhídrido acético o anhídrido succínico o anhídrido ftálico. Un ejemplo es la modificación de grupos lisina con 4-sulfofenilisotiocianato o con anhídrido acético, ambos según se describe en Gao et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91(25):12027-30. Los grupos lisina también pueden ser modificados con trinitrofenil mediante reacción con ácido trinitrobencenosulfónico o preferiblemente, sus sales.

Al menos un residuo de tirosina de una citoquina recombinante protectora de tejido puede modificarse en una posición de anillo aromático por un reactivo electrofílico, tal como por nitración o iodinación. A modo de ejemplo no limitante, la eritropoyetina puede reaccionarse con tetranitrometano (Nestler et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260(12):7316-21; o iodinarse tal como se describen el Ejemplo 4.

Al menos un residuo de ácido aspártico o de ácido glutámico de una citoquina recombinante protectora de tejido puede modificarse, tal como por reacción con una carbodiimida, seguido por reacción con una amina, como pero sin limitar, a una glicinamida.

En otro ejemplo, un residuo de triptofan de una citoquina recombinante protectora de tejido puede modificarse, tal como por reacción con n-bromosuccinimida o n-clorosuccinimida, siguiendo los métodos que se describen en Josse et al., *Chem Biol. Interact* 1999 Mayo 14; 119-120.

Aún en otro ejemplo, una citoquina recombinante protectora de tejido puede prepararse removiendo al menos un grupo amino, esto puede lograrse por reacción con ninhidrin seguido por reducción del grupo carbonil subsiguiente por reacción con borohidruro.

Aún en otro ejemplo, se provee una citoquina recombinante protectora de tejido que tenga al menos una abertura de al menos uno de los enlaces de cisteina en la molécula de eritropoyetina por reacción con un agente reductor tal como ditiotreitól, seguido por reacción de los sulfhidrilos subsiguientes con iodoacetamida, ácido iodoacético u otro electrófilo para prevenir la reformación de los enlaces de disulfuro.

3
6

Como se dijo arriba, alternativamente o en combinación, los enlaces de disulfuro se pueden abolir alterando una molécula de cisteína que participe en el enlace cruzado real o al menos otro residuo de amino ácido que resulte en la incapacidad de la muteína de eritropoyetina de formar al menos uno de los enlaces de disulfuro presentes en la molécula nativa.

Se puede preparar una citoquina recombinante protectora de tejido sometiendo una eritropoyetina a una proteólisis química limitada que se dirija a residuos específicos, por ejemplo, para separar luego residuos de triptofan. Dichos fragmentos de citoquina recombinante protectora de tejido se incluyen en esta invención.

Como ya se dijo, una citoquina recombinante protectora de tejido útil para los propósitos que se indican aquí, puede tener al menos una de las modificaciones ya mencionadas, pero puede tener más de una de dichas modificaciones. A modo de ejemplo de una citoquina recombinante protectora de tejido con una modificación a la porción de carbohidrato de la molécula y una modificación a la porción de amino ácido, la citoquina recombinante protectora de tejido puede ser asialoeritropoyetina y cambiar su residuo de lisina en la posición 45 por ácido aspártico.

Por lo tanto, se incluyen varias moléculas de citoquina recombinante protectora de tejido y composiciones farmacéuticas que las contienen para los usos que se describen aquí. Como ya se dijo, dichas moléculas de eritropoyetina incluyen, más no se limitan a muteínas que son además, asialoeritropoyetina, eritropoyetina N-deglicosilada, eritropoyetina O-deglicosilada, eritropoyetina con contenido reducido de carbohidrato, eritropoyetina con patrones de glicosilación alterados, eritropoyetina con carbohidratos oxidados y luego reducidos, eritropoyetina modificada con arilglioxal, eritropoyetina modificada con alquilglioxal, eritropoyetina modificada con 2,3-butanediona, eritropoyetina modificada con ciclohexanediona, eritropoyetina biotinilada, lisil-eritropoyetina alquilada N, glucitol lisina eritropoyetina, alfa-deoxi-alfa-fructosil lisina-eritropoyetina, eritropoyetina carbamilada, eritropoyetina acetilada, eritropoyetina succinilada, alfa-carboxialquil eritropoyetina, eritropoyetina nitrada, eritropoyetina iodinada, para nombrar algunos ejemplos representativos pero no limitantes basados en las enseñanzas de esta invención. Se prefieren las formas modificadas arriba mencionadas basadas en eritropoyetina humana.

Además, la invención abarca las citoquinas recombinantes protectoras de tejido antes mencionadas y composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos. A modo de ejemplo no limitante, dichas citoquinas recombinantes protectoras de tejido incluyen muteína de eritropoyetina oxidada con periodato, muteína de glucitol lisina eritropoyetina, muteína de fructosil lisina eritropoyetina, muteína de 3-deoxiglucosona eritropoyetina y muteína de asialoeritropoyetina carbamilada.

64

5.3 SISTEMAS DE EXPRESIÓN

Se puede utilizar una variedad de sistemas vectores de expresión de anfitrión para producir las citoquinas recombinantes protectoras de tejido, incluidas las moléculas de muteína de eritropoyetina de la invención. Dichos vehículos representan sistemas de expresión anfitriones mediante los cuales se pueden producir las citoquinas recombinantes protectoras de tejido de interés y purificarse posteriormente, y también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias de codificación de nucleótidos apropiadas, exhibir el producto del gen de eritropoyetina modificado *in situ*. Estos incluyen sistemas anfitriones de bacterias, insectos, plantas, mamíferos, incluidos sistemas anfitriones humanos, tales como, más no limitados a sistemas celulares de insectos infectados con vectores recombinantes de expresión de virus (por ej: baculovirus) que contienen las secuencias codificadoras del producto de citoquina recombinante protectora de tejido; sistemas celulares vegetales infectados con vectores recombinantes de expresión de virus (por ej: virus de mosaico de coliflor, CaMV; virus de mosaico de tabaco, TMV) o transformados con vectores recombinantes de expresión de plásmidos (por ej: plásmido Ti) que contienen secuencias codificadoras de recombinante protectora de tejido o sistemas celulares mamíferos, incluidos sistemas celulares humanos (por ej: HT1080, COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que cosechan constructores de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células mamíferas (por ej: promotor de metalotioneína) o de virus mamíferos (por ej: promotor tardío de adenovirus; el promotor del virus vaccinia 7.5K).

Tal como se utiliza en este contexto, un constructor de expresión se refiere a una secuencia nucleótida que codifica una citoquina recombinante protectora de tejido asociada en forma operable con una o más regiones reguladoras que permiten la expresión de la citoquina recombinante protectora de tejido en una célula anfitriona adecuada. "Asociada en forma operable" se refiere a una asociación en la cual las regiones reguladoras y la secuencia polipeptídica de la citoquina recombinante protectora de tejido que vayan a ser expresadas, son unidas y colocadas de tal modo que permitan la transcripción, y finalmente, la translación de la secuencia de la citoquina recombinante protectora de tejido. Para la expresión de la citoquina recombinante protectora de tejido se puede utilizar una variedad de vectores de expresión, incluidos más no limitados a plásmidos, cósmidos, fagos, fagémidos o virus modificados. Ejemplos incluyen bacteriofagos tales como derivados de lambda, o plásmidos tales como derivados de plásmido pBR322 o pUC o el vector Bluescript (Stratagene). Típicamente, dichos vectores de expresión comprenden un origen funcional de replicación para propagación del vector en una célula anfitriona apropiada, uno o más sitios de restricción de

endonucleasa para insertar la secuencia del gen de la citoquina recombinante protectora de tejido, y uno o más marcadores de selección de expresión.

En realizaciones preferidas, el vector pCI-neo se utiliza para templat oligonucleótidos al clon cADN de EPO humana original para introducir las mutaciones que se describen arriba. El vector pCI-neo contiene el gen de neomicin fosfotransferasa, un marcador seleccionable para células mamíferas. El vector pCI-neo puede utilizarse para expresión transitoria o para expresión estable seleccionando células transfectadas con el antibiótico G-418. (Brondyk, 1995, *New Mammalian Expression Vector with a selectable marker: pCI-neo. Promega Notes* 51, 10-14).

Para la expresión de citoquina recombinante protectora de tejido en células anfitrionas mamíferas se puede utilizar una variedad de regiones reguladoras, por ejemplo, los promotores SV40 tempranos y tardíos, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), y el promotor de repetición de terminal larga del virus Rous sarcoma (RSV-LTR). Promotores inducibles que pueden ser útiles en las células mamíferas incluyen más no se limitan a aquellos asociados con el gen de metalotioneina, repetidores glucocorticoides de respuesta de terminal larga del virus del tumor mamario en ratones (MMTV-LTR), y o el gen α -interferon (Williams et al., 1989, *Cancer Res.* 49:2735-42; Taylor et al., 1990, *Mol. Cell. Biol.* 10: 165-75).

La eficiencia de expresión de la citoquina recombinante protectora de tejido en una célula anfitriona puede mejorarse mediante la inclusión de elementos realzadores apropiados de transcripción en el vector de expresión, tales como los que se encuentran en el virus SV40, virus de Hepatitis B, citomegalovirus, genes de inmunoglobulina, metalotioneina, α -actina (ver Bittner et al, *Methods in Enzymol.* 153:516-544; Gorman, 1990, *Curr. Op. In Biotechnol.* 1:36-47).

El vector de expresión también puede contener secuencias que permitan mantenimiento y replicación del vector en más de un tipo de célula anfitriona, o integración del vector en el cromosoma anfitrión. Dichas secuencias pueden incluir, más no se limitan a orígenes de replicación, secuencias que se replican en forma autónoma (ARS), ADN centromero y ADN telomero. También puede ser útil usar vectores transportadores que puedan replicarse y mantenerse en al menos dos tipos de células anfitrionas.

Además, el vector de expresión puede contener genes marcadores seleccionables para aislar o identificar inicialmente células anfitrionas que contengan ADN que codifique una citoquina recombinante protectora de tejido. Por largo tiempo, la producción de alto rendimiento de citoquinas recombinantes protectoras de tejido, se puede usar la expresión estable en células mamíferas, vegetales, bacteriales o fungales.

Se puede usar un número de sistemas de selección para células mamíferas, incluidos, más no limitados a los genes de quinasa de timidina del virus Herpes simplex (Wigler et al, 1977, *Cell* 11:223), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalski y Szybalski, 1962, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48: 2026) y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al, 1980, *Cell* 22:817) que se pueden emplear en células tk-, hgp^{rt}- o ap^{rt}, respectivamente. También se puede usar resistencia de antimetabolitos como base de selección de dihidrofolata reductasa (dhfr), que confiere resistencia a metotrexato (Wigler et al, 1980, *Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567; Orare et al, 1981, *Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527); Opt. que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072); neomicin fosfotransferasa (neo) que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Colberre-Garapin et al, 1981, *J. Mol. Biol.* 150:1); e higromicin fosfotransferasa (hyg) que confiere resistencia a higromicin (Santerre et al, 1984, *Gene* 30:147). También se pueden usar otros marcadores seleccionables, tales, más no limitados a histidinol y ZeocinTM.

Con el fin de insertar la secuencia que codifica la citoquina recombinante protectora de tejido en el sitio de clonación de un vector, a las secuencias codificadoras se les debe fijar secuencias ADN con funciones reguladoras, tales como promotores. Para hacer esto, se pueden ligar enlazadores o adaptadores que provean los sitios apropiados de restricción compatibles a los extremos de cADN o de ADN sintético que codifiquen una citoquina recombinante protectora de tejido, mediante técnicas conocidas en la técnica (Wu et al, 1987, *Methods Enzymol.* 152: 343-349). La separación con una enzima de restricción puede seguirse por modificación para crear extremos, despuntados, digiriendo o rellenando el terminal ADN de una hebra antes de hacer la ligación. Alternativamente, un sitio de enzima de restricción deseado puede introducirse en un fragmento de ADN mediante amplificación del DN por medio de uso de PCR con cebadores que contengan el sitio de enzima de restricción deseado.

El constructor de expresión que comprende una secuencia de codificación de citoquina recombinante protectora de tejido asociado de manera operable con regiones reguladoras puede introducirse directamente en células anfitrionas adecuadas para expresión y producción de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido sin más clonación (ver por ej: Patente U.S. No. 5,580,859). Las construcciones de expresión también pueden contener secuencias ADN que faciliten la integración de la secuencia de codificación en el genoma de la célula anfitriona, por ej: por recombinación homóloga. En este caso, no se requiere emplear un vector de expresión que comprenda un origen de replicación indicado para las células anfitrionas apropiadas con el fin de propagar y expresar las citoquinas recombinantes protectoras de tejido en las células anfitrionas.

2

Las construcciones de expresión que contengan secuencias de codificación clonadas de citoquinas recombinantes protectoras de tejido pueden introducirse en la célula anfitriona mamífera por una variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluida más no limitada a transfección mediada con fosfato cálcico (Wigler et al, 1977 *Cell* 11:223-232), transfección mediada con liposoma (Schaefer-Ridder et al., 1982, *Science* 215:166-168), electroporación (Wolf et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci* 84:3344), y microinyección (Cappechi, 1980, *Cell* 22: 479-488).

Además, se puede escoger una cepa de célula anfitriona que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto de gen del modo que se desee. Dichas modificaciones (por ej: glicosilación) y procesamiento (por ej: separación) de productos de proteína pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células anfitrionas tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento post-translacional y modificación de proteínas y productos de gen. Se pueden escoger líneas celulares o sistemas anfitriones apropiados para garantizar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña expresada. Para este fin, se pueden usar células anfitrionas eucarióticas que posean la maquinaria celular para el correcto procesamiento de la transcripción, glicosilación y fosforilación primarias del producto del gen. Dichas células anfitrionas mamíferas, incluidas células anfitrionas humanas, incluyen, mas no se limitan a: HT1080, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3 y W138.

Para la producción prolongada y de alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, se pueden diseñar líneas celulares que expresen de manera estable el producto del gen de la molécula relacionada con citoquina recombinante protectora de tejido. En lugar de utilizar vectores de expresión que contengan orígenes virales de replicación, las células anfitrionas pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (por ej: promotores, realzadores, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Luego de la introducción del ADN extraño, se puede dejar que las células diseñadas se cultiven durante 1-2 días en un medio enriquecido, y luego pasarlas a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y deja que las células integren el plásmido en sus cromosomas de una manera estable y crezcan para formar focos que a la vez puedan ser clonados y expandidos en las líneas celulares. Este método puede utilizarse de manera ventajosa para diseñar líneas celulares que expresen el producto del gen de la citoquina recombinante protectora de tejido. Dichas líneas celulares diseñadas pueden ser especialmente útiles en la selección y evaluación de compuestos que afecten

la actividad endógena del producto del gen de la citoquina recombinante protectora de tejido.

Cualquiera de los vectores de clonación y expresión que se describen aquí pueden sintetizarse y ensamblarse a partir de secuencias ADN por medio de técnicas bien conocidas en la técnica. Las regiones reguladoras y elementos realzadores pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. Algunos vectores y células anfitrionas se pueden obtener comercialmente. Ejemplos no limitantes de vectores útiles se describen en el Apéndice 5 de la publicación *Current Protocols in Molecular Biology*, 1988, ed Ausubel et al, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, la cual se incorpora por referencia en este contexto; y los catálogos de proveedores comerciales tales como Clontech Laboratories, Stratagene Inc., e Invitrogen, Inc.

Alternativamente, un número de sistemas de expresión basados en virus con células mamíferas también se puede utilizar con células mamíferas para las citoquinas recombinantes protectoras de tejido. Vectores que utilizan pilares de virus ADN se han derivado del virus de simios 40 (SV40) (Hamer et al, 1979, *Cell* 17:725), adenovirus (Van Doren et al, 1984, *Mol. Cell Biol.* 4: 1653), virus asociado con adeno (McLaughlin et al, 1988, *J. Virol*, 62: 1963), y virus de papilomas bovinos (Zim et al, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:4897). En casos en los que se utiliza adenovirus como vector de expresión, la secuencia ADN donante puede ligarse a una región de control de transcripción/traslación del adenovirus, por ej: la secuencia líder promotora y tripartita. El gen quimérico puede ser luego insertado en el genoma de adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ej: en la región E1 o E3) resultará en un virus recombinante que es viable y capaz de expresar productos heterólogos en células anfitrionas infectadas (ver por ej: Logan y Shenk, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655-3659).

Alternativamente, se puede utilizar el promotor de vacuna 7.5K (ver por ej: Mackett et al, 1982 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:7415-7419; Macket et al, 1984 *J. Virol* 49: 857-864; Panicali et al, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4927-4931). En casos en los que se use una célula anfitriona humana, se pueden utilizar vectores basados en el virus Epstein-Barr (EBV) origen (OriP) y el antígeno nuclear EBV 1 (EBNA1; un factor de replicación trans-acción). Dichos vectores pueden utilizarse con una amplia gama de células anfitrionas mamíferas, por ej: EBO-pCD (Spickofsky et al, 1990, *DNA Prot. Eng. Tech.* 2: 14-18), pDR2 y α DR2 (de Clontech Laboratories).

La expresión de la citoquina recombinante protectora de tejido también puede hacerse por medio de un sistema de expresión basado en retrovirus. Al contrario de transfección, los retrovirus pueden infectar eficientemente y transferir genes a una amplia gama de tipos de células, incluidas por ejemplo, células hematopoyéticas primarias. En

69

retrovirus tal como el virus de leucemia murina Moloney, la mayoría de las secuencias de genes virales pueden removerse y reemplazarse con una secuencia de codificación de citoquina recombinante protectora de tejido, mientras que las funciones virales faltantes se pueden proveer en trans. El rango anfitrión para infección por un vector retroviral también puede manipularse escogiendo la envoltura utilizada para el empaque del vector.

Por ejemplo, un vector retroviral puede comprender una repetición de terminal de 5' de largo (LTR), un LTR de 3', una señal de empaque, un origen bacteriano de replicación, y un marcador seleccionable. El ADN de la citoquina recombinante protectora de tejido se inserta en una posición entre el 5' LTR y el 3' LTR, de modo que la transcripción del promotor 5' LTR transcriba el ADN clonado. El 5' LTR comprende un promotor, incluido más no limitado a un promotor LTR, una región R, una región U5 y un sitio de enlace de primero, en ese orden. Las secuencias nucleótidas de estos elementos LTR se conocen en la técnica. Un promotor heterólogo, así como múltiples marcadores de selección de fármaco también se pueden incluir en el vector de expresión para facilitar la selección de células infectadas (ver McLauchlin et al, 1900, *Prog. Nucleic Acid Res. And Molec. Biol.* 38:91-135; Morgenstern et al., 1990 *Nucleic Acid Res.* 18: 3587-3596; Chouluka et al., 1996, *J. Virol.* 70: 1792-1798; Boesen et al., 1994, *Biotherapy* 6:291-302; Salmons and Gunzberg, 1993, *Human Gene Therapy* 4: 129-141; y Grossman y Wilson, 1993, *Curr. Opin in Genetics and Devel.* 3: 110-114).

En una realización de la invención, una citoquina recombinante protectora de tejido deficiente en residuos siálicos, o que le falten completamente residuos siálicos, puede producirse en células mamíferas, incluidas células humanas. Dichas células pueden diseñarse para que sean deficientes o para que les falte las enzimas que agregan ácidos siálicos, como β -galactosida α 2,3 sialiltransferasa (α 2,3 sialiltransferasa@ y la β -galactosida α 2,6 sialiltransferasa (actividad α 2,6 sialiltransferasa@). En una realización, se utiliza una célula mamífera en la cual se detecte uno o ambos genes de α 2,3 sialiltransferasa y/o α 2,6 sialiltransferasa. Dichas supresiones pueden hacerse utilizando técnicas de eliminación (knock-out) de genes conocidas en la técnica. En otra realización, se utilizan células de ovarios de Hamster chino (CHO) deficientes en dihidrofolato reductasa (DHFR) como la célula anfitriona para la producción de citoquinas recombinantes protectoras de tejidos. Las células CHO no expresan la enzima α 2,6 dialiltransferasa, y por lo tanto, no agregan ácido siálico en el enlace 2,6 a los oligosacáridos enlazados N de glicoproteínas producidas en estas células. Como resultado, las proteínas recombinantes producidas en células CHO les falta ácido siálico en el enlace 2,6 a galactosa (Sadaki et al, (1987; Takeuchi et al. *Supra.*; Mutsaers et al *Eur J. Biochem.* 156, 651 (1986); Takeuchi et al. *J.Chromotgr.* 400, 207 (1987). En una realización, para producir una célula anfitriona para la producción de asialo-

70

eritropoyetina, el gen que codifica α 2,3 sialiltransferasa en las células CHO es eliminado. Dichas células CHO eliminadas por sialiltransferasa les falta completamente la actividad de sialiltransferasa, y como resultado, son útiles para la expresión recombinante y producción de la muteína de asialoeritropoyetina.

En otra realización, las asialo glicoproteínas pueden producirse interfiriendo el transporte de ácido siálico en el aparato Golgi, por ej: Eckardt et al, 1998, *J. Biol. Chem.* 273:20189-95). Utilizando métodos conocidos por las personas versadas en la técnica (por ej: Oelman et al., 2001 *J. Biol. Chem.* 276:26291-300), mutagenesis del transportador de ácido siálico CMP del azúcar nucleótido puede lograrse para producir mutantes de células ováricas de hamster Chino. Estas células no pueden agregar residuos de ácido siálico a glicoproteínas tales como una citoquina recombinante protectora de tejido y producir únicamente muteína de asialoeritropoyetina.

Células mamíferas transfectadas que producen muteína de eritropoyetina también producen sialidasa cistósica que si se escapa en el medio de cultivo degrada la muteína de sialoeritropoyetina con alta eficiencia (por ej: Gramer et al, 1995 *Biotechnology* 13:692-698). Utilizando métodos conocidos para las personas versadas en la técnica) (por ej: de información provista en Ferrari et al, 1994, *Glycobiology* 4:367-373), las líneas celulares pueden ser transfectadas, mutadas o de otra forma hacer que produzcan sialidasa de manera constitutiva. De este modo, la muteína de asialoeritropoyetina puede producirse durante la fabricación de muteína de asialoeritropoyetina

Las células recombinantes pueden cultivarse bajo condiciones estándar de temperatura, tiempo de incubación, densidad óptica y composición del medio. Alternativamente, las condiciones y medios de cultivo modificados se pueden utilizar para mejorar la producción de citoquina recombinante protectora de tejido. Por ejemplo, las células recombinantes pueden cultivarse bajo condiciones que estimulen la expresión inducible de citoquina recombinante protectora de tejido. Se puede aplicar cualquier técnica conocida en la técnica para establecer s condiciones óptimas para producir citoquinas recombinantes protectoras de tejido. Lisatos o extractos celulares que comprendan citoquinas recombinantes protectoras de tejido pueden purificarse además para aislar citoquinas recombinantes protectoras de tejido.

Para facilitar la purificación de citoquinas recombinantes protectoras de tejido, una secuencia de amino ácido marcadores un péptido hexa-histidina, tal como la etiqueta provista en un vector pQE (QIAGEN, Inc. 9529 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales se consiguen en el comercio. Tal como se describe en Gentz et al., 1989, *PNAS* 86:821, por ejemplo, hexa-histidina provee purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas de péptido útiles para purificación incluyen, pero no se limitan a la etiqueta de hemaglutinina "HA", que corresponde a un

71
epítipo derivado de la proteína de hemaglutinina de influenza (Wilson et al., 1984, *Cell*, 37:767) y la etiqueta (flag). Cualquier método de purificación conocido en la técnica puede utilizarse (ver por ej: Publicación de Patente Internacional WO 93/21232; EP 439,095; Namura et al., 1994, *Immunol Lett.* 39:91-99; Patente US 5,474,981; Gillies et al., 1992, *PNAS* 89:14-28-1432; y Fell et al., 1991, *J. Immunol.* 146:2446-2452).

5.4 PRUEBAS DE LAS PROPIEDADES PROTECTORAS DE TEJIDO DE LAS CITOQUINAS RECOMBINANTES PROTECTORAS DE TEJIDO

Luego de producir las citoquinas recombinantes protectoras de tejido y en algunas realizaciones de modificación química de dichas citoquinas protectoras de tejido de la presente invención, una persona versada en la técnica podrá verificar los atributos protectores de tejido de la citoquina y la ausencia de un efecto en la medula ósea por medio de pruebas conocidas.

Por ejemplo, el efecto no eritropoyético de una citoquina recombinante protectora de tejido puede verificarse mediante el uso de una prueba TF-1. En esta prueba, las células TF-1 son cultivadas en un medio RPMI completo suplementado con 5 ng/ml de GM-CSF y 10% de FCS por un día a 37°C en un incubador CO₂. Luego se lavan las células y se suspenden a una densidad de 10⁶ células/ml durante 16 horas en un medio de inanición (5% FCS sin GM-CSF). Se prepara una placa de pozos: (1) agregando 100 µl de agua estéril a los pozos externos para mantener la humedad; (2) agregando medio (10% FCS sin células o GM-CSF) solo a pozos; y (3) sembrando 25,000 células / pozo con medio que contenga 10% FCS y las citoquinas recombinantes protectoras de tejido en las células restantes (se prueban cinco pozos por citoquina). Si las células se proliferan, la citoquina recombinante protectora de tejido puede ser eritropoyética. El efecto *in vivo* del compuesto puede entonces probarse *in vivo* monitoreando el aumento de hematocrito debido a la citoquina recombinante protectora de tejido. Un resultado negativo, es decir, ninguna proliferación de células en la prueba TF-1 en la prueba *in vitro* y/o ningún aumento en hematocrito en la prueba *in vivo*, significa que la citoquina recombinante protectora de tejido es no eritropoyética.

Como una alternativa a la prueba TF-1 arriba descrita, una persona versada en la técnica podrá emplear otras pruebas eritropoyéticas conocidas en el campo, incluidas, más no limitadas a las pruebas de células UT-7, como las que se describen más adelante en las secciones de Ejemplos.

Las propiedades protectoras de tejido de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido pueden verificarse mediante una prueba P-19 *in vitro* o prueba de intoxicación con agua *in vitro* ratones, ambas cuya descripción aparece más adelante. Otras pruebas

72 ✓
incluyen, más no se limitan a las pruebas adicionales que se describen en la sección de Ejemplos, tales como la PC-12 y la de la tajada del hipocampo. Estas pruebas o ensayos se proveen únicamente como ejemplos, y otras pruebas adecuadas para determinar los efectos protectores de tejido y/o los efectos en la medula ósea de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido conocidas en la técnica también se contemplan.

5.5 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS DE LA INVENCION

En la práctica de un aspecto de la invención, se puede administrar a un mamífero una composición farmacéutica como la que se describe arriba, que contenga una citoquina recombinante protectora de tejido por cualquier ruta que provea un nivel suficiente de una citoquina recombinante protectora de tejido en una vasculatura que permita la translocación a través de una barrera de células endoteliales y efectos benéficos en células de respuesta. Cuando se utiliza para perfundir un tejido u órgano, se desean resultados similares. En el caso en que la muteína de eritropoyetina se utilice para perfusión *ex-vivo*, la citoquina recombinante protectora de tejido puede ser cualquier forma de muteína de eritropoyetina, tal como la citoquina recombinante protectora de tejido ya mencionada. En el caso en que las células o tejido no sean vascularizados y/o la administración sea mediante baño de las células o tejido con la composición de la invención, la composición farmacéutica provee una cantidad beneficiosa efectiva de células de respuesta de una citoquina recombinante protectora de tejido. Las barreras de células endoteliales a través de las cuales una citoquina recombinante protectora de tejido puede translocarse incluyen uniones herméticas, uniones perforadas, uniones con ventanas y otros tipos de barreras endoteliales presentes en un mamífero. Una barrera preferida es una unión hermética de células endoteliales, pero la invención no se limita a ello.

Las anteriores citoquinas recombinantes protectoras de tejido son útiles en general para el tratamiento terapéutico o profiláctico de enfermedades humanas del sistema nervioso central o del sistema nervioso periférico que principalmente tengan síntomas neurológicos o psiquiátricos, enfermedades oftálmicas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cardiopulmonares, enfermedades respiratorias, enfermedades renales, urinarias y reproductivas, enfermedades gastrointestinales y anormalidades endocrinas y metabólicas. En particular, dichas condiciones y enfermedades incluyen condiciones hipóxicas, que afectan adversamente tejidos excitables, tales como los tejidos excitables en el tejido del sistema nervioso central, tejido del sistema nervioso periférico, o tejido cardíaco o retinal, tal como por ejemplo, cerebro, corazón o retina/ojo. Por lo tanto, la invención puede utilizarse para tratar o prevenir daño a tejido excitable como resultado de condiciones hipóxicas en una variedad de condiciones y circunstancias. Ejemplos no

29

limitantes de dichas condiciones y circunstancias se proveen en la tabla que aparece más adelante.

En el ejemplo de la protección de las patologías de tejido neuronal tratables de acuerdo con la presente invención, dichas patologías incluyen las que resulten de oxigenación reducida de tejidos neuronales. Cualquier condición que reduzca la disponibilidad de oxígeno a tejido neuronal, que resulte en estrés, daño y finalmente muerte de la célula neural, puede tratarse por los métodos de la presente invención. Generalmente referidas como hipoxia y/o isquemia, estas condiciones surgen de o incluyen, pero no se limitan a ataque, oclusión vascular, privación de prenatal o posnatal de oxígeno, sofocación, choque, ahogamiento, envenenamiento con monóxido de carbono, inhalación de humo, trauma, incluidas cirugía y radioterapia, asfixia, epilepsia, hipoglicemia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfisema, síndrome de dolor respiratorio en adultos, choque hipotensivo, choque séptico, choque anafiláctico, choque por insulina, crisis de las células falciformes, paro cardíaco, disritmia, narcosis de nitrógeno y deficiencias neurológicas causadas por procedimientos de *bypass* corazón-pulmón.

En una realización, por ejemplo, las composiciones de citoquina recombinante protectora de tejido pueden administrarse para evitar lesión o daño en los tejidos como resultado del riesgo de lesión o daño en tejidos durante procedimientos quirúrgicos, tal como por ejemplo, resección tumoral o reparación de aneurisma. Otras patologías. Causadas por o que resulten de hipoglicemia que se pueden tratar por los métodos que se describen aquí incluyen sobredosis de insulina, también referida como hiperinsulinemia iatrogénica, insulinoma, deficiencia de la hormona del crecimiento, hipocortisolismo, sobredosis de fármacos y algunos tumores.

Otras patologías resultantes de daño al tejido neuronal excitable incluyen trastornos de ataques, tales como epilepsia, convulsiones o trastornos de ataques crónicos. Otras condiciones y enfermedades tratables incluyen, más no se limitan a enfermedades tales como ataques, esclerosis múltiple, hipotensión, paro cardíaco, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, parálisis cerebral, trauma cerebral o de la columna vertebral, demencia por SIDA, pérdida de la función cognoscitiva asociada con la edad, pérdida de la memoria, esclerosis lateral amiotrófica, ataques, alcoholismo, isquemia retinal, daño del nervio óptico como resultado de glaucoma y pérdida neuronal.

La composición y métodos específicos de la presente invención pueden utilizarse para tratar inflamación que resulte de estados de enfermedad o varios traumas, tal como inflamación inducida física o químicamente. Dichos traumas incluyen angitis, bronquitis crónica, pancreatitis, osteomielitis, artritis reumatoide, glomerulonefritis, neuritis óptica,

artritis temporal, encefalitis, meningitis, mielitis transversa, dermatomiositis, polimiositis, fasciitis necrotizante, hepatitis y enterocolitis necrotizante.

La evidencia ha demostrado que astrositos activados pueden ejercer una función citotóxica hacia neuronas mediante la producción de neurotoxinas. Óxido nítrico, especies de oxígeno reactivo y citoquinas son liberadas de las células gliales en respuesta a isquemia cerebral (ver Becker, K.J. 2001. Identificación de la respuesta inflamatoria del sistema nervioso central en ataque isquémico. *Curr. Opinion Neurol.* 14:349-353 y Mattson, M.P., Culmsee, C y Yu, Z.F.2000. *Apoptotic and Antiapoptotic mechanisms in stroke. Cell Tissue Res.* 301:173-187). Estudios han demostrado además que en modelos de neurodegeneración, la activación glial y posterior producción de citoquinas inflamatorias dependen en daño neuronal primario (ver Viviani, B., Corsini, E., Galli, C.L., Padovani A., Ciusani, E. Y Marinovich, M.2000. *Células neurales moribundas activan glial mediante la liberación de un producto de Proteasa. Glia.*32:84-90 y Rabuffetti, M., Scioratti, C., Tarozzo, G., Clementi, E., Manfredi, A.A. y Beltramo, M, 2000. Inhibición de actividad parecida a caspasa-1 por Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-clorometil cetona incluye neuroprotección prolongada en isquemia cerebral mediante reducción de apoptosis y disminución de citoquinas proinflamatorias. *J. Neurosci* 20:4398-4404). Inflamación y activación glial es común a diferentes formas de trastornos neuro degenerativos, incluida isquemia cerebral, trauma cerebral y encefalomielitis alérgica experimental, trastornos en los que eritropoyetina ejerce un efecto protector celular. La inhibición de producción de citoquina por eritropoyetina, puede, al menos en parte, mediar su efecto protector. Sin embargo, al contrario de citoquinas anti-inflamatorias "clásicas", tal como IL-10 e IL-13, que inhiben producción del factor de necrosis tumoral directamente, la eritropoyetina parece estar activa solo en presencia de muerte neuronal.

Si bien no deseamos sujetarnos por ninguna teoría en particular, tal parece que esta actividad anti-inflamatoria puede explicarse de manera hipotética por varias teorías no limitantes. Primero, puesto que la eritropoyetina previene apoptosis, se evitarían eventos inflamatorios provocados por apoptosis. Adicionalmente, eritropoyetina puede prevenir la liberación de señales moleculares de neuronas moribundas que estimulan las células gliales o que podrían actuar directamente en las células gliales reduciendo su reacción a estos productos. Otra posibilidad es que eritropoyetina toca miembros más proximales de la cascada inflamatoria (por ej: caspasa 1, intermedios de oxígeno o nitrógeno reactivos) que provocan tanto apoptosis e inflamación.

Además, eritropoyetina parece provee protección anti-inflamatoria sin el efecto de rebote que típicamente se asocia a otros compuestos anti-inflamatorios tal como dexametasona. Nuevamente, sin querer sujetarnos a ninguna teoría en particular, tal parece que esto se debiera al efecto de eritropoyetina en las neuro toxinas multipropósito,

75

tales como óxido nítrico (NO). Aunque los astrositos activados y microgliales producen cantidades neurotóxicas de NO en respuesta a varios traumas, NO sirve a muchos propósitos dentro del cuerpo incluida la modulación de funciones fisiológicas esenciales. Por ello, aunque el uso de un anti-inflamatorio puede aliviar inflamación por la eliminación de NO u otras neuro toxinas, si el anti-inflamatorio tiene una media vida demasiado prolongada, también puede interferir con las funciones de estos químicos en reparar el daño que resulte del trauma que lleve a la inflamación. La hipótesis es que las citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la presente invención pueden aliviar la inflamación sin interferir con las capacidades restaurativas de neurotoxinas tales como NO.

Las composiciones y métodos específicos de la invención pueden utilizarse para tratar condiciones de y daño al tejido retinal. Dichos trastornos incluyen, más no se limitan a isquemia retinal, degeneración macular, desprendimiento de la retina, retinitis pigmentosa, retinopatía arteriosclerótica, retinopatía hipertensa, bloqueo de la arteria retinal, bloqueo de la vena retinal, hipotensión, y retinopatía diabética.

En otra realización, los principios de los métodos de la invención pueden utilizarse para proteger o tratar lesiones que resulten de daño por radiación a tejido excitable. Otra utilidad de los métodos de la presente invención es en el tratamiento de envenenamiento por neurotoxinas, tales como envenenamiento de ácido domóico por mariscos, neurolatirismo y enfermedad de Guam, esclerosis lateral amiotrófica y mal de Parkinson.

Tal como se mencionó arriba, la presente invención también se dirige a un método para mejorar la función de tejido excitable en un mamífero mediante administración periférica de una citoquina recombinante protectora de tejido como se describe arriba. Varias enfermedades y condiciones son susceptibles a tratamiento utilizando este método, y además, este método es útil para mejorar la función cognoscitiva en ausencia de alguna condición o enfermedad. Estos usos de la presente invención se describe más adelante en mayor detalle e incluyen mejoramiento de aprendizaje y entrenamiento en mamíferos tanto humanos como no humanos.

Las condiciones y las enfermedades tratables por los métodos de este aspecto de la presente invención dirigidos al sistema nervioso central incluyen, pero no se limitan a, trastornos del ánimo, ansiedad, depresión, autismo, deficiencia de la atención, trastorno de hiperactividad y disfunción cognoscitiva. Estas condiciones se benefician del mejoramiento de la función neuronal. Otros trastornos tratables de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención incluyen por ejemplo, interrupción del sueño, apnea del sueño y trastornos asociados con viaje; sangrados subaracnoides y aneurismales, choque hipotensivo, lesión concusiva, choque séptico, choque anafiláctico y secuelas de

76

varias encefalidias y meningitidas, por ejemplo, cerebritidas relacionadas con enfermedad del tejido conectivo, tal como lupus. Otros usos incluyen prevención o protección contra envenenamiento por neurotoxinas, tales como envenenamiento con ácido domóico de mariscos, neurolatirismo, y enfermedad de UAM, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson; tratamiento posoperatorio de embolia o lesión isquémica; irradiación cerebral; crisis de las células falciformes y eclampsia.

Otro grupo de condiciones tratables por los métodos de la presente invención incluyen disfunción mitocondrial, de naturaleza hereditaria o adquirida, que es la causa de una variedad de enfermedades neurológicas tipificadas por lesión y muerte neuronal. Por ejemplo, la enfermedad de Leigh (encefalopatía necrotizante subaguda) se caracteriza por la pérdida visual progresiva y encefalopatía, debido a derrame neuronal y miopatía. En estos casos, el metabolismo mitocondrial defectuoso no suministra suficientes sustratos de energía alta para alimentar el metabolismo de células excitables. Un modulador de la actividad receptora de eritropoyetina optimiza la función defectuosa en una variedad de enfermedades mitocondriales. Tal como se mencionó antes, las condiciones hipóxicas afectan adversamente los tejidos excitables. Los tejidos excitables incluyen, pero no se limitan a tejido del sistema nervioso central, tejido del sistema nervioso periférico y tejido cardíaco. Además de las condiciones ya descritas, los métodos de la presente invención son útiles para el tratamiento de envenenamiento por inhalación, tales como inhalación de monóxido de carbono y humo, asma severa, síndrome de falla respiratoria en adultos, choque y ahogamiento. Otras condiciones que crean condiciones hipóxicas o que por otros medios inducen daño al tejido excitable, incluyen hipoglicemia que puede presentarse por dosificación inadecuada de insulina, o con neoplasmas productores de insulina (insulinoma).

Varios trastornos neurológicos que se cree se originan de daño a tejido excitable se pueden tratar por los métodos de la presente invención. Trastornos crónicos en los que hay daño neuronal y para los que se provee tratamiento por la presente invención, incluyen trastornos relacionados con el sistema nervioso central y/o el sistema nervioso periférico, incluidos pérdida de la función cognoscitiva y demencia senil, trastornos de ataque crónico, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, demencia, pérdida de la memoria, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, esclerosis tuberosa, enfermedad de Wilson, parálisis cerebral y *supranuclear* progresiva, enfermedad de Guam, demencia corporal de Lewy, enfermedades de prion, tales como encefalopatías esponjiiformes, por ej: enfermedad de Creutzfeldt, enfermedad de Huntington, distrofia miotónica, ataxia de Freidrich y otras ataxias, así como síndrome de Gilles de la Tourette, trastornos de ataques tales como epilepsia trastorno de ataque crónico, ataque, trauma cerebral o de la columna vertebral, demencia por SIDA, alcoholismo, autismo, isquemia

retinal, glaucoma, trastornos de la función autonómica, tales como hipertensión y trastornos del sueño y trastornos neuropsiquiátricos que incluyen, más no se limitan a esquizofrenia, trastornos sico-afectivos, trastorno de deficiencia de la atención, hiperactividad, trastorno distímico, trastorno mayor depresivo, manía, trastorno obsesivo-compulsivo, trastornos por uso de sustancias psicoactivas, ansiedad, pánico, así como trastornos afectivos unipolares y bipolares. Otros trastornos neuropsiquiátricos y neurodegenerativos incluyen, por ejemplo, los que aparecen en *American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM), en su última versión, IV, la cual se incorpora en este contexto por referencia.

En otra realización, las moléculas recombinantes de toxina quimérica que comprenden una citoquina recombinante protectora de tejido pueden utilizarse para entrega terapéutica de toxinas para tratar un trastorno proliferativo, tal como cáncer o trastorno viral, tal como panencefalitis de esclerosis subaguda.

La siguiente tabla presenta una lista de indicaciones ilustrativas más no limitantes en cuanto a varias condiciones y enfermedades susceptibles a tratamiento por las citoquinas recombinantes protectoras de tejido ya mencionadas.

Célula, tejido u órgano	Disfunción o patología	Condición o enfermedad	Tipo
Corazón	Isquemia	Enfermedad de la arteria coronaria	Aguda, crónica, estable, inestable
		Infarto del miocardio	Síndrome de Dressler
		Angina	
		Enfermedad cardíaca congénita	Cardiomiopatía valvular
		Angina Prinzmetal	
		Ruptura cardíaca	Perforación septal aneurismática
		angitis	
	Arritmia	Tachy-, bradarritmia supraventricular, ventricular, anormalidades en conducción.	Estable, inestable Nodo del seno carótido hipersensibles
	Falla cardíaca congestiva	Izquierda, derecha, bi-ventricular, sistólica, diastólica.	Cardiomiopatías, tales como idiopáticas, familiares, infecciosas, metabólicas, deficiencias, trastorno del tejido conector, infiltración y granulomas, neurovascular.
		Miocarditis	Autoinmune, infecciosa, idiopática.
Vascular		Cor pulmonale	
	Trauma contundente y penetrante		
	Toxinas	Toxicidad con cocaína	
	Hipertensión	Primaria, secundaria	
	Descompresión		

78

	Hiperplasia fibromuscular		
	Aneurisma	Dissección, roto, alargado	
Pulmones	Obstructivos	Asma, Bronquitis crónica, Emfisema u obstrucción de la entrada de aire.	
	Enfermedad pulmonar isquémica	Embolia pulmonar, Trombosis pulmonar , Embolia por grasa	
	Enfermedades pulmonares ambientales		
	Enfermedad pulmonar isquémica	Embolia pulmonar, trombosis pulmonar	
	Enfermedad pulmonar intersticial	Fibrosis pulmonar idiopática	
	Congénita	Fibrosis cística	
	<i>Cor pulmonale</i>		
	Trauma		
	Neumonía y neumonitis	Infecciosa, parasítica, tóxica, traumática, quemadura, aspiración	
Páncreas	Endocrino	Diabetes mellitus tipo I y II.	Falla de la célula beta, disfunción, neuropatía diabética
		Otra falla de células endocrinas del páncreas.	
	Exocrino	Falla de páncreas exocrino	Pancreatitis
Hueso	Osteopenia	Primaria	Hipogonadismo, inmovilización post-menopáusica , hiperparatiroidismo asociado con edad, hipertiroidismo, deficiencia de calcio, magnesio, fósforo y/o vitamina D.
		Secundaria	
	Osteomielitis		
	Necrosis vascular		
	Trauma		
	Enfermedad de Paget		
Piel	Alopecia	Arecata totalis	Primaria secundaria calvicie de patrón masculino
	Vitiligo	Localizado generalizado	Primario Secundario
	Ulceración diabética		
	Enfermedad vascular periférica		
	Lesiones por quemaduras		
Trastornos autoinmunes	Lupus eritemátodos, Sjogren, Artritis reumatoide Glomerulonefritis Angitis		
	Histiocitosis Langerhan		
Ojos	Neuritis óptica		
	Lesiones contundentes y penetrantes, infecciones, enfermedad de células falciformes, desprendimiento de retina, arteritis temporal.		

79

	Isquemia retinal, degeneración macular, retinitis pigmentosa, retinopatía arteriosclerótica, retinopatía hipertensa, bloqueo de la arteria retinal, bloqueo de la vena retinal, hipotensión, retinopatía diabética y edema macular.		
Trastornos embrionarios y fetales	Asfixia		
	Isquemia		
SNC	Síndrome de fatiga crónica, síndromes hiposmolares e hiperosmolares agudos y crónicos, demencia por SIDA, electrocución		
	Encefalitis	Rabia, herpes	
	Meningitis		
	Hematoma subdural		
	Adicción a la nicotina		
	Abuso y retiro de droga	Cocaína, heroína, crack, marihuana, LSD, PCP, abuso de poli-narcóticos, éxtasis, opiodes, hipnóticos sedantes, anfetaminas, cafeína	
	Trastornos obsesivos-compulsivos		
	Estenosis espinal, mielitis transversa <i>Gullian Barre</i> , trauma, compresión de la raíz nerviosa, compresión tumoral, ataque cardíaco.		
ENT	<i>Tinnitus</i> Síndrome de <i>Meiere</i> Pérdida de la audición		
	Lesión traumática, barotraumas		
Riñón	Falla renal	Aguda, crónica	Vascular/isquémica, enfermedad intersticial, enfermedad renal diabética, síndromes nefróticos, infecciones, lesión inducida por contraste, inducida por quimioterapia, inducida por CPB, o preventiva
	<i>Henoch S. Purpura</i>		
Músculo estriado	Trastornos autoinmunes	Myasthenia gravis, Dermatomiositis, Polimiositis	
	Miopatías	Metabólica heredada, endocrina y tóxica	
	Ataque cardíaco		
	Lesión por aplastamiento		
	Rabdomiolisis		
	Enfermedad mitocondrial		
	Infección	Fasciitis necrotizante	
Disfunción sexual	Central y periférica (como disfunción eréctil)	Impotencia secundaria a medicamento (diabetes)	
Hígado	Hepatitis		
	Enfermedad isquémica		
	Cirrosis, hígado graso		
	Enfermedades infiltrantes / metabólicas		

80

Gastrointestinal	Enfermedad de intestino inflamado		
	Enterocolitis necrotizante		
Transplante de órganos	Tratamiento de donante y receptor		
Vías reproductivas	infertilidad	Vascular, autoinmune, anomalías uterinas, trastornos de implante	
Endocrino	Hiper e hipofunción glandular		

Como ya se dijo, estas enfermedades, trastornos o condiciones son únicamente ilustrativas del rango de beneficios que ofrecen las citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la invención. Por lo tanto, esta invención provee generalmente tratamiento terapéutico o profiláctico de las consecuencias de trauma mecánico o de enfermedades al ser humano. Se prefiere el tratamiento terapéutico no profiláctico de enfermedades, trastornos o condiciones del SNC y/o del sistema nervioso periférico. Se provee tratamiento terapéutico o profiláctico para enfermedades, trastornos o condiciones que tengan un componente psiquiátrico. Se provee tratamiento terapéutico o profiláctico de enfermedades, trastornos o condiciones incluidas, más no limitados a aquellos que tengan un componente oftálmico, cardiovascular, cardiopulmonar, respiratorio, renal, urinario, reproductivo, gastrointestinal, endocrino o metabólico.

En una realización, dicha composición farmacéutica de una citoquina recombinante protectora de tejido puede administrarse en forma sistemática para proveer o mejorar las células, tejido u órgano objetivo. Dicha administración puede ser parenteral, por inhalación, o por vía transmucosa, por ej: por vía oral, nasal, rectal, intravaginal, sublingual, submucosa o transdermal. Preferiblemente, la administración es parenteral, por ej: por inyección intravenosa o intraperitoneal, y también se incluye, sin limitar, administración intra-arterial, intramuscular, intradermal y subcutánea.

Para otras rutas de administración, tal como mediante el uso de un perfusado, inyección a un órgano u otra administración local, se proveerá una composición farmacéutica que resulte en niveles similares de una citoquina recombinante protectora de tejido como la descrita antes. Se prefiere un nivel entre 0,01pM – 30nM.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, el término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o que aparezca en la *U.S. Pharmacopeia* u otra farmacopea extranjera reconocida generalmente para uso en animales, y más preferiblemente para uso en seres humanos. El término “vehículo” se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente con el que se administre el producto terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales

81

como soluciones salinas enagua y aceites, incluidos los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de maní, aceite de soya, aceite mineral, aceite de ajonjolí y similares. Una solución salina es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica es administrada por vía intravenosa. Soluciones salinas y soluciones de dextrosa y glicerol acuosas también pueden emplearse como vehículos líquidos, en particular para soluciones inyectables. Excipientes farmacéuticos apropiados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sucrosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche seca descremada, glicerol, propilen glicol, agua, etanol y similares. Si se desea, la composición también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsificantes, o agentes tamponadores de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con enlazantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. Los compuestos de la invención pueden formularse como formas neutras o salinas. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con grupos amino libres como los derivados de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellos formados con grupos carboxil libre tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaina, etc. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en *"Remington's Pharmaceutical Sciences"* por E.W. Martin. Dichas composiciones contienen una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo de modo que provea la forma de administración adecuada al paciente. La formulación debe corresponder al modo de administración.

Las composiciones farmacéuticas aptas para administración oral pueden proveerse como cápsulas o tabletas; como polvos o gránulos; como soluciones jarabes o suspensiones (en líquidos acuosos o no acuosos); como espumas o batidos comestibles, o como emulsiones. Tabletetas o cápsulas de gelatina duras pueden comprender lactosa, almidón o derivados de lo mismo, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, ácido esteárico o sales de lo mismo. Cápsulas de gelatina blanda pueden comprender aceites vegetales, ceras, grasas, polioles líquidos o semi-líquidos, etc. Las soluciones y jarabes pueden comprender agua, polioles y azúcares.

Un agente activo dirigido para administración oral puede recubrirse o mezclarse con material que retarde la desintegración y/o absorción del agente activo en el tracto gastrointestinal (por ej: monoestearato de gliceril o distearato de gliceril). De este modo, la liberación sostenida de un agente activo puede alcanzarse durante muchas horas, y si

92
fuere necesario, el agente activo puede protegerse contra degradación en el estómago. Se pueden formular composiciones farmacéuticas para administración oral con el fin de facilitar la liberación de un agente activo en un sitio en particular del gastrointestinal debido a condiciones enzimáticas o de pH específicas.

Se pueden proveer composiciones farmacéuticas aptas para administración transdermal como parches que permanezcan en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo de tiempo prolongado. Se pueden proveer composiciones farmacéuticas para administración tópica tales como ungüentos, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, atomizadores, aerosoles o aceites. Para administración tópica a la piel, boca, ojo u otro tejido externo, se prefiere utilizar un ungüento tópico o crema. Cuando se formule en un ungüento, el ingrediente activo puede emplearse con una base de ungüento parafínica o miscible en agua. Alternativamente, el ingrediente activo puede formularse en una crema con una base aceite en agua o agua en aceite. Las composiciones farmacéuticas aptas para administración tópica a los ojos incluyen gotas ópticas. En estas composiciones, el ingrediente activo puede disolverse o suspenderse en un vehículo adecuado, por ej: en un solvente acuoso. Composiciones farmacéuticas aptas para administración tópica en la boca incluyen pastillas, píldoras y enjuagues bucales.

Las composiciones farmacéuticas aptas para administración nasal y pulmonar pueden comprender vehículos sólidos tales como polvos (preferiblemente que tengan un tamaño de partícula entre 20 y 500 micrones). Los polvos pueden administrarse para oler, es decir, por inhalación rápida a través de la nariz de un contenedor de polvo que se mantenga cerca de la nariz. Alternativamente, las composiciones aptas para administración nasal pueden comprender vehículos líquidos, por ej: atomizadores nasales o gotas nasales. Alternativamente, la inhalación directamente a los pulmones puede hacerse por inhalación profunda o instalación a través de una boquilla en la orofaringe. Estas composiciones pueden comprender soluciones acuosas o aceitosas del ingrediente activo. Las composiciones para administración por inhalación pueden suministrarse en dispositivos especialmente adaptados, incluidos más no limitados a aerosoles presurizados o nebulizadores, los cuales pueden hacerse de modo que provean dosificaciones predeterminadas del ingrediente activo. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas de la invención son administradas en la cavidad nasal directamente o en los pulmones por medio de la cavidad nasal u orofaringe.

Las composiciones farmacéuticas aptas para administración rectal pueden proveerse como supositorios o enemas. Las composiciones farmacéuticas aptas para administración vaginal pueden proveerse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones atomizadoras.

43

Las composiciones farmacéuticas aptas para administración parenteral incluyen soluciones o suspensiones inyectables estériles, acuosas y no acuosas, las cuales pueden contener antioxidantes, tamponadores, bacteriostatos y solutos que hagan la composición sustancialmente isotónica con la sangre del receptor. Otros componentes que pueden estar presentes en dichas composiciones incluyen agua, alcoholes, polioles, aceites de glicerina y vegetales, por ejemplo. Las composiciones aptas para administración parenteral pueden estar presentes en contenedores de una o varias dosis, por ejemplo ampollitas y viales herméticos y pueden almacenarse en estado congelado-seco (liofilizado) que requiera solo la adición de un vehículo líquido estéril, por ej: una solución salina estéril para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Soluciones y suspensiones extemporáneas inyectables se pueden preparar de polvos estériles, gránulos y tabletas. En una realización, un autoinyector que comprenda una solución inyectable de una citoquina recombinante protectora de tejido se puede proveer para uso de emergencia en ambulancias, salas de urgencia y situaciones en el campo de batalla, y aún para auto-administración en un ambiente doméstico, en particular cuando pueda ocurrir la posibilidad de una amputación traumática, tal como por el uso imprudente de una podadora. La posibilidad de que células y tejidos en un pie o dedo desprendido sobrevivan luego de que se vuelva a fijar pueden aumentar mediante la administración de una citoquina recombinante protectora de tejido a múltiples sitios en la parte desprendida tan pronto como sea posible, aún antes de que llegue al sitio el personal médico o de que la persona afectada llegue a la sala de urgencias con el dedo o pie desprendido.

En una realización preferida, la composición es formulada de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica apta para administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tamponador acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaina para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se proveen por separado o mezclados en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado sin agua en un contenedor herméticamente sellado, tal como en una ampollita o sobre, donde se indique la cantidad de agente activo. Cuando la composición vaya a ser administrada por medio de inyección, se puede proveer una ampollita de salina estéril de modo que se puedan mezclar los ingredientes antes de su administración.

Generalmente, los supositorios contienen ingrediente activo entre 0,5% y 10% por peso; preferiblemente, las formulaciones orales contienen de 10% a 95% del ingrediente activo.

94

Se puede proveer una composición perfusada para uso en baños de órganos transplantados, para perfusión *in situ*, o para administración a la vasculatura de un donante de órgano antes de recoger el órgano. Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender niveles de una citoquina recombinante protectora de tejido o una forma de una citoquina recombinante protectora de tejido no apta para administración aguda o crónica, local o sistémica aun individuo, sino que sirva para las funciones que se mencionan aquí a un cadáver, baño de órgano, perfusado de órgano, o perfusado *in situ* antes de remover o reducir los niveles de la citoquina recombinante protectora de tejido que se contiene allí antes de exponer o regresar el órgano o tejido tratado a circulación regular.

La invención también provee un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más contenedores llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente asociados con dichos contenedores, se puede incluir un aviso en la forma indicada por una agencia del gobierno que regule la fabricación, uso o venta de los productos farmacéuticos o biológicos, donde aparezca la aprobación de dicha agencia en cuanto a la fabricación, uso o venta para administración humana.

Por ejemplo, en otra realización, se puede entregar una citoquina recombinante protectora de tejido en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, el polipéptido puede administrarse utilizando una infusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdermal, liposomas, u otros modos de administración. En una realización, se puede utilizar una bomba (ver Langer, *supra*; Sefton, 1987, *CRC Crit. Rev. Biomed. Eng.* 14:201; Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88:505; Saude et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). En otra realización, el compuesto puede entregarse en un vesículo, en particular una liposoma (ver Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Trete et al., en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, New York, páginas 353-365 (1989); WO 91/04014; Patente U.S. No., 4,704,355; Lopez-Berestein, *ibid.*, págs 317-327; ver generalmente *ibid.*). En otra realización, se pueden utilizar materiales poliméricos (ver *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds). CRC Press: Boca Raton, Florida, 1974; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds), Wiley: New York (1984); Ranger and Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61, 1953; ver también Levy et al., 1985, *Science* 228:190; During et al., *Ann. Neurol.* 25:351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 71:105).

Aún en otra realización, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca al objetivo terapéutico, es decir, a las células, tejido u órgano objetivo, necesitando de este modo solo una fracción de la dosis sistémica (ver por ej. Goodson, págs. 115-138

45
en *Medical Applications of Controlled Release*, vol.2, *supra*, 1984). Otros sistemas de liberación controlada se discuten en el análisis de Langer (1990, *Science* 249:1527-1533)

En una realización específica, se puede desear administrar localmente las composiciones de citoquina recombinante protectora de tejido de la invención en el área que requiera el tratamiento; esto puede lograrse, por ejemplo, y no como limitación, mediante infusión local durante cirugía; aplicación tópica, por ej: junto con un vendaje de herida luego de cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o por medio de un implante que sea de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluidas membranas tales como membranas silásticas o fibras.

La selección de la dosis efectiva preferida la puede determinar una persona versada en la técnica teniendo en cuenta varios factores conocidos en la técnica. Dichos factores incluyen la forma particular de la citoquina recombinante protectora de tejido y sus parámetros farmacéuticos tales como biodisponibilidad, metabolismo, vida media, etc., que serán establecidos durante los procedimientos de desarrollo normales que típicamente se empleen para obtenerla aprobación reguladora para un compuesto farmacéutico. Otros factores para considerar la dosis incluyen la condición o enfermedad que se vaya a tratar o el beneficio que se vaya a lograr en un individuo normal, la masa corporal del paciente, la vía de administración, si la administración es aguda o crónica, medicamentos concomitantes y otros factores que bien se sabe afectan la eficacia de los agentes farmacéuticos administrados. Por ello, la dosis precisa debe decidirse de acuerdo con el juicio del médico y de las circunstancias de cada paciente, por ej: dependiendo de la condición y estado inmune del paciente individual y de acuerdo con técnicas clínicas estándar.

En otro aspecto de la invención, se provee un perfusado o una solución perfusada para perfusión y almacenamiento de órganos para trasplante; la solución de perfusión incluye una cantidad de citoquina recombinante protectora de tejido efectiva para proteger células de respuesta y sus respectivos células, tejidos u órganos. Trasplante incluye, más no se limita a: xenotrasplante, donde un órgano (incluidas células, tejido u otra parte corporal) es tomado de un donante y transplantado en un receptor diferente; y auto-trasplante, donde el órgano es tomado de una parte de un cuerpo y reemplazado en otro, incluidos procedimientos en mesa de cirugía, en los cuales se puede retirar un órgano, y mientras esté *ex vivo*, seccionarlo, repararlo o de otra forma manipularlo, tal como remoción tumoral, y luego regresarlo al sitio original. En una realización, la solución de perfusión es la solución de la Universidad de Wisconsin (UW) (Patente US. No. 4,798,824) que contiene entre 1 y 25U/ml de eritropoyetina, almidón de hidroxietil al 5% (con un peso molecular entre 200,000 y 300,000 y sustancialmente libre de etilen glicol, etilen clorohidrina, cloruro de sodio y acetona); 25mM de KH_2PO_4 ; 3mM de

glutaciona; 5mM de adenosina; 10 mM de glucosa; 10 mM tamponador HEPES; 5mM gluconato de magnesio; 1,5 mM de CaCl₂; 105mM de gluconato de sodio; 200,000 unidades de penicilina, 40 unidades de insulina; 16 mg de dexametasona; 12mg de fenol rojo; y un pH de 7,4-7,5 y una osmolalidad de aproximadamente 320 mOSm/l. La solución se utiliza para conservar riñones y páncreas cadavéricos antes de ser transplantados. Usando la solución, la conservación puede ampliarse al límite de 30 horas recomendado para conservación de riñones cadavéricos. Este perfusado en particular es meramente ilustrativo de un número de las soluciones que pueden adaptarse para el presente uso mediante la inclusión de una cantidad efectiva de la citoquina recombinante protectora de tejido. En otra realización, la solución perfusada contiene entre 0,01pg/ml y 400 ng/ml de citoquina recombinante protectora de tejido, o entre 40y 300 ng/ml de citoquina recombinante protectora de tejido. Como ya se dijo, en este aspecto de la invención se puede usar cualquier forma de citoquina recombinante protectora de tejido.

Si bien el receptor preferido de una citoquina recombinante protectora de tejido para los propósitos de esta invención es para un ser humano, los métodos que se divulgan aquí aplican igualmente a otros mamíferos, en particular animales domésticos, ganado, animales de compañía y animales salvajes. Sin embargo, la invención no se limita a ello y sus beneficios se pueden aplicar a cualquier mamífero.

5.6 USOS TERAPÉUTICOS Y PREVENTIVOS DE CITOQUINAS RECOMBINANTES PROTECTORAS DE TEJIDO

Tal como se menciona en el Ejemplo1 más adelante, la presencia de receptores de eritropoyetina en el endotelio cerebral capilar humano indica que los blancos de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la invención están presentes en el cerebro humano, y que los estudios de animales sobre estas citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la invención pueden trasladarse directamente al tratamiento o profilaxis de seres humanos.

En otro aspecto de la invención, se proveen métodos y las composiciones para mejorar la viabilidad de células, tejidos u órganos que no están aislados de la vasculatura por una barrera de células endoteliales exponiendo las células, tejido u órganos directamente a una composición farmacéutica que comprenda una citoquina recombinante protectora de tejido, o administrando o contactando una composición farmacéutica que contenga citoquina recombinante protectora de tejido a la vasculatura

del tejido u órgano. La actividad mejorada de células de respuesta en el tejido u órgano tratado es responsable por los efectos positivos que se ejerzan.

Tal como se describe arriba, la invención se basa, en parte, en el hallazgo de que las moléculas de eritropoyetina pueden ser transportadas de la superficie luminal a la superficie inferior de la membrana de las células endoteliales de las capilares de órganos con uniones apretadas de células endoteliales, incluidos por ejemplo, el cerebro, la retina y los testículos. De este modo, las células de respuesta a través de la barrera son blancos susceptibles para los efectos benéficos de una recombinante protectora de tejido y otros tipos de células o tejidos u órganos que contengan y dependan, total o parcialmente de células de respuesta allí, son blancos para los métodos de la invención. Si bien no deseamos someternos a ninguna teoría en particular, luego de la transcitosis de una citoquina recombinante protectora de tejido, ésta puede interactuar con un receptor de eritropoyetina en una célula de respuesta, por ejemplo, en una célula neuronal, retinal, muscular, cardíaca, pulmonar, del hígado, riñón, intestino delgado, corteza adrenal, médula adrenal, endotelial capilar, testículos, ovarios, páncreas, hueso, piel o endometrial, y el enlace del receptor puede iniciar una cascada de transducción de señales resultando en la activación de un programa de expresión de genes dentro de la célula de respuesta o tejido, resultando en la protección de la célula o tejido u órgano, contra daño tal como por toxinas, agentes quimioterapéuticos, terapia de radiación, hipoxia, etc. Por lo tanto, más adelante se describen los métodos para proteger tejido que contenga células de respuesta contra lesión o estrés hipóxico, y mejorar la función de cada tejido. Como ya se dijo, los métodos de la invención son aplicables igualmente a seres humanos así como a otros animales.

En la práctica de una realización de la invención, un paciente mamífero está pasando por una quimioterapia sistémica para tratamiento de cáncer, incluida terapia de radiación, que comúnmente tiene efectos adversos tales como daño nervioso, pulmonar, cardíaco, ovárico o testicular. La administración de una composición farmacéutica que comprenda una citoquina recombinante protectora de tejido como la que se describe arriba, se hace antes y durante la quimioterapia y/o terapia de radiación para proteger a varios tejidos y órganos contra daño que pueda causar el agente quimioterapéutico, como para proteger los testículos. El tratamiento se puede continuar hasta que los niveles de circulación del agente quimioterapéutico caigan por debajo de un nivel de peligro potencial para el cuerpo del mamífero.

En la práctica de otra realización de la invención, se planeó recoger varios órganos de una víctima de un accidente automovilístico para trasplante a una serie de receptores, algunos de los cuales requerían transporte por una distancia considerable y un periodo de tiempo prolongado. Antes de recoger el órgano, se le infundió a la víctima una

98

composición farmacéutica que comprendía la citoquina recombinante protectora de tejido que se describe aquí. Los órganos recolectados para despacho fueron perfusados con un perfusado que contenía la citoquina recombinante protectora de tejido que se describe aquí, y se almacenó en un baño que comprendía la citoquina recombinante protectora de tejido. Algunos órganos se perfusaron continuamente con un dispositivo de perfusión pulsátil utilizando un perfusado que contenía la citoquina recombinante protectora de tejido según la presente invención. Durante el transporte y luego de implante y reperfusión de los órganos *in situ* ocurrió un deterioro mínimo de la función del órgano.

En otra realización de la invención, un procedimiento quirúrgico para reparar una válvula del corazón requirió cardioplegia temporal y oclusión arterial. Antes de la cirugía, se infundió al paciente con 4 µg de citoquina recombinante protectora de tejido por kg de peso corporal. Dicho tratamiento evitó daño celular isquémico hipóxico, en particular después de la reperfusión.

En otra realización de la invención, en cualquier procedimiento quirúrgico, tal como en una cirugía de *bypass* cardiopulmonar, se puede usar una citoquina recombinante protectora de tejido de la invención. En una realización, la administración de una composición farmacéutica que comprenda una citoquina recombinante protectora de tejido como se describe arriba, se hace antes, durante y/o luego del procedimiento de *bypass*, para proteger la función del cerebro, corazón y otros órganos.

En los anteriores ejemplos en los cuales se utilizó una recombinante protectora de tejido de la invención para aplicaciones *ex-vivo*, o para tratar células de respuesta tales como células o tejido neuronales, de tejido, tejido retinal, corazón, pulmón, hígado, riñón, intestino delgado, corteza adrenal, medula adrenal, endotelial capilar, testículos, ovarios o endometriales, la invención provee una composición farmacéutica en forma de dosis unitaria adaptada para la protección o mejoramiento de células de respuesta, tejidos u órganos distales a la vasculatura que comprende, por unidad de dosis, una cantidad efectiva no tóxica entre 0,01pg y 5mg, 1pg y 5mg, 500pg y 5mg, 1ng y 5 mg, 500ng y 5mg, 1µg y 5mg, 500µg y 5mg, o 1mg y 5mg de una citoquina recombinante protectora de tejido y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, la cantidad de citoquina recombinante protectora de tejido está entre 1ng y 5mg. En una realización preferida, la citoquina recombinante protectora de tejido de la mencionada composiciones no eritropoyética.

En otro aspecto de la invención, se encontró que la administración de EPO restaura la función cognoscitiva en animales que han pasado por trauma cerebral. Se esperaba que las citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la invención tengan los mismos efectos protectores celulares que EPO. Luego de una demora de 5 ó 30 días, EPO pudo restaurar la función en comparación con animales tratados con simulación, lo

69

cual indica la capacidad de EPO para regenerar o restaurar la actividad cerebral. Por ello, la invención también se dirige al uso de una citoquina recombinante protectora de tejido para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de trauma cerebral y otras disfunciones cognitivas, incluido tratamiento bien después de la lesión (por ej: tres días, cinco días, una semana, un mes o más). La invención también se dirige a un método para el tratamiento de una disfunción cognoscitiva luego de lesión, mediante la administración de una cantidad efectiva de una citoquina recombinante protectora de tejido. Cualquier citoquina recombinante protectora de tejido que se describe aquí puede utilizarse para este aspecto de la invención.

Además, este aspecto restaurativo de la invención se dirige al uso de cualquiera de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido para la preparación de una composición farmacéutica para la restauración de disfunción celular, de tejido u órgano, en la cual el tratamiento se inicie después, y bien después del evento inicial responsable por la disfunción. Más aún, el tratamiento utilizando las citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la invención pueden extender el curso de la enfermedad o condición durante la fase aguda, así como también una fase crónica.

En el caso en el que una citoquina recombinante protectora de tejido tenga actividad eritropoyética, en una realización preferida, la citoquina recombinante protectora de tejido puede administrarse sistemáticamente a una dosis entre 0,01 pg y 100µg/kg de peso corporal, preferiblemente entre 1-50 µg/kg de peso corporal, más preferiblemente entre 5-30µg /kg de peso corporal por administración. Esta dosis efectiva debe ser suficiente para alcanzar niveles séricos de citoquina recombinante protectora de tejido superiores a 10,000, 15,000 ó 20,000 mUml de suero luego de la administración de la citoquina recombinante protectora de tejido. Dichos niveles séricos pueden lograrse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 horas posteriores a la administración. Dichas dosis se pueden repetir según sea necesario. Por ejemplo, la administración puede repetirse diariamente, durante el tiempo que clínicamente sea necesario, u ofrecer un intervalo apropiado, por ej: cada 1 a 12 semanas, pero preferiblemente, cada 1 a 3 semanas. En una realización, la cantidad efectiva de la citoquina recombinante protectora de tejido y un vehículo farmacéuticamente aceptable pueden empacarse en un vial de una dosis u otro contenedor. En otra realización, una citoquina recombinante protectora de tejido útil para los propósitos de esta invención es no eritropoyética, es decir, que pueda ejercer las actividades que se describen aquí sin causar un aumento en la concentración de hemoglobina o hematocritos. Dicha forma no eritropoyética de una citoquina recombinante protectora de tejido se prefiere en casos en los que los métodos de la presente invención sean provistos crónicamente. En otra realización, una citoquina recombinante protectora de tejido se suministra a una dosis superior que la necesaria con

20

el fin de estimular al máximo la eritropoyesis. Como ya se dijo, una citoquina recombinante protectora de tejido de la invención no tiene necesariamente actividad eritropoyética, y por lo tanto, las dosis anteriores expresadas en unidades son únicamente ilustrativas para citoquinas recombinantes protectoras de tejido; arriba, se proveen equivalentes molares de las dosis que son aplicables a cualquier citoquina recombinante protectora de tejido.

La presente invenciones dirige además a un método para facilitar el transporte de una molécula a través de una barrera de células endoteliales en un mamífero, mediante la administración de una composición que comprende la molécula en particular, en asociación con una citoquina recombinante protectora de tejido como la descrita antes. Tal como se dijo arriba, las uniones apretadas entre las células endoteliales en ciertos órganos en el cuerpo crean una barrera para el ingreso de ciertas moléculas. Para el tratamiento de varias condiciones dentro de órgano con barrera, se desean medios para facilitar el paso de los agentes farmacéuticos. Una citoquina recombinante protectora de tejido de la invención es útil como vehículo para entregar otras moléculas a través de las barreras sangre-cerebro u otras barreras similares. Se prepara una composición que comprenda una molécula que desee cruzar la barrera con una citoquina recombinante y la administración periférica de la composición resulta en la transcitosis de la composición a través de la barrera. La asociación entre la molécula que vaya a ser transportada a través de la barrera y la citoquina recombinante protectora de tejido puede ser un enlace covalente lábil, en cuyo caso, la molécula es liberada de la asociación con la citoquina recombinante luego de atravesar la barrera. Si la actividad farmacológica de la molécula se mantiene o no es afectada por la asociación con la citoquina recombinante protectora de tejido, puede administrarse tal complejo.

Una persona versada en la técnica conocerá varios medios para asociar moléculas con una citoquina recombinante protectora de tejido de la invención y otros agentes arriba descritos, por medios covalentes, no covalentes y otros; además, la evaluación de la eficacia de la composición puede determinarse fácilmente en un sistema experimental. La asociación de moléculas con una citoquina recombinante protectora de tejido puede lograrse por una serie de medios, incluido enlace lábil, enlace covalente, enlace cruzado, etc. Pueden emplearse interacciones biotin/avidin. Tal como se dijo arriba, se puede preparar una molécula por medios sintéticos o recombinantes, por ejemplo, que incluya tanto el dominio de la molécula con actividad farmacológica deseada como el dominio responsable por la modulación de la actividad del receptor de eritropoyetina.

Se puede conjugar una molécula a una citoquina recombinante protectora de tejido por medio de una molécula polifuncional, es decir, un enlace cruzado polifuncional. Tal como se utiliza aquí, "molécula polifuncional" abarca moléculas con

un grupo funcional que pueden reaccionar más de una vez en sucesión, tal como formaldehído, así como moléculas con más de un grupo reactivo. Tal como se utiliza aquí, el término "grupo reactivo" se refiere a un grupo funcional en el enlace cruzado que reacciona con un grupo funcional en una molécula (por ej: péptido, proteína, carbohidrato, ácido nucleico, en particular, un agente hormonal, antibiótico o anticancerígeno se puede entregar a través de la barrera de células endoteliales) de modo que se forme un enlace covalente entre el enlace cruzado y esa molécula. El término "grupo funcional" conserva su significado estándar en química orgánica. Preferiblemente, las moléculas polifuncionales que se pueden utilizar son enlazantes biocompatibles, es decir, que sean no carcinogénicos, no tóxicos, y sustancialmente no inmunogénicos *in vivo*. Los enlazantes cruzados polifuncionales como los que se conocen en la técnica y los que se describen aquí pueden probarse fácilmente en modelos animales para determinar su biocompatibilidad. Preferiblemente, la molécula polifuncional es bifuncional. Tal como se utiliza aquí, el término "molécula bifuncional" se refiere a una molécula con dos grupos reactivos. La molécula bifuncional puede ser heterobifuncional u homobifuncional. Un enlazante cruzado heterobifuncional permite la conjugación vectorial. Para la molécula polifuncional se prefiere en particular que sea lo suficientemente soluble en agua a fin de que las reacciones de enlace cruzado ocurran en soluciones acuosas tales como en soluciones acuosas tamponadas a un pH de 6 a 8, y para que el conjugado resultante permanezca soluble en agua para una bio-distribución más efectiva. Típicamente, la molécula polifuncional se enlaza de manera covalente con un grupo funcional amino o sulfhidrilo. Sin embargo, las moléculas polifuncionales reactivas con otros grupos funcionales, tales como ácidos carboxílicos o grupos hidroxilo se contemplan en la presente invención.

Las moléculas homobifuncionales tienen al menos dos grupos funcionales reactivos que son los mismos. Los grupos funcionales reactivos en una molécula homobifuncional incluyen, por ejemplo, grupos aldehído y grupos éster activos. Moléculas homobifuncionales que tengan grupos aldehído incluyen, por ejemplo, glutaraldehído y subaraldehído. El uso de glutaraldehído como agente de enlace cruzado fue divulgado por Pozansky et al, *Science* 223, 1304-1306 (1984). Las moléculas homobifuncionales que tengan al menos dos unidades de éster activas incluyen ésteres de ácidos dicarboxílicos y N-hidroxisuccinimida. Algunos ejemplos de dichos ésteres N-succinimidil incluyen disuccinimidil suberato y ditio-bis-(succinimidil propionato), y sus sales de ácido bis-sulfónico y bis-sulfonato solubles como sus sales de sodio y de potasio. Estos reactivos homobidifuncionales se consiguen en varias fuentes comerciales (Pierce, Rockford, Illinois).

Las moléculas heterobifuncionales tienen al menos dos grupos reactivos diferentes. Los grupos reactivos reaccionan con grupos funcionales diferentes, por ej: presentes en la muteína de eritropoyetina y la molécula. Estos dos grupos funcionales diferentes que reaccionan con el grupo reactivo en el enlazante cruzado heterobifuncional son usualmente un grupo amino, por ej: el grupo epsilon amino de lisina; un grupo sulfhidrilo, por ej: el grupo tiol de cisteína; un ácido carboxílico, por ej: el carboxilato en ácido aspártico; o un grupo hidroxilo, por ej: el grupo hidroxilo en serina. Naturalmente, a las citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la invención les puede faltar un residuo de amino ácido en particular que facilite el enlace cruzado de la eritropoyetina nativa, pero una persona versada en la técnica conocerá los medios de residuos disponibles en una muteína de la invención y hará el enlace cruzado de conformidad.

Más aún, es posible que las varias moléculas de la citoquina recombinante protectora de tejido de la invención no tengan grupos reactivos adecuados disponibles para uso con ciertos agentes de enlace cruzado; sin embargo, una persona versada en la técnica conocerá ampliamente la opción de los agentes de enlace cruzado con base en los grupos disponibles para enlace cruzado en una eritropoyetina de la invención.

Cuando un grupo reactivo de una molécula heterobifuncional forma un enlace covalente con un grupo amino, normalmente el enlace covalente será un enlace amido o imido. El grupo reactivo que forma un enlace covalente con grupo amido, puede, por ejemplo, ser un grupo carboxilado activado, un grupo halocarbonilo o un grupo éster. Preferiblemente, los grupos éster son grupos éster reactivos tales como por ejemplo, un grupo éster N-hidroxi-succinimida.

El otro grupo es típicamente un grupo tiol, un grupo que pueda convertirse en un grupo tiol, o un grupo que forme un enlace covalente con un grupo tiol. Usualmente, el enlace covalente será un enlace tioéter o un disulfuro. El grupo reactivo que forma un enlace covalente con un grupo tiol, puede ser por ejemplo, un enlace doble que reacciona con grupos tiol o con un disulfuro activado. Un grupo reactivo que contenga un enlace doble capaz de reaccionar con un grupo tiol es el grupo maleimido, aunque otros, tales como acrilonitrilo, también son posibles. Un grupo disulfuro reactivo, puede ser por ejemplo, un grupo 2-piridilditio o un grupo 5,5'-ditio-bis-(2-ácido nitrobenzóico). Algunos ejemplos de reactivos heterobifuncionales que contienen enlaces disulfuro reactivos incluyen N-succinimidil 3-(2-piridil-ditio)propionato (Carlsson et al, 1978, *Biochem J.*, 173:723-737), sodio S-4-succinimidiloxycarbonil-alfa-metilbenciltiosulfato y 4-succinimidiloxycarbonil-alfa-metil-(2-piridilditio)tolueno. Se prefiere N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato. Algunos ejemplos de reactivos heterobifuncionales que comprenden grupos reactivos que tienen un enlace doble que reacciona con un grupo tiol

93

incluyen succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato y succinimidil-m-maleimidobenzoato.

Otras moléculas heterobifuncionales incluyen succinimidil 3-(maleimido) propionato, sulfosuccinimidil 4-(p-maleimido-fenil)butirato, sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil-ciclohexano)-1-carboxilato, maleimidobenzoil-N-hidroxi-succinimida éster. Se prefiere la sal de sulfonato de sodio de succinimidil m-maleimidobenzoato. Muchos de los reactivos heterobifuncionales arriba mencionados y sus sales de sulfonato se consiguen de Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, USA.

La necesidad para que el conjugado arriba descrito sea reversible o lábil puede determinarla fácilmente una persona versada en la técnica. Un conjugado puede ser probado *in vitro* tanto para la actividad de la citoquina recombinante protectora de tejido, como para la actividad farmacológica deseada. Si el conjugado conserva ambas propiedades, su idoneidad puede probarse luego *in vivo*. Si la molécula conjugada requiere separación de la citoquina recombinante protectora de tejido para actividad, se preferirá un enlace lábil o asociación reversible con la citoquina recombinante protectora de tejido. Las características de labilidad también se pueden probar en procedimientos *in vitro* estándar antes de la prueba *in vivo*.

Más información sobre cómo hacer y usar éstos y otros reactivos polifuncionales se pueden obtener de las siguientes publicaciones u otras disponibles en el campo:

1. Carlsson J., et al., 1978, *Biochem J.* 173:723-737
2. Cumber, J.A. et al., 1985, *Methods in Enzymology* 112:207-224
3. Jue, R. Et al, 1978, *Biochem* 17:5399-5405
4. Sun, T.T. et al, 1974, *Biochem.* 13:2334-2340.
5. Blatter, W.A. et al., 1985, *Biochem.* 24:1517-152.
6. Liu, F.T. et al., 1979, *Biochem.* 18:690-697.
7. Youle, R.J. y Neville, D.M. Jr. 1980, *Proc. Natll. Acad. Sci. USA.* 77:5483-5486.
8. Lerner, R.A. et al, 1981, *Proc. Natll. Acad. Sci. USA.* 78:3403-3407.
9. Jung, S.M. y Moroi, M. 1983, *Biochem. Biophys. Acta* 761:162.
10. Caulfield, M.P. et al., 1984, *Biochem.* 81:7772-7776.
11. Staros, J.V.,m 1982, *Biochem.* 21:3950-3955.
12. Yoshitake, S. et al., 1979, *Eur. J. Biochem.* 101:395-399.
13. Yoshitake, S. et al., 1982, *Eur. J. Biochem.* 92:1413-1424.
14. Pilch, P.F. y Czech, M.P. 1979, *J. Biol. Chem.* 254:3375-3381.
15. Novick, D. Et al, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:8483-8487.
16. Lomant, A.J. y Fairbanks, G., 1976, *J. Mol. Biol.* 104:243-261.
17. Hamada, H. Y Tsuruo, T. 1987, *Anal. Biochem.* 160:483-488.
18. Hashida, S. et al., 1984, *J. Applied Biochem.* 6:56-63.

94

Adicionalmente, métodos de enlace cruzado son analizados por Means y Feeney, 1990, *Bioconjugate Chem.* 1:2-12.

Las barreras que son atravesadas por los métodos y composiciones de la invención antes descritos, incluyen, pero no se limitan a la barrera sangre-cerebro, la barrera sangre-ojo, la barrera sangre-testículos, la barrera sangre-ovarios, la barrera sangre-corazón, la barrera sangre-riñón, y la barrera sangre-útero.

Moléculas candidatas para transporte a través de una barrera de células endoteliales incluyen, por ejemplo, hormonas, tales como hormona del crecimiento, factores neurotróficos, antibióticos, antivirales o antifúngicos, como los que normalmente se excluyen del cerebro y otros órganos con barreras, péptidos radiofarmacéuticos, fármacos antisentido, anticuerpos y antivirales contra agentes biológicamente activos, farmacéuticos y agentes anticancerígenos. Ejemplos no limitantes de dichas moléculas incluyen hormonas tales como hormona del crecimiento, factor de crecimiento de nervios (NGF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento transformador $\beta 1$ (TFG/ $\beta 1$), factor de crecimiento transformador $\beta 2$ (TFG/ $\beta 2$), factor de crecimiento transformador $\beta 3$ (TFG/ $\beta 3$), interleucina 1, interleucina 2, interleucina 3 e interleucina 6, AZT, anticuerpos contra factor de necrosis tumoral y agentes inmunodepresivos tales como ciclosporin. Adicionalmente, a la eritropoyetina o a una de las citoquinas protectoras de tejido de la presente invenciones les pueden fijar tintes o marcadores con el fin de visualizar células, tejidos u órganos dentro del cerebro y otros órganos con barreras para propósitos de diagnóstico. Como ejemplo, un marcador utilizado para visualizar placas dentro del cerebro se puede fijar a eritropoyetina o a una citoquina protectora de tejido con el fin de determinar el progreso del mal de Alzheimer en un paciente.

La presente invención también se dirige a una composición que comprenda una molécula que vaya a ser transportada por transcitosis a través de una barrera de uniones apretadas de células y una citoquina recombinante protectora de tejido como la que se describe arriba. La invención se dirige también al uso de un conjugado entre una molécula y una citoquina recombinante protectora de tejido como la ya descrita, para la preparación de una composición farmacéutica para la entrega de la molécula a través de una barrera como ya se dijo.

La presente invención se entenderá mejor haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, los cuales se presentan como ilustrativos de la invención.

95

6. EJEMPLOS

6.1 EJEMPLO 1: DISTRIBUCIÓN DE RECEPTOR DE ERITROPOYETINA EN EL CEREBRO HUMANO

Se fijó inmediatamente cerebro humano normal retirado durante procedimientos quirúrgicos (por Ej: para proveer márgenes libres de tumores en resecciones tumorales) en acroleína al 5% en tamponador de fosfato 0,1 M (pH 7,4) durante 3 horas. Se cortaron secciones con una microtoma vibradora a un espesor de 40 micrómetros. El manchado inmunohistoquímico se hizo utilizando secciones de flotación libre y el método indirecto de peroxidasa-antiperoxidasa de anticuerpos utilizando una dilución de 1:500 de antisuero del receptor de eritropoyetina (obtenido de Santa Cruz Biotechnology). La actividad de la peroxidasa endógena se extinguió mediante tratamiento de las secciones de tejido con peróxido de hidrógeno (3% en metanol durante 30 minutos). También se hicieron controles de tejido mediante omisión primaria de anticuerpos y utilizando el péptido de bloqueo (de Santa Cruz Biotech.) para confirmar que el manchado era específico para el receptor de eritropoyetina (EPO).

La Figura 1 muestra que los capilares del cerebro humano presenta niveles muy altos del receptor EPO, según se determinó mediante inmuno-histoquímica utilizando anticuerpos específicos de receptor anti-EPO. Esto provee un mecanismo mediante el cual EPO puede penetrar en el cerebro a partir de la circulación sistémica, a pesar de la barrera sanguínea del cerebro.

La Figura 2 muestra que el receptor EPO está localizado ampliamente dentro y alrededor de los capilares, formando la barrera cerebral en el cerebro humano.

Se ejecutó un protocolo similar al de las Figuras 1 y 2 para la Figura 3, salvo que se cortaran secciones de parafina de 10 micrómetros, las secciones incrustadas se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4%. La Figura 3 muestra que hay una alta densidad del receptor EPO en las superficies lumbinales y antilumbinales de las capilares del cerebro humano, formando la base anatómica para el transporte de EPO de la circulación al cerebro.

La Figura 4 se obtuvo siguiendo un protocolo similar al de la Figura 3 salvo que el tejido fue seccionado en una ultramicrotoma para la microscopía de electrones y se rotuló el anticuerpo secundario con partículas de oro coloidal. Esta figura muestra que el receptor EPO se encontró en la figura endotelial (*), dentro de las vesículas citoplasmáticas (flechas) y en efecto terminal del glial (+) en el cerebro humano, proporcionando la base anatómica para transporte de EPO desde dentro de la circulación al cerebro.

6.2 EJEMPLO 2: ERITROPOYETINA CRUZA LA BARRERA HERMÉTICA DE FLUIDO SANGUÍNEO-CEREBROESPINAL

Se anestesiaron ratas adultas machos Sprague-Dawley y se les administró eritropoyetina humana recombinante vía intraperitoneal a 5000 U/kg peso corporal. Se tomó una muestra del fluido cerebroespinal de cisterna magna a intervalos de 30 minutos por un período hasta de 4 horas y se determinó la concentración de eritropoyetina utilizando un inmunoensayo sensible y específico enlazado con enzima. Tal como se ilustra en la Figura 5, la concentración de eritropoyetina de línea base en CSF es de 8 mIU/ml. Luego de una demora de varias horas, los niveles de eritropoyetina medidos en el CSF comenzaron a subir y luego de 2,5 horas y más, son considerablemente diferentes al de la concentración de línea de base al nivel $p < 0.01$. El nivel pico de aproximadamente 100 mIU/ml está dentro del rango conocido por ejercer efectos protectores *in vitro* (0,1 a 100 mIU/ml). El tiempo pico ocurre a las 3,5 horas, lo cual retardó considerablemente los niveles de suero pico que ocurren en menos de 1 hora. Los resultados de este experimento muestran que se pueden lograr niveles significativos de eritropoyetina a través de una unión celular estrecha mediante administración parenteral en bolo de eritropoyetina a concentraciones adecuadas.

6.3 EJEMPLO 3: CITOQUINA RECOMBINANTE PROTECTORA DE TEJIDO

Se realizaron los siguientes constructores de eritropoyetina humana utilizando los siguientes procedimientos: Se clonó el cADN para la eritropoyetina humana mediante PCR del cerebro humano usando iniciadores basados en la secuencia del cADN humano publicado (número de acceso NM_000799). Los primeros fueron diseñados para introducir un sitio Xho I en la terminal 5' y un sitio Xba I en el terminal de 3' de cADN. Las primeras secuencias son:

HEPO-5-Xho I 5'-AGCTCTCGAGGCGCGGAGATGGGGGTGCACGAATG-3'
(SEQ. ID. 8)

HEPO-3-Xba I 5'-ATGCTCTAGACACACCTGGTCATCTGTCCCCTGTCC-3'
(SEQ. ID. 9).

Se clonó el producto de PCR entre los sitios Xho I y Xba I del vector de la expresión mamífera pCiNeo (Promega). Se secuenciaron los clones y se verificó la secuencia para emparejar la secuencia en NM_000799 con excepción de una sola base.

La secuencia de codificación de la base 418 (numeración iniciada a partir de ATG) de C en el sitio G, cambiando el aminoácido 140 de toda la secuencia de la longitud EPO que inicia en la primera metionina de Arg a Gly. Esto es, sin embargo, una variación

normal de la sucesión original y se presenta en la mayoría de las formas de eritropoyetina.

La secuencia de codificación a partir del cADN de eritropoyetina es la siguiente:

ATGGGGGTGCACGAATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTG
CTGTGCTCCCTCTGGGCCTCCCAGTCCTGGGCGCCCCACCACGCCTCATCT
GTGACAGCCGAGTCCTGGAGAGGTACCTCTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAGA
ATATCACGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAATATCACTGT
CCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGGATGGAGGTCGGGCAG
CAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTCGGAAGCTGTCCTGC
GGGGCCAGGCCCTGTTGGTCAACTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCCCTGCACTG
CATGTGGATAJLAGCCGTCAGTGGCCTTCGCAGCCTCACCCTCTGCTTCGGGC
TCTGGGAGCCCAGAAGGAAGCCATCTCCCCTCCAGATGCGGCCTCAGCTGCT
CCACTCCGAACAATCACTGCTGACACTTTCGCAAACCTCTTCGAGTCTACTCC
AATTTCTCCGGGGAAAGCTGAAGCTGTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAG
GGGACAGATGA (SEQ ID NO: 7).

Los códigos de cADN para la secuencia de aminoácido en su longitud total de eritropoyetina, son los siguientes:

MGVHECPAWLWLLSLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAEN
I
TTGCAEHCSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAQVEVWQGLALLSEAVLRG
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRT
ITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGBACRTGDR (SEQ ID NO: 10).

Los primeros 27 residuos del aminoácido de SEQ ID NO: 10 forman la secuencia principal.

Luego de introducir 6xHis en la terminal-C de la proteína humana EPO se diseñó un nuevo oligonucleótido para que las 6 histidinas se unieran al Asp 192 en la secuencia total, utilizando el siguiente oligonucleótido:

3'-6xms- bEPO 5'

GGTCTAGATCAATGGTGATGGTGATGATGGTCCCCTGTCCTGCAGGCG-3'(SEQ ID NO:134)

Se amplificó el cADN del EPO por PCR utilizando el oligo marcado HEPO-5-Xho I y 6xHis y se clonaron entre los sitios oligo Xho I y Xba I en el vector de expresión mamífera de pCiNeo. Se secuenció nuevamente el inserto y la secuencia se verificó.

Las muteínas descritas en la sección 5.2 de la secuencia humana cADN de EPO con una terminal-C 6xHis, se introdujeron por oligo utilizando mutagénesis dirigida usando los oligonucleótidos descritos en esta sección. Los clones mutantes fueron secuenciados para confirmar las muteínas.

Para la invención se utilizaron varios métodos de purificación de citoquinas recombinante protectoras del tejido, incluido, pero no limitado al siguiente protocolo que se usó junto con las citoquinas protectoras de tejido de la invención, expresadas de manera recombinante y marcadas con histidina. El sobrenadante de las células recombinantes (CHO-K1) (por ej: resina de (Ni-CAM HC RESIN: matriz de Afinidad Niquel Quelato De Alta Capacidad de Sigma, Cat no. N 3158)) se resuspendió completamente resuspendido con una inversión suave. Luego se agregaron 100µl de la suspensión de la resina (equivalente a 50µl de resina condensada), a un tubo microcentrifugado (tamaño, 1,7 ml). Se centrifugó la mezcla a 8,000 rpm a 4 °C durante 5 minutos para dar forma de píldora a la resina y se desechó el sobrenadante. El microcentrifugado se hizo con un Megafuge 1.0R (Heraeus Instruments). La mezcla se lavó dos veces con 1 ml de agua ionizada (0.2µm filtrado) para remover el etanol. La resina se suspendió en 500µl de tamponador de equilibrio (50mM de fosfato de sodio, pH 8,0, 0,3M NaCl, 10mM imidazol), y luego se transfirió la mezcla a un tubo cónico de 50ml. El tubo de centrifugado se lavó con 500µl de tamponador de equilibrio, y esto se agregó a la mezcla en un tubo cónico de 50ml. La mezcla se centrifugó a 3,000 rpm, a 4 °C durante 5 minutos para dar forma de píldora a la resina. El sobrenadante se removió y descartó. Las muestras fueron centrifugadas (sobrenadante CHO-K1) a 3,800rpm a 4°C antes de enlazar durante 5 minutos. Se adicionaron las células sobrenadantes a la resina. El tamponador de adición de la muestra la muestra (50mM fosfato de sodio, pH 8.0, 3M NaCl, 100mM imidazol) se adicionó a 1X, y se mezcló suavemente en una plataforma giratoria durante 1 hora a 4 °C. Un ejemplo de dicha plataforma utilizada es el Nutator (plataforma giratoria) (Clay Adams). La mezcla se centrifugó a 3,000 rpm, a 4 °C durante 5 minutos. El sobrenadante se removió y se reservó para los análisis SDS-PAGE y ELISA (sin enlazar). La resina se resuspendió en 500µl de tamponador lavado y la mezcla se transfirió a un tubo microcentrifugo. El tubo cónico de 50ml se enjuagó con 500µl de tamponador de equilibrio, luego, esta cantidad se agregó a la mezcla del tubo microcentrifugo. La suspensión de la resina luego se mezcló en una plataforma giratoria durante 10 minutos a 4 °C. La suspensión se centrifugó a 8,000 rpm, a 4 °C durante 5 minutos (el primer lavado puede reservarse para ELISA). La resina se resuspendió en 1 ml de tamponador lavado y la suspensión de resina se mezcló nuevamente en una plataforma giratoria durante 10 minutos a 4°C con el fin de lavar la resina una vez más. El lavado se descartó. Luego se adicionaron 75µl de tamponador de elusión (50mM de fosfato de sodio, pH 8.0, 0,3M NaCl, 500mM imidazol). La resina se mezcló en una

plataforma giratoria durante 10 minutos a 4°C. La mezcla se centrifugó a 8,000 rpm, a 4°C durante 5 minutos. El sobrenadante se retiró y se reservó. La proteína marcada con histidina se encontró en esta fracción. Para eluir más proteína se adicionaron nuevamente 75 µl de tamponador de elución (50mM fosfato de sodio, pH 8.0, 0.3M NaCl, 500mM imidazol). La resina se mezcló nuevamente en una plataforma giratoria durante 10 minutos a 4°C. La mezcla se centrifugó nuevamente a 8,000 rpm, a 4 °C durante 5 minutos. Las fracciones eluidas se reservaron en un solo grupo o en fracciones separadas.

Alternativamente se usó el siguiente procedimiento para aislar las citoquinas purificadas marcadas con histidina. Los medios condicionados fueron recolectados y filtrados a través de un filtro de 0,45 µm. En seguida se aplicó una alícuota de 50ml a un quelante HiTrap de 5ml (Amersham biosciences) equilibrado con 20mM de fosfato de sodio, con un pH de 7,4 y se activó con 2.5 ml de 100 mM de NiSO₄. La columna se lavó con 20mM de fosfato de sodio, pH 7,4 y se eluyó con un gradiente de 0 M a 0,5 M de imidazol en 20mM de fosfato de sodio, pH 7,4 sobre volúmenes de 25 columnas. El flujo fue de 5 ml/min y el tamaño de la fracción de 5 ml.

Se analizaron las fracciones para determinar la presencia de citoquina recombinante protectora de tejido mediante análisis SDS-PAGE y EPO ELISA. Las fracciones positivas se agruparon y se dializaron contra 10 mM Tris, pH 7,0. El grupo se aplicó a 1ml de HiTrap Q HP (Amersham biosciences) equilibrado con 10 mM Tris, pH 7,0. Luego de lavar la muestra con el tamponador de equilibrio se eluyó con un gradiente de NaCl a 0.5 M sobre volúmenes de 10 columnas con un flujo de 1 ml/min. Se recolectaron y analizaron fracciones de 1ml mediante análisis SDS-PAGE, EPO ELISA y secado Western utilizando anticuerpos contra hexa-his (Anti-His₆, ROCHE). Se agruparon fracciones que contenían citoquinas recombinantes protectoras de tejido y se concentraron utilizando centricon con un tamaño de corte de 10 kDa (Amicon) para obtener un volumen final de 1-2 ml.

El grupo final de la citoquina protectora recombinante de tejido se analizó por SDS-PAGE (NuPage 4-12%; Invitrogen), se visualizó utilizando azul NOVEX Colloidal (Invitrogen) mediante el protocolo recomendado por el fabricante. La pureza de la citoquina recombinante protectora de tejido se dedujo del gel resultante. Solo una banda correspondiente a la citoquina recombinante protectora de tejido glicosilada estuvo presente en cada carril de gel, indicando una alta pureza de la citoquina aislada.

Todos los plásmidos se transfectaron a las células CHO-1 o a las células COS-7 utilizando lipofectamina. Se recolectaron varios medios de transfección de las células luego de 48 a 72 horas. Se probó EPO a estos medios con la prueba ELISA y se usó directamente o después de la prueba neuronal o hematopoyética.

Las mutaciones K45D, S100B, y A30N/H32T para la secuencia cADN de EPO humana se introdujo por mutagénesis dirigida por oligo utilizando los oligonucleótidos:

HEPO-S100E-alto 5'-
CATGTGGATAAAGCCGTCGAGGGCCTTCGCAGCCTCACCACTCTG-3' (SEQ ID NO: 11)

HEPO-S100E-bajo 5'-
CAGAGTGGTGAGGCTGCGAAGGCCCTCGACGGCTTATCCACATG-3' (SEQ ID NO: 12)

HEPO-K45D-alto 5'-
GAGAA T ATCACTGTCCCAGACACCGACGTT AA TTTCTA TGCCTGG-3' (SEQ ID NO: 13)

HEPO-K45D-bajo 5'-
CCAGGCATAGAAATTAACGTCGGTGTCTGGGACAGTGATATTCTC-3' (SEQ ID NO: 14)

HEPO-A30N/H32T-alto 5'-
GAATATCACGACGGGCTGTAATGAAACCTGCAGCTTGAATGAG-3' (SEQ ID NO: 132)

HEPO-A30N/H32T-bajo 5'-
CTCATICAAGCTGCAGGTTTCATACAGCCCGTCGTGATÁTTTC-3' (SEQ ID NO: 133)

Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas directamente en oligo mutagénesis para otra muteína de eritroyetina y citoquina recombinante protectora de tejido de la invención, incluyen:

Para muteína R150E
R150E-F GTCTACTCCAATTTCTCGAGGGAAAGCTGAAGCTG, (SEQ ID NO: 120)
R150E-R GCTTCAGCTTTCCCTCGAGGAAATTGGAGTAGAC (SEQ ID NO: 121)

Para muteína R103E:
R103E-F CCGTCAGTGGCCTTGAGAGCCTCACCACTCTG, (SEQ ID NO: 122)

R103E-R CAGAGTGGTGAGGCTCTCAAGGCCACTGACGG (SEQ ID NO:

123)

Para mutelinas combinadas R103E/L108S(103):

R103E-F CCGTCAGTGGCCTTGAGAGCCTCACCCTCTG (SEQ ID NO:

124)

R103E-R CAGAGTGGTGAGGCTCTCAAGGCCACTGACGG (SEQ ID NO:

125)

L108S(103)F CGCAGCCTCACCCTTCGCTTCGGGCTCTGG, (SEQ ID NO:

126)

L108S(103)R CCAGAGCCCGAAGCGAAGTGGTGAGGCGCG (SEQ ID NO:

127)

Para supresión 44-49

d44-49F GAATATCACTGTCCCAGACGGTGGTGCCTGGAAGAGGAT_ (SEQ ID NO: 128)

d44-49R CATCCTCTTCCAGGCACCACCGTCTGGGACAGTGA T A TIC (SEQ ID NO: 129)

Para mutelina K20A:

K20A-F TACCTCTTGGAGGCCGCGGAGGCCGAGAATATC. (SEQ ID NO:

130)

K20A-R GATATTCGCGCCTCCGCGGCCTCCAAGAGGTA (SEQ ID NO:

131)

Para mutelina K140A:

K140A-F GCTGACAC1TICCGCGCACCTTCCGAGTCf ACTC, (SEQ ID NO:

132)

K140A-R GAGTAGACTCGGAAGAGTGCGCGGAAAGTGTCAGC (SEQ ID NO: 133)

Para mutelina K152A:

K152A-F ATTTCTCCGGGGAGCGCTGAAGCTGTACACAG, (SEQ ID NO:

134)

K152A-R CTGTGTACAGCTTCAGCGCTCCCCGGAGGAAAT (SEQ ID NO:

135)

Para muteína K154A:

K154A-F CTCCGGGGAAAGCTGGCGCTGTACACAGGGGA, (SEQ ID NO:
136)

K154A-R TCCCCTGTGTACAGCGCCAGCTTTCCCCGGAG (SEQ ID NO:
137)

Para muteína K45A:

K45A-F ACTGTCCCAGACACCGCAGTTAATITCTATGCCTG, (SEQ ID NO:
138)

K45A-R CAGGCATAGAAATTAACIGCGGTGTCTGGGACAGT (SEQ ID.
NO: 139)

Para muteína K52A:

K52A-F AGTIAATTTCTATGCCTGGGCGAGGATGGAGGTCG, (SEQ ID NO:
140)

K52A-R CGACCTCCATCCTCGCCCAGGCATAGAAATIAACT (SEQ ID NO:
141)

Para muteína K97A:

K97A-F TGCAGCTGCATGTGGATGCAGCCGTCAGTGGCC, (SEQ ID NO:
142)

K97A-R GGCCACTGACGGCTGCATCCACATGCAGCTGCA (SEQ ID NO:
143)

Para muteína K116A:

K116A-F CRCTGGGAGCCCAGGCGGAAGCCATCTCCCCT, (SEQ ID NO:
144)

K116A-R AGGGGAGATGGCTTCCGCCTGGGCTCCCAGAG (SEQ ID NO:
145)

Para combinación de muteínas K140NK52A:

K140A-F GCTGACACTTTCCGCGCACTCTTCCGAGTCTACTC; (SEQ ID
NO: 146)

K140A-R GAGTAGACTCGGAAGAGTGCGCGGAAAGTGTCAGC (SEQ ID

NO: 147)

K52A-F AGTTAATTTCTATGCCTGGGCGAGGATGGAGGTCG, (SEQ ID

NO: 148)

K52A-R CGACCTCCATCCTCGCCCAGGCATAGAAATTA ACT (SEQ ID NO:
149)

Para combinación de mutéínas K140A/K52AJK45A:

KI40A-F GCTGACACITTCGCGCACTCTICCGAGTCTACTC, (SEQ ID NO:
150)

K140A-R GAGTAGACTCGGAAGAGTGCGCGGAAAGTGT CAGC (SEQ ID
NO: 151)

K52A-F AGTTAATTTCTATGCCTGGGCGAGGATGGAGGTCG, (SEQ ID NO:
152)

K52A-R CGACCTCCATCCTCGCCCAGGCATAGAAATTA ACT (SEQ ID NO:
153)

K45A-F ACTGTCCCAGACACCGCAGTTAATTTCTATGCCTG, (SEQ ID NO:
154)

K45A-R CAGGCATAGAAATTA ACTGCGGTGTCTGGGACAGT (SEQ ID NO:
155)

Para combinación de mutéínas K97A1K152A:

K97 A-F TGCAGCTGCATGTGGATGCAGCCGTCAGTGGCC, (SEQ ID NO: 156)

K97A-R GGCCACTGACGGCTGCATCCACATGCAGCTGCA (SEQ ID NO: 157)

K152A-F ATTTCTCCGGGGAGCGCTGAAGCTGTACACAG. (SEQ ID NO: 158)

K152A-R CTGTGTACAQCTTCAGCGCTCCCCGGAGGAAAT (SEQ ID NO:
159)

Para combinación de mutéínas K97A1K152A/K45A:

K97A-F TGCAGCTGCATGTGGATGCAGCCGTCAGTGGCC, (SEQ ID NO: 160)

K97A-R GGCCACTGACGGCTGCATCCACATGCAGCTGCA (SEQ ID NO: 161)

K152A-F ATTTCTCCGGGGAGCGCTGAAGCTGTACACAG, (SEQ ID NO:
162)

K152A-R C fGTGTACAGCTTCAGCGCTCCCCGGAGGAAAT (SEQ ID NO: 163)

K45A-F ACTGTCCCAGACACCGCAGTTAATTTCTATGCCTG, (SEQ ID NO:

104

164)

K45A-R CAGGCATAGAAATTAAGTGCAGGTGTCTGGGACAGT (SEQ ID NO:

165)

Para combinación de mutélnas K97 AJK152A/K45A/K52A:

K97A-F TGCAGCTGCATGTGGATGCAGCCGTCAGTGGCC, (SEQ ID NO: 166)

K97 A-R GGCCACTGACGGCTGCATCCACA TGCAGCTGCA (SEQ ID NO: 167)

K152A-F ATITCCTCCGGGGAGCGCTGAAGCTGTACACAG, (SEQ ID NO: 168)

K152A-R CTGTGTACAGCTICAGCGCTCCCCGGAGGAAAT (SEQ ID NO: 169)

K45A-F ACTGTCCCAGACACCGCAGTTAATITCTATGCCTG, (SEQ ID NO: 170)

K45A-R CAGGCATAGAAATTAAGTGCAGGTGTCTGGGACAGT (SEQ ID NO: 171)

K52A-F AGITAATTTCTATGCCTGGGCGAGGATGGAGGTCG, (SEQ ID NO: 172)

K52A-R CGACCTCCATCCTCGCCCAGGCATAGAAATTAAGT (SEQ ID NO: 173)

Para combinación de mutélnas K97A1K152A1K45NK52A/K140A:

K97 A-F TGCAGCTGCATGTGGATGCAGCCGTCAGTGGCC, (SEQ ID NO: 174)

K97A-R GGCCACTGACGGCTGCATCCACATGCAGCTGCA (SEQ ID NO: 175)

K152A-F ATITCCTCCGGGGAGCGCTGAAGCTGTACACAG, (SEQ ID NO: 176)

K152A-R CTGTGTACAGCITCAGCGCTCCCCGGAGGAAAT (SEQ ID NO: 177)

K45A-F ACTGTCCCAGACACCGCAGTTAATTTCTATGCCTG, (SEQ ID NO: 178)

K45A-R CAGGCATAGAAATTAAGTGCAGGTGTCTGGGACAGT (SEQ ID NO: 179)

K52A-F AGTTAATTTCTATGCCTGGGCGAGGATGGAGGTCG, (SEQ ID NO: 180)

105
K52A-R CGACCTCCATCCTCGCCCAGGCATAGAAA TT AACT (SEQ ID NO: 181)

K140A- F GCTGACACTITCCGCGCACTCTCCGAGTCT ACTC, (SEQ ID NO: 182)

K140A-R GAGTAGACTCGOAAGAGTGCGCGGAAAGTGTCAGC (SEQ ID NO: 183)

Para combinación de muteínas K97 A/K152A/K45A/K52A/K140A/K154A:

K97 A-F TGCAGCTGCA TGTGGA TGCAGCCGTCAGTGGCC, (SEQ ID NO: 184)

K97A-R GGCCACTGACGGCTGCATCCACATGCAGCTGCA (SEQ ID NO: 185)

K152A-F ATTCCTCCGGGGAGCGCTGAAGCTGTACACAG, (SEQ ID NO: 186)

K152A-R CTGTGTACAGCTTCAGCGCTCCCCGGAGGAAAT (SEQ ID NO: 187)

K45A-F ACTGTCCCAGACACCGCAGTTAATTCTATGCCTG, (SEQ ID NO: 188)

K45A-R CAGGCATAGAAATTAAGTGCAGTGTCTGG8ACAGT (SEQ ID NO: 189)

K52A-F AGTIAATTTCTATGCCTGGGCGAGGATGGAGGTCG, (SEQ ID NO: 190)

52A-R CGACCTCCATCCTCGCCCAGGCATAGAAATTAAGT (SEQ ID NO: 191)

K140A-F GCTGACACTTTCCGCGCACTCTICCGAGTCTACTC, (SEQ ID NO: 192)

K140A-R GAGTAGACTCGGAAGAGTGCGCGGAAAGTGTCAGC (SEQ ID NO: 193)

K154A(152)F CTCCGGGGAGCGCTGGCGCTGTACACAGGGGA, (SEQ ID NO: 194)

154(152)R TCCCCTGTGTACAGCGCCAGCGCTCCCCGGAG (SEQ ID NO: 195)

Combinación de muteínas N24K1N38K/N83K:

N24K-F CAAGGAGGCCGAGAAAATCACGACGGGCTGT, (SEQ ID NO: 196)

N24K-R ACAGCCCGTCGTGATTTTCTCGGCCTCCITG (SEQ ID NO: 197)

N38K-F ACTGCAGCTTGAATGAGAAAATCACTGTCCCAGACAC, (SEQ ID NO: 198)

N38K-R GTGTCTGGGACAGTGATTTTCTCATICAAGCTGCAGT (SEQ ID NO: 199)

N83K-F AGGCCCTGTTGGTCAAATCTTCCCAGCCGTG, (SEQ ID NO: 200)

N83K-R CACGGCTGGGAAGATTGACCAACAGGGCCT (SEQ ID NO: 201)

Para mutéínas K152W:

K152W-F ATTCCTCCGGGGATGGCTGAAGCTGTACACAG, (SEQ ID NO: 202)

K152W-R CTGTGTACAGCTTCAGCCATCCCCGGAGGAAAT (SEQ ID NO: 203)

Combinación de mutéínas R14A/Y15A:

RY14AA-F AGCCGAGTCCTGGAGGCGGCCCTCTTGGAGGCCAA. (SEQ ID NO: 204)

RY14AA-R TTGGCCTCCAAGAGGGCCGCCTCCAGGACTCGGCT (SEQ ID NO: 205)

Y15A-F AGCCGAGTCCTGGAGAGGGCCCTCTTGGAGGCCAA (SEQ ID NO: 206)

Y15A-R TTGGCCTCCAAGAGGGCCCTCTCCAGGACTCGGCT (SEQ ID NO: 207)

Los siguientes son ejemplos de construcciones que se hicieron: secuencia de EPO(hEPO) marcada 6xHis pCiNeo humana (SEQ ID NO: 208); hEPO marcada 6xHis-A30N/H32T-pCiNeo (SEQ ID NO: 209); hEPO marcada -6xHis-K45D-pCiNeo secuencia (SEQ ID NO: 210; hEPO marcada -6xHis-S100E-pCiNeo secuencia (SEQ ID NO: 211); y hEPO marcada -6xHis K45D/S100E-pCiNeo secuencia (SEQ ID NO: 212). El vector de expresión mamífero pCI-neo lleva la región realzador/promotor inmediato-temprano de citomegalovirus humano (CMV) para promover la expresión constitutiva de insertos ADN clonados en células mamíferas.

Estos oligonucleótidos fueron templados al clon cADN de la eritropoyetina humana original en pCiNeo para introducir las mutaciones. Las clones mutantes fueron secuenciados para confirmar las mutaciones. Todos los plásmidos fueron transfectados a células CHO-1 o a células COS-7 por medio de lipofetamina. Se recogieron medios de las células 48 a 72 horas posteriores a la transfección. Se robó Epo a este medio utilizando la prueba ELISA y se usó directamente o después de la purificación en la

prueba neuronal o en la prueba hematopoyética.

Posteriormente, las citoquinas recombinantes protectoras de tejido K45D y S100E se analizaron en una prueba neuronal. Específicamente, se utilizó una prueba de neuroprotección *in vitro* utilizando células neuroblastomas. Las células SK-N-SH se colocaron en placas de 24 pozos a una densidad de 40,000-células/pozo durante 24 horas. Se agregó a la citoquina recombinante protectora de tejido una concentración de 3 mM durante otras 24 horas (eritropoyetina = preparación comercial; EPO = eritropoyetina y citoquina recombinante protectora de tejido presentada en células CHO; vector libre = sobrenadante de células CHO de células transfectadas con vector sin constructor EPO). Luego de esta preincubación las células fueron expuestas a rotenona (5 μ M) durante 4 horas, se lavaron y se dejaron recuperar durante 24 horas. Las variantes EPO indicadas estuvieron presentes durante todos los pasos. Al final del experimento la viabilidad celular se cuantificó por incubación de células con colorante de tetrazolio WST-1 (de acuerdo a las instrucciones del fabricante: Roche # 1644807) durante 2 horas, y se indicó la viabilidad como lectura de absorbancia.

Las Figuras 6A y 6B indican los resultados de la prueba de neuroprotección de las células neuroblastomas SK-N-SH (contra rotenona) para eritropoyetina, así como para las citoquinas recombinantes protectoras de tejido con las citoquinas recombinantes protectoras de tejido K45D y S100E. El eje (y) en la gráfica indica las lecturas de absorbancia, y los datos son el promedio $\pm$ del rango de las determinaciones duplicadas. La gráfica de la Figura 6A indica claramente que la viabilidad de las células dentro de las muestras K45D y S100E mantuvieron la viabilidad demostrando su efecto protector celular. La Figura 6B presenta el mapa del plásmido de la hEPO marcada -6xHis PCiNeo.

6.4. EJEMPLO 4: CITOQUINAS PROTECTORAS DE TEJIDO

Las citoquinas recombinantes protectoras de tejidos aconsejables para los usos descritos pueden ser modificadas además por desialación, guanidinación, carbamilación, amidinación, trinitrofenilación, acetilación, succinilación, nitración, o modificación de residuos de arginina o grupos de carboxilos, entre otros procedimientos. Alternativamente estas modificaciones pueden hacerse con eritropoyetina nativa o con un derivado de eritropoyetina, incluida pero no limitada a, la eritropoyetina desialada, guanidinada, carbamilada, amidinada, trinitrofenilada, acetilada y nitrada, antes de su mutación en las citoquinas recombinantes protectoras de tejidos. A continuación se describen algunos ejemplos de otras modificaciones de la citoquinas recombinantes protectoras de tejido. Una persona normalmente versada en la materia entendería que los procedimientos descritos a continuación podrían utilizarse también para modificar químicamente la eritropoyetina nativa o sus derivados antes de introducir mutaciones

para generar citoquinas recombinantes protectoras de tejido.

6.4.1. Desalilación de la citoquina recombinante protectora de tejido.

Las citoquinas recombinantes protectoras de tejido pueden ser desaliladas mediante el siguiente procedimiento de muestra. Se obtuvo sialidasa (aislada de *Streptococcus* sp 6646K) de SEIKAGAKU AMERICA (Código No. 120050). La citoquina recombinante protectora de tejido se somete a desalilación por sialidasa (0,025 U/mg EPO) a 37 °C durante 3 horas. La mezcla de reacción se desaliniza y concentra utilizando un filtro de centrifugado Ultrafree. Se aplica la muestra a una columna de intercambio de iones del sistema AKTAPrime™. La proteína se eluye con los tamponadores seleccionados. Haga el análisis de gel IEF de las fracciones eluidas que contengan una cantidad significativa de proteína. Agrupe las fracciones que contengan solo las 2 bandas superiores (migrando a pI ~ 8,5 y ~ 7,9 en gel IEF). Determine el contenido de proteína y adicione 1/9 volúmenes por 10 x de solución salina (1M NaCl, 0,2M de citrato de sodio, 3mM de ácido cítrico). Determine el contenido de ácido siálico. No se detecta un contenido siálico importante.

La asialoeritropoyetina fue tan efectiva como la eritropoyetina nativa en las células neurales *in vitro* tal como se muestra en las Figuras 7-8. Las pruebas *in-vitro* se hicieron usando células carcinomas embrionarias (P 19) tipo neural, sometidas a apoptosis luego de retirar el suero. Se agregó eritropoyetina o eritropoyetina modificada 24 horas antes de remover el suero a los cultivos 1-1000 mg/ml. Se removió el medio al siguiente día, las células se lavaron con un medio no-sérico fresco, y con un medio que contenía la sustancia de prueba (no sérica) se adicionó nuevamente a los cultivos por otras 48 horas. Con el fin de determinar el número de células viables se hizo la prueba de reducción del tetrazolio (CellTiter 96; Promega, Inc.). Tal como lo muestran las Figuras 7-8 la asialoeritropoyetina parece tener una potencia igual a la de la eritropoyetina previniendo la muerte celular.

Se confirmó la retención neuroprotectora de la actividad *in vivo* usando como modelo una rata con isquemia focal en la cual la lesión reversible en el territorio de la arteria media cerebral se hizo tal como se describió anteriormente (Brines *et al.*, 2000, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.97:10526-31). Se administró asialoeritropoyetina o eritropoyetina (5000 U/kgBW vía intraperitoneal) o un vehículo al comienzo de la oclusión arterial a ratas macho adultas Sprague-Dawley. Los animales fueron sacrificados 24 horas después y se removieron sus cerebros para estudio. Se cortaron secciones seriadas, tinturándolas con sales de tetrazolio con el fin de identificar las regiones vivas del cerebro. Tal como se muestra en la Figura 9, la asialoeritropoyetina es tan eficaz como la eritropoyetina nativa para proveer neuroprotección, es decir, reduce el volumen de infarto a partir de una hora de la isquemia. La Figura 10 presenta los resultados de otro modelo de isquemia focal en el que se hizo una respuesta de dosis comparativa con

eritropoyetina y asialoeritropoyetina. A la dosis más baja de 4µg/kg de asialoeritropoyetina alcanzó protección mientras que la eritropoyetina no modificada no lo haría. El número de ratas de cada grupo, n, fue mayor o igual a 4.

Resultados similares se esperarían de la asialo citoquina recombinante protectora de tejido de la presente invención.

6.4.2. Carbamilación de la Citoquina Recombinante Protectora de Tejido.

La citoquina recombinante protectora de tejido puede ser utilizada para preparar las moléculas carbamiladas respectivas, de acuerdo con el siguiente procedimiento descrito en Jin Zeng (1991). Modificación de lisina con metalotionina por carbamilación y guanidinación. *Methods in Enzymology* 205: 433-437 Recristalice el cianato de potasio. Prepare 1M de tamponador de borato (pH 8,8). Mezcle una solución de citoquina recombinante protectora de tejido con un volumen igual de tamponador de borato. Agregue de cianato de potasio directamente al tubo de reacción a una concentración final de 0,5M. Mezcle bien e incube a 37°C durante 6 a 16 horas. Dialice completamente. Retire el producto del tubo de diálisis y recoja en un tubo. Mida el volumen y adicione un 1/9 volumen de solución salina 10 X (1M NaCl, 0,2M de citrato de sodio, 3 mM de ácido cítrico). Determine el contenido de proteína y calcule la tasa de recuperación del producto. Analice los productos utilizando gel IEF seguido por una prueba *in vitro* con células TF-1.

6.4.3. Succinilación de la Citoquina Recombinante Protectora de Tejido.

La citoquina recombinante protectora de tejido puede utilizarse para preparar las respectivas moléculas succiniladas, de acuerdo al siguiente procedimiento descrito en Alcalde *et al.* (2001). La succinilación de ciclo dextrina glicosiltransferasa de *thermoanaerobacter* sp. 501 mejora su actividad de transferasa usando almidón como donante. *J. Biotechnology* 86: 71-80. Se incubó citoquina recombinante protectora de tejido (100 µg) en 0,5 M de NaHCO₃ (pH 8,0) con un exceso molar 15 de anhídrido succínico a 15°C durante 1 hora. La reacción se detuvo por diálisis contra agua destilada.

Disuelva anhídrido succínico en 27 mg/ml de acetona seca. Prepare la reacción en un tubo Eppendorf en 10 mM de tamponador de fosfato de sodio (pH 8.0). Adicione al tubo proteína de citoquina recombinante protectora de tejido y 50 veces anhídrido succínico molar. Mezcle bien y rote el tubo a 4 °C durante 1 hora. Detenga la reacción por diálisis contra 10 mM de tamponador de fosfato de sodio, utilizando el casete de diálisis (Slide-A-Laze 7K., Pierce 66373). Retire el producto del casete de diálisis y recoja en un tubo. Mida el volumen y adicione un 1/9 volumen de solución salina 10 X (1M NaCl , 0,2M de citrato de sodio, 3 mM de ácido cítrico). Determine el contenido de proteína y calcule la tasa de recuperación del producto. Analice los productos utilizando

110
gel IEF seguido por una prueba *in vitro* con células TF-1

6.4.4. Acetilación de la Citoquina Recombinante Protectora de Tejido.

La citoquina recombinante protectora de tejido puede ser utilizada para preparar la respectiva molécula acetilada, de acuerdo con el siguiente procedimiento descrito en Satake *et al* (1990). *Chemical modification of erythropoietin: an increase in in vitro activity by guanidination*. Biochimica et Biophysica Acta. 1038: 125-129.

Haga la reacción en un tubo Eppendorf en 80 mM de tamponador de fosfato de sodio (pH 7,2). Agregue citoquina recombinante protectora de tejido y un volumen molar igual de anhídrido acético. Mezcle bien e incube en hielo durante 1 hora. Detenga la reacción por diálisis contra agua utilizando el casete de diálisis (Slide-A-Laze 7K, Pierce 66373). Retire el producto del casete de diálisis y recoja en un tubo fresco. Mida el volumen y adicione 1/9 volumen de solución salina 10 X (1 M NaCl, 0,2M de citrato de sodio, 3 mM de ácido cítrico).

Determine el contenido de proteína y calcule la tasa de recuperación del producto. Analice los productos utilizando gel IEF seguido por una prueba *in vitro* con células TF-1

6.4.5. Carboximetilación de Lisina de la Citoquina Recombinante Protectora de Tejido.

La citoquina recombinante protectora de tejido puede utilizarse para preparar las respectivas moléculas modificadas de N-(carboximetil) lisina (CML) en donde uno o más residuos de lisil de la citoquina recombinante protectora de tejido puede ser modificado de acuerdo con el siguiente procedimiento descrito en Akhtar *et al* (1999) *Conformational study of N-(carboximethyl)lysine adducts of recombinant α -crystallins*. *Current Eye Research*, 18: 270-276.

Prepare 200 mM de ácido glioxílico y 120 mM de NaBH₃CN en de tamponador de fosfato de sodio (50 mM, pH 7,5). Adicione en un tubo Eppendorf, citoquina recombinante protectora de tejido (en tamponador de fosfato); calcule la lisina equivalente en la solución (aproximadamente 8 residuos de lisina/mol). Adicione al tubo 3-veces más de NaBH₃CN y 5 o 10-veces más de ácido glioxílico. Agite cada tubo e incube a 37 °C durante 5 horas. Dialice las muestras contra tamponador de fosfato en la noche a 4 °C. Mida la cantidad de cada producto después de la diálisis. Determine la concentración de proteína y calcule la proporción de recuperación del producto. Analice los productos utilizando gel IEF seguido por una prueba *in vitro* con células TF-1

6.4.6. Ionización de la Citoquina Recombinante Protectora de Tejido.

La citoquina recombinante protectora de tejido puede utilizarse para preparar la respectiva molécula iodinizada de acuerdo con el siguiente procedimiento descrito en

instrucción proporcionada por Pierce Chemical Company (Rockford, IL) para Tubos de iodación IODO-Gen Pre-Coated (producto # 28601).

Prepare 0,1 M de NaI y haga la iodización en un tubo de iodación IODO-Gen Pre-Coated (Pierce, 28601), con un volumen de reacción total de 0.1 ml/tubo en tamponador de fosfato de sodio (40 mM, pH 7.4). Mezcle el sustrato de proteína (citoquina recombinante protectora de tejido) con tamponador de fosfato de sodio y transfiera la mezcla a un tubo de iodación IODO-Gen Pre-Coated. Agregue NaI a la concentración final de 1-2 mM, produciendo una relación molar de proteína NaI entre 14-20. Mezcle bien e incube a temperatura ambiente durante 15 minutos agitando suavemente. Detenga la reacción removiendo la mezcla y adicione a un tubo que contenga 3.9 ml de tamponador de sodio (es decir, una dilución de 40 veces). Concentre el producto en un filtro prehumedecido de centrifugado de unidad de centrifugado Ultrafree. Mida el volumen de concentrado y adicione 1/9 de volumen a solución salina 10 X (1M NaCl, 0,2 M de citrato de sodio, 3 mM de ácido cítrico). Determine la concentración de proteína y calcule la tasa de recuperación del producto. Analice los productos utilizando gel IEF seguido por una prueba *in vitro* con células TF-1.

Alternativamente, la citoquina recombinante protectora de tejido puede ser ionizada mediante el siguiente procedimiento. Se incubó una parte de Yodo (Pierce, Rockford, TI) en 100 µl PBS (20mM de fosfato de sodio, 0,15M de NaCl, pH7,5) que contenía 1mCi libre de NaI²⁵¹ durante 5 minutos. Se adicionaron a la mezcla 100 microgramos de citoquina recombinante protectora de tejido en 100 µl PDS. Luego de diez minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se detuvo removiendo la solución de 200 µl del recipiente de reacción (dejando atrás la parte de yodo). Se retiró el exceso de yodo por filtración de gel en una columna Centricon 10. Tal como se muestra en la Figura 11, la iodo-erotropoyetina producida de esta manera es eficaz para la protección de las células P19 contra retiro del suero. Una persona versada en la materia, reconocería resultados similares esperados de la iodación en la citoquina recombinante protectora de tejido encontrada en la presente invención.

A continuación se describe otro método de ionización de la citoquina recombinante protectora de tejido. Se adicionaron 100 microgramos de citoquina recombinante protectora de tejido en 100 µl PBS a 500 uCi NaI²⁵¹ y se mezclaron ambos en un tubo Eppendorf. Se adicionaron 25 microlitros de cloraminas T (2 mg/ml) a la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se adicionaron 50 microlitros de tamponador de detección de cloramina T (2,4 mg/ml metabisulfito de sodio, 10 mg/ml tirosina, 10% de glicerol, 0.1 % de xileno) en PBS. La yodotirosina y la citoquina recombinante protectora de tejido ionizada se separaron mediante filtración de gel en una columna Centricon 10.

6.4.7. Biotinilización de la Citoquina Recombinante Protectora de Tejido.

La citoquina recombinante protectora de tejido puede utilizarse para preparar moléculas biotinizadas, de acuerdo con el siguiente procedimiento en donde se describe la instrucción dada por Pierce Chemical Company (Rockford, Il.) por EZ-Link NHS-LC-Biotina (producto # 21336).

Disuelva EZ-Link NHS-LC-Biotina (Pierce, 21336) en DMSO a 2 mg/ml inmediatamente antes de la reacción. Haga la reacción en un tubo de (17 x 100 mm) con un volumen total de 1 ml con 50 mM de bicarbonato de sodio (pH 8,3). Agregue citoquina recombinante protectora de tejido y <10% de EZ-Link NHS-LC-Biotina, con una relación molar de proteína/biotina a ~ 20. Mezcle bien e incube en hielo durante 2 horas. Desalinice y concentre la reacción obtenida en una unidad de filtro centrifugado Ultrafree. Recoja el producto en un tubo. Mida el volumen y agregue 1/9 de volumen de solución salina 10 X (1M NaCl, 0,2M de citrato de sodio, 3 mM de ácido cítrico). Determine el contenido de proteína y calcule la tasa de recuperación del producto. Analice los productos utilizando gel IEF seguido por una prueba *in vitro* con células TF-1.

A continuación se describe el método de biotinilación de los grupos aminos libres de citoquina recombinante protectora de tejido. Se disolvió 0,2 mg D-biotinoil-e-ácidoaminocapróico N-hidroxisuccinimida éster (Boehringer Mannheim #1418165) en 100 µl de DMSO. Se combinó esta solución con 400 µl PBS que contenía aproximadamente 0,2 mg de citoquina recombinante protectora de tejido en un tubo cubierto con lámina. Luego de incubarse durante 4 horas a temperatura ambiente, se separó la biotina sin reaccionar mediante filtración del gel en una columna de Centricon 10. Tal como se muestra en la Figura 12, esta eritropoyetina biotinilada protege las células p19 contra el retiro del suero. Una persona versada en la materia reconocería resultados similares esperados de la biotinilación en la citoquina recombinante protectora de tejido de la presente invención.

Recientemente, en "*Biotinylated recombinant human erythropoietins: Bioactivity and Utility as a receptor ligand*" por Wojchowski *et al.* Blood, 1989, 74(3):952-8, los autores utilizan tres métodos diferentes de biotinilación de la eritropoyetina. Se adiciona biotina a: (1) los medios de ácido siálico; (2) grupos carboxilatos; y (3) grupos aminos. Los autores utilizan una prueba de proliferación de células de bazo de ratones para realizar la prueba y demostrar que (1) la adición de la biotina a los medios de ácido siálico no inactivan la actividad biológica de eritropoyetina; (2) la adición de biotina a grupos carboxilatos conducen a la inactivación de la sustancia biológica de eritropoyetina; (3) la adición de biotina a grupos aminos resulta en completa inactivación

113

biológica de eritropoyetina. Estos métodos y modificaciones se abarcan completamente en este contexto. La Figura 12 muestra la actividad de eritropoyetina biotinilada y asialoeritropoyetina en la prueba P19 con inanición de suero. Una persona versada en la materia reconocería esperar resultados similares de la iodinación de una citoquina recombinante protectora de tejido de la presente invención, ver Sección 6.15.

6.5. EJEMPLO 5: MODIFICACIÓN DE LA CITOQUINA RECOMBINANTE PROTECTORA DE TEJIDO POR OTROS MÉTODOS

6.5.1. Trinitrofenilación

La citoquina recombinante protectora de tejido (100 ug) se modificó con 2,4,6—trinitrobenzenosulfonato tal como se describe en Plapp *et al* ("*Activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease A with modified amino groups* " 1971, *J. Biol. Chem.* 246, 939-845).

6.5.2. Modificaciones con arginina

La citoquina recombinante protectora de tejido se modificó con 2,3 butanediona tal como se describe en Riordan ("*Functional arginyl residues in carboxypeptidase A. Modification with butanedione* " Riordan JF, *Biochemistry* 1973, 12(20): 3915-3923).

En otra modificación en donde los residuos de aminoácidos de eritropoyetina son modificados, los residuos de arginina se modificaron utilizando fenilglioxal de acuerdo al protocolo de Takahashi (1977, *J. Biochem.* 81:395-402) ejecutado para varios periodos de tiempo entre 0,3 y 3 horas a temperatura ambiente. La reacción se terminó dializando la mezcla contra agua. El uso de dichas formas modificadas de eritropoyetina se abarcan totalmente en esta invención. La eritropoyetina modificada con fenilglioxal se probó utilizando la prueba de células P19 del tipo neural mencionada anteriormente. Tal como lo muestra la Figura 13, esta eritropoyetina modificada químicamente conserva totalmente sus efectos neuroprotectores. Resultados similares forman una citoquina recombinante protectora de tejido de la invención modificada en forma similar.

La citoquina recombinante protectora de tejido se modificó con ciclohexanona según Patthy *et al* ("*Identification of functional arginineresidues in ribonuclease A and Lysozyme* " Patthy, L, Smith EL, *J. Biol. Chem* 1975 250(2): 565-9).

Una citoquina recombinante protectora de tejido modificada con fenilglioxal tal como lo describe Werber *et al.* ("*Proceedings: Carboxypeptidase B: modification of functional arginyl residues* " Werber, MM, Sokolovsky M *Isr J Med Sci* 1975 11(11): 1169-70).

6.5.3. Modificaciones con tirosina

114

La citoquina recombinante protectora de tejido (100 µg) se incubó con tetranitrometano según se describió previamente en Nestler *et al* "*Stimulation of rat ovarian cell steroidogenesis by high density lipoproteins modified with tetranitromethane*" Nestler JE, Chacko GK, Strauss JF 3rd. *J Biol Chem* 1985 Jun 25;260(12):7316-21).

6.5.4. Modificaciones del ácido glutámico (ácido aspártico)

Con el fin de modificar grupos carboxilo, la citoquina recombinante protectora de tejido (100 µg) se incubó con 0.02 MEDC en 1M de glicinamida con pH 4,5 a temperatura ambiente durante 60 minutos tal como se describe en Carraway *et al* "*Carboxyl group modification in chymotrypsin and chymotrypsinogen*" Carraway KL, Spoerl P, Kosbland DE Jr. *J Mol Biol* 1969 Mayo 28;42(1):133-7.

6.5.5. Modificaciones de residuos de triptofano

Se incubó la citoquina recombinante protectora de tejido (100 µg) con 20 uM n-bromosuccinimida en el 20 mM de tamponador de fosfato de potasio (pH 6,5) a temperatura ambiente tal como se describe en Ali *et al.*, *J Biol Chem.* 1995 Marzo 3;270(9):4570-4. El número de residuos de triptofano oxidados se determinó mediante el método descrito en Korotchkina (Korotchkina, LG *et al Protein Expr Purif.* 1995 Feb;6(1):79-90).

6.5.6. Remoción de grupos amino

Con el fin de remover los grupos amino de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido se incubaron 100 ug con PBS (pH 7,4) en 20mM de ninhidrina (Pierce Chemical, Rockford, TI), a 37 °C durante dos horas tal como se describe en Kokkini *et al* (Kokkini, G., *et al "Modification of hemoglobin by ninhydrin"* Blood, Vol. 556, No 4 1980: 701-705). La reducción del aldehído resultante se hizo reaccionando el producto con borohidruro sódico o hidruro de aluminio de litio. Específicamente, la eritropoyetina (100 ug) se incubó con 0,1 M de borohidruro sódico en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reducción se terminó enfriando las muestras en hielo durante 10 minutos y dializándolas contra PBS tres veces en la noche. (Kokkini, G., Blood, Vol. 556, No 4 1980: 701-705). La reducción se hizo utilizando hidruro de litio de aluminio incubando la citoquina recombinante protectora de tejido (100 ug) con 0,1 M de hidruro de aluminio de litio en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reducción se terminó enfriando las muestras en hielo durante 10 minutos y dializándolas contra PBS tres veces en la noche.

6.5.7. Reducción y estabilización del disulfuro

La citoquina recombinante protectora de tejido (100 ug) se incubó con 500 mM DTT durante 15 minutos a 60 °C. Se agregó a la mezcla 20 mM de yodo acetamida en agua y se incubó durante 25 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

6.5.8. Proteolisis Limitada

La citoquina recombinante protectora de tejido puede someterse a una proteolisis química limitada que identifique los residuos blancos específicos. La citoquina recombinante protectora de tejido puede reaccionar con 2-(2-nitrofenilo sulfenilo)-3-metil-3³-bromoindolenina que se separa específicamente luego de que quedan residuos de triptofano en un exceso de 50 veces más en ácido acético al 50% durante 48 horas en la oscuridad a temperatura ambiente, almacenadas en tubos tapados bajo presión de nitrógeno. La reacción se terminó extinguiéndola con triptofano y desalinizándola.

Tal como se anotó anteriormente, una citoquina recombinante protectora de tejido puede modificarse aunque se pueden hacer múltiples modificaciones así como modificaciones adicionales de la molécula citoquina recombinante protectora de tejido también pueden hacerse sin desviar el espíritu de la presente invención.

6.6. EJEMPLO 6: LAS CITOQUINAS RECOMBINANTES PROTECTORAS DE TEJIDO TIENEN UN EFECTO NEUROPROTECTOR

El efecto neuroprotector de la eritropoyetina modificada químicamente se evaluó utilizando una prueba de intoxicación con agua de acuerdo con Manley *et al.*, 2000, la eliminación de aquaporin-4 en ratones, reduce el edema cerebral luego de una intoxicación aguda con agua y un ataque isquémico, Nat Med 2000 Feb;6(2): 159-63. Se utilizaron ratones hembra C3H/HEN. A los ratones se les administró 20% de su peso corporal como suya IP con 400 ng/kg bw DDAVP (desmopresina). Se les administró eritropoyetina (A) o citoquina protectora de tejido: asialoeritropoyetina (B), asialoeritropoyetina carbamilada (C); asialoeritropoyetina succinilada (D), asialoeritropoyetina acetilada (E); asialoeritropoyetina ionizada (F); asialoeritropoyetina carboximetilada (G); eritropoyetina carbamilada (H); eritropoyetina acetilada (I); eritropoyetina iodinizada; (I) o N⁶-carboxi metil eritropoyetina (K). A los ratones se les suministró 100 microgramos/kg de eritropoyetina o eritropoyetina modificada químicamente vía intraperitoneal 24 horas antes de la administración de agua y nuevamente cuando se les administró agua. Se utilizó una escala modificada de Manley *et al.* para evaluar los ratones. La siguiente es la escala modificada:

Explora jaula/mesa

Si 0

No 1

Rastrea visualmente los objetos

Si 0

No	1
Movimiento rápido	
Presente	0
Ausente	1
Movimientos de la cola y la pata	
Normal	0
Rígido	1
Paralizado	2
Retiro del dolor (pinchazo en el dedo de la pata)	
Si	0
No	1
Coordinación de movimiento	
Normal	0
Anormal	1
Se detiene en la esquina de la mesa	
Si	0
No	1
Total puntos posibles: 8	

Los ratones se evaluaron en los siguientes puntos de tiempo: 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150 y 180 minutos. La Figura 14 marca el comportamiento de los ratones que recibieron eritropoyetina o la eritropoyetina modificada químicamente como porcentaje del déficit neuronal experimentado por los ratones de control. La Figura 14 muestra que las citoquinas recombinantes protectoras de tejido protegen a los ratones contra traumas neurológicos inducidos por la intoxicación con agua. Resultados similares se esperarían de citoquinas recombinantes protectoras de tejido con modificaciones químicas similares. También se determinó un resultado estadístico importante. Los regímenes de administración con diferencias importantes, $p < 0.05$ en comparación con los controles se indican con *, mientras que aquellos con diferencias considerablemente más altas, $p < 0.01$, se indican con **.

EJEMPLO 7. MANTENIMIENTO DE LA FUNCIÓN DEL CORAZÓN QUE SE PREPARA PARA EL TRANSPLANTE.

117

Se suministró eritropoyetina (5000 U/kg peso corporal) o un vehículo a ratones Wistar machos que pesaban entre 300 y 330 g, 24 horas antes de retirar el corazón para estudios *ex vivo*, todo esto conforme al protocolo de Delcayre et al., 1992, *AMER. J. Physiol.* 263:H1537-45. Los animales fueron sacrificados con pentobarbital (0,3 mL) y heparinizados intravenosamente (0,2 mL). Se dejó equilibrar el corazón durante 15 minutos. El balón ventricular izquierdo se infló hasta el volumen que da una presión diastólica de 8mm Hg. Se construyó una curva presión-volumen ventricular izquierda, mediante inflación incremental del volumen del balón en 0,02 ml alícuotas. El volumen cero se define como el punto en el cual la presión de diastólica final ventricular izquierda es cero. Cuando se termina la curva presión-volumen, el balón ventricular izquierdo se desinfla para ajustar nuevamente la presión diastólica final a 8mmHg y el período de control continúa por 15 min., después de verificar el flujo coronario. Posteriormente, el corazón es detenido con 50mL de Celsior + molécula para dejarlo reposar a 4°C bajo presión de 60cm de H₂O. Luego, el corazón se retira y se almacena durante 5 horas a 4°C en un recipiente plástico llenado con la misma solución y rodeado de hielo triturado.

Al término del almacenamiento, el corazón es transferido a un aparato Langendorff. El catéter del balón se reinserta dentro del ventrículo izquierdo y se vuelve a inflar al mismo volumen que tenía durante el período preisquémico. El corazón se vuelve a perfundir por lo menos 2 horas a 37°C. La presión de reperfusión se selecciona a 50cm de H₂O durante 15 min. de reflujo y se regresa a 100 cm de H₂O por las siguientes 2 horas. Se restituye el ritmo (320 pulsaciones por minuto). Las medidas isovolumétricas de índices contráctiles y presión diastólica se toman tres veces a 25, 45, 60, 120 minutos siguientes a la reperfusión. En este momento se hacen las curvas presión-volumen y se recoge el efluente coronario durante la reperfusión de 45 mn para medir la fuga de la quinasa de creatinina. Los dos grupos de tratamiento se comparan empleando una prueba t-no pareada y una regresión lineal utilizando los datos de la presión diastólica final para diseñar las curvas de cumplimiento. Tal como se muestra en la Figura 15, se presenta una mejora considerable de la presión del ventrículo izquierdo después del tratamiento con eritropoyetina, así como también se mejoró el volumen de la curva presión-volumen, disminuyendo la presión ventricular diastólica izquierda y disminuyendo la fuga de la quinasa de creatinina. Resultados similares se esperarían con las citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la presente invención.

6.8 EJEMPLO 8: ERITROPOYETINA PROTEGE EL MIOCARDIO CONTRA DAÑOS ISQUÉMICOS

Se suministró a ratones adultos eritropoyetina humana recombinante (5000 U/kg peso corporal) y 24 horas antes fueron anestesiados y preparados para oclusión de la

arteria coronaria. Una dosis adicional de eritropoyetina se les dió al inicio del procedimiento y la arteria coronaria principal izquierda se ocluyó durante 30 minutos y luego se soltó. La misma dosis de eritropoyetina es suministrada diariamente durante una semana después del tratamiento. Luego se estudia la función cardíaca de los animales. Tal como lo ilustra la Figura 16, los animales que recibieron una inyección simulada (salina) demostraron gran aumento en la presión diastólica izquierda final indicativa de un corazón rígido dilatado secundario a un infarto del miocardio. Por el contrario, los animales que recibieron eritropoyetina no sufrieron una disminución de la función cardíaca comparados con aquellos controlados con inyecciones simuladas (una diferencia significativa al nivel $p > 0,01$). Resultados similares se esperarían del tratamiento con citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la presente invención.

6.9 EJEMPLO 9: PROTECCION DE ISQUEMIA RETINAL POR ADMINISTRACIÓN PERIFÉRICA DE ERITROPOYETINA

Las células de la retina son muy sensibles a isquemia por lo que muchas de estas mueren después de 30 minutos de estrés isquémico. Además, la isquemia subcutánea o crónica es la base del deterioro de la visión que acompaña un número de enfermedades humanas comunes tales como diabetes mellitus, glaucoma y degeneración macular. Actualmente no existen terapias efectivas que protejan las células contra isquemia. Existe una barrera endotelial apretada entre la sangre y la retina que excluye la mayoría de moléculas grandes. Para probar si una eritropoyetina administrada periféricamente protege las células sensibles a isquemia se utilizó un modelo de rata con glaucoma aguda reversible tal como lo describe Rosenbaum et al. (1997; Vis. Res. 37:3443-51). Específicamente, se inyectó sustancia salina en la cámara anterior del ojo de ratones adultos a una presión por encima de la presión arterial sistémica y se mantuvo durante 60 minutos. A los animales se les administró sustancia salina a 5000 U de eritropoyetina/peso corporal por vía intraperitoneal 24 horas antes de la inducción de la isquemia y se continuó con dosis diarias durante 3 días más. Se hizo una electroretinografía en los ratones adaptados a la oscuridad una semana después del tratamiento. Las Figuras 17-18 ilustran que la administración de la eritropoyetina está asociada con la buena preservación del electroretinograma (ERG) (Figura 17 Panel D) en contraste con los animales tratados solo con la sustancia salina (Figura 17 Panel C), para los cuales solo permaneció una función muy pequeña. La Figura 18 compara las amplitudes de onda a- y b- del electroretinograma luego de 60 minutos de isquemia para los grupostratados con salina y muestra que se obtuvo una protección considerable por eritropoyetina. Resultados similares se obtuvieron por el tratamiento con las citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la presente invención.

6.10 EJEMPLO 10: EFECTOS RESTAURADORES DE LA ERITROPOYETINA EN UNA FUNCION COGNITIVA DISMINUIDA QUE SURGE POR DAÑOS CEREBRALES.

En un estudio para demostrar la capacidad que tiene la eritropoyetina para restaurar la función cognitiva disminuida en ratones luego de sufrir trauma cerebral, se sometieron ratones Balb/c a trauma cerebral contundente tal como lo describe Brines et al., PNAS 2000, 97; 10295-10672 y cinco días después, se inició la administración diaria de 5000U/kg-bw de eritropoyetina vía intraperitoneal. Doce días después de la lesión se les probó su función cognocitiva en el laberinto de agua *Morris*, con cuatro pruebas diarias. Si bien el desempeño de los animales tratados y no tratados fue deficiente en las pruebas (con tiempos de nado de 80 segundos de los posibles 90), la Figura 19 muestra los resultados de la prueba *Morris*, con cada grupo de ratones n=16, luego de trauma cerebral contundente con administración de EPO comenzando el día 5 posterior a la lesión. La primera prueba comenzó una semana después de comenzar la dosis con EPO (12 días después de la lesión). Ambos grupos de animales tuvieron tiempos de nado deficientes de aproximadamente 80 de los 90 segundos posibles. Los animales tratados con eritropoyetina se desempeñaron mejor (en esta presentación un valor negativo es mejor). Se utilizó un promedio de 4 pruebas por día. La Figura 19 lo muestra. Incluso si se retrasa el tratamiento con eritropoyetina hasta 30 días después del trauma (Figura 20) también se puede observar que se restaura la función cognocitiva. En la Figura 20, cada grupo de ratones n=7 fue tratado con 5.000 U/kg de Epo diariamente, excepto los fines de semana comenzando un mes siguiente a la lesión. Los promedios de las pruebas también fueron de cuatro pruebas diarias. Se esperarían resultados similares del tratamiento con citoquinas recombinante protectora de tejido de la presente invención.

6.11 EJEMPLO 11: MODELO KAINATE.

En el modelo de neurotoxicidad kainate se administró asialoeritropoyetina de acuerdo con el protocolo de Brines et. al. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 2000, 97; 10295-10672 a una dosis de 5.000 U/kg-bw administrada intraperitonealmente 24 horas antes de la administración de 25 mg/kg Kainate, se muestra que es tan efectivo como la eritropoyetina tal como se muestra en el momento de la muerte (Figura 21). Se esperan obtener resultados similares del tratamiento realizado con la citoquina protectora de tejido de la presente invención.

6.12. MODELOS DE LESIONES DE LA MÉDULA ESPINAL

6.12.1. Compresión de la médula espinal mediante prueba con eritropoyetina

y citoquinas protectoras de tejido.

En este estudio se utilizaron ratas Wistar (hembras) con un peso entre 180 y 300g. Los animales ayunaron durante 12 horas antes de la cirugía, se controlaron y se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de sodio triopental (40 mg/kg-bw). Luego de la infiltración en la piel (bupivacaina 0,25%), se hizo laminectomía de un solo nivel completo (T-3) a través de una incisión de 2 cm con la ayuda de un microscopio de disección. La lesión traumática de la médula espinal se indujo mediante la aplicación extradural de un clip de aneurisma temporal que ejercía una fuerza de cierre newton de 0,6 (65 gramos) en la médula espinal durante a minuto. Después de retirar el clip, se cerró la incisión de la piel y los animales se dejaron en recuperar totalmente de la anestesia y se regresaron a las jaulas. Se monitoreó continuamente la palpación de la vejiga de las ratas al menos dos veces diarias hasta que se reasumió la evacuación espontánea.

Se dividieron al azar cuarenta animales en cinco grupos. Los animales que estaban en el grupo de control (I) (n= 8) recibieron solución salina normal (vía inyección intravenosa) inmediatamente después de que se cerró la incisión. El grupo (II; n= 8) recibió rbEPO a 16 microgramos/kg-bw iv; el grupo (III) recibió citoquina protectora de tejido asiano de la presente invención (asialoeritropoyetina) a 16 microgramos/kg-bw iv, el grupo (IV) recibió citoquina protectora asialo a 30 microgramos/kg-bw iv, y el grupo (V) recibió citoquina protectora asialo de la presente invención (asialoeritropoyetina) a 30 microgramos/kg-bw; todo como una inyección intravenosa de bolo inmediatamente después de retirar el clip del aneurisma.

La función neurológica motora de las ratas se evaluará con una escala de clasificación locomotora de Basso *et al.* En esta escala, a los animales se le asigna un rango de 0 (no se observan movimientos del miembro posterior) a 21 (paso normal). Se les prueba a las ratas sus deficiencias funcionales a 1, 12, 24, 48, y 72 horas y luego luego una semana después de lesión por el mismo examinador quien es ciego al tratamiento que cada animal recibe.

La Figura 22 es una gráfica que muestra las clasificaciones locomotoras de las ratas que se están recuperando de un trauma de la médula espinal durante un período de 30 días. Tal como se puede observar en la gráfica, las ratas que recibieron eritropoyetina (grupo II) o citoquinas protectoras de tejido (grupos III-V) se recuperaron de la lesión más rápidamente y demostraron una mejor recuperación general de la lesión que las ratas bajo control. Se esperarían resultados similares del tratamiento terapéutico con citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la presente invención.

En un segundo estudio relacionado, los animales fueron lesionados de la misma

manera. Se escogieron al azar 40 animales y se dividieron en tres grupos. Los animales en el grupo de control (n= 8) recibieron solución salina normal (vía inyección intravenosa) inmediatamente después de cerrar la incisión. El segundo grupo (n= 8) recibió metil-prednisolona a 30 mg/kg/día x 3 y luego cada dos semanas, una medida terapéutica común para lesiones de la médula espinal; el tercer grupo recibió la citoquina recombinante protectora de tejido, S100E de la presente invención a una dosis de 100 ug/kg inmediatamente después de la lesión; todo como una inyección intravenosa de bolo inmediatamente después de retirar el clip del aneurisma.

La función neurológica motora de las ratas se evaluará la escala de clasificación locomotora de Basso *et al.* En esta escala, a los animales se les asigna un rango de 0 (no se observan movimientos de los miembros posteriores) a 21 (paso normal). Se analiza a las ratas sus deficiencias funcionales luego de 1, 12, 24, 48, y 72 horas y luego una semana después de lesión por el mismo examinador quien es ciego al tratamiento que cada animal recibe.

La Figura 37 es una gráfica que muestra las clasificaciones locomotoras de las ratas que se recuperan de trauma en la columna vertebral durante un período de 42 días. Como puede observarse, a las ratas que se les administró S100E se recuperaron de la lesión más rápidamente y demostraron una mejor recuperación general de la lesión que las ratas de control y las ratas administradas.

6.12.2. Isquemias de médula espinal en conejos, probando eritropoyetina y una citoquina protectora del tejido.

En este estudio se utilizaron 36 conejos blancos New Zealand (8-12 meses de edad, machos) con un peso entre 1,5-2,5 Kg. Los animales fueron sometidos a un ayuno de 12 horas y fueron controlados. La inducción de anestesia se aplicó con halotano al 3% en oxígeno al 100% y se mantuvo halotano al 0,5 – 1,5 % en una mezcla de 50% de oxígeno y 50% de aire. Se colocó un catéter intravenoso (calibre 22) en la vena de la oreja izquierda. Se infundió lactato Ringers a una tasa de 4 ml/kg del peso corporal (bw) por hora durante el procedimiento quirúrgico. Antes de la operación se les administró cefazolina 10 mg/kg-bw por vía intravenosa para la profilaxis de la infección. Los animales se colocaron en posición decúbito lateral derecho, se preparó la piel con yodopovidona, se infiltraron con bupivacaína (0,25%) y se les hizo una incisión en la piel del costado paralelo a la médula al nivel de la 12ª. costilla. Después de la incisión de la piel y de la fascia toracolumbar subcutánea, se retractaron los músculos *longissimus lumborum* y *iliocostalis lumborum*. La aorta abdominal se expuso por medio de un acercamiento retroperitoneal izquierdo y se movilizó justo en la parte inferior de la arteria renal izquierda. Se aseguró una pieza de tubo PE-60 alrededor de la aorta inmediatamente distal a la arteria renal izquierda y los dos extremos pasaron a través de un tubo de látex. Al

halar el tubo PE la aorta se ocluyó no traumáticamente durante 20 minutos. Se administró Heparina (400 TU) como bolo intravenoso antes de la oclusión aórtica. Luego de 20 minutos de la oclusión se retiró el tubo y el catéter, se cerró la incisión y se monitorearon los animales hasta su total recuperación y luego fueron evaluados por series en cuanto a su función neurológica.

Se escogieron al azar 36 animales y se dividieron en seis grupos. En el grupo de contro, (I) (n= 6) los animales recibieron solución salina normal vía inyección intravenosa inmediatamente después de liberar la oclusión aórtica. El grupo (II) recibió rhEPO a 6,5 mg/kg/bw; el grupo (III) recibió citoquina protectora de tejido (eritropoyetina carbamylada) a 6,5 ug/kg/bw, el grupo (iv) recibió otra citoquina protectora de tejido (asialoeritropoyetina) a 6,5 ug/kg/bw, el grupo (v) recibió la misma citoquina protectora de tejido que la del grupo iv, pero a 20 ug/kg/bw; y el grupo (vi) aún otra citoquina protectora de tejido (asialocarbamylato de eritropoyetina) a 20 ug/kg/bw, todas intravenosas inmediatamente después de perfusión (n=6 para cada grupo).

La función motora se evaluó según el criterio de Drummond y Moore por medio de un investigador ciego al tratamiento luego de 1, 24 y 48 de la perfusión. Se asignó un puntaje de 0 a 4 a cada animal así: 0 = paraplégico sin función motora evidente en la extremidad posterior; 1 = función motora deficiente de las extremidades posteriores, solo un leve movimiento antigravedad; 2 = función moderada de las extremidades posteriores con buena fuerza antigravedad pero incapacidad para sostener las patas con el cuerpo; 3 = excelente función motora con capacidad de arrastrar las patas bajo el cuerpo y saltar, pero no normalmente; 4 = función motora normal. La vejiga urinaria se evacuó normalmente en animales paraplégicos dos veces al día.

La Figura 23 es una gráfica que indica la función motora de los conejos en recuperación. La gráfica demuestra que incluso en un período de solo dos días de administración de eritropoyetina y de la citoquina protectora de tejido de la presente invención permite a los conejos recuperarse totalmente de una lesión de la médula espinal. Se esperarían resultados similares del tratamiento terapéutico con citoquina recombinante protectora de tejido de la presente invención.

6.13. EJEMPLO 13: EFECTOS ANTI-INFLAMATORIOS DE LA ERITROPOYETINA

ID-Estudios in-vivo:

MCAO en Ratas

Se obtuvieron ratas macho Crl:CD(SD)BR con peso entre 250-280 g de Charles River, Calco, Italy. La cirugía se hizo en estas ratas de acuerdo con las enseñanzas de Brines, M.L, Ghezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., de Lanerolle, N.C., Cerami, C., Itri, L.M., y Cerami, A. La eritropoyetina 2000 cruza la barrera cerebral sanguínea para protección contra lesiones cerebrales experimentales, *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10526-10531. En resumen, las ratas se anestesiaron con hidrato cloral (400 mg/kg-bw, intraperitonealmente (i.p.)), se visualizaron las arterias carótidas y se ocluyó la vena carótida derecha con un corte y dos suturas. Un orificio en el lóbulo adyacente y rostral a la órbita derecha permitió la visualización de MCA, la cual se cauterizó distal a la arteria nasal. Para producir una penumbra (zona de borde) que rodea la lesión MCA fija, se ocluyó la arteria carótida contralateral durante 1 hora utilizando tracción con la ayuda de un fórceps fino y luego se reabrió. Inmediatamente después de MCAO se administró PBS o, rhEPO (5,000 U/kg-bw, intraperitonealmente (i.p.) que anteriormente demostró ser protectora de este modelo (1)). Cuando se indicó, se cuantificó TNF y IL-6 en homogenatos de la corteza cerebral tal como se describe antes (8). Se midió MCP-1 en los homogenatos utilizando un kit ELISA comercial (biosource, Camarillo, CA).

Veinticuatro horas después de MCAO, las ratas se anestesiaron tal como se describió anteriormente y se perfusaron transcardialmente con 100 ml de solución salina seguido por 250 ml de una solución de paraformaldehído al 4% tamponada en fosfato de sodio. Se retiraron los cerebros rápidamente, se fijaron en la solución de paraformaldehído al 4% tamponada en fosfato de sodio durante dos horas, se transfirieron a una solución sucrosa al 20% en PBS en la noche, luego en solución sucrosa al 30% hasta que se sumergieron y se congelaron en 2-metilbutano a -45 °C. Se cortaron secciones de (30 µm) en un criostato (HM 500 OM, Microm) a -20 °C en un plano transversal a través del cerebro y cada quinto de sección se seleccionaron para histoquímica contra diferentes antígenos, o manchados con hematoxilina-eosina. Las secciones libres flotantes se procesaron en cuanto a inmunorreactividad, ambas con anticuerpo monoclonado de ratón de proteína de ácido fibrilar anti-gliar (GFAP) para (1:250, Boehringer Mannheim, Monza, Italia) y con anticuerpo monoclonado de ratón anti-cd11b (MRC OX 42) (1:50, Serotec, UK), de acuerdo con los protocolos descritos por Houser *et al.* y el protocolo del fabricante respectivamente. Todas las secciones fueron montadas para microscopía luminosa en salina sobre láminas recubiertas, deshidratadas con alcoholes graduados, fijados en xileno y sobrecubiertos utilizando un montaje DPX (BDH, Poole, UK). Secciones adyacentes fueron manchadas con hematoxilina-eosina tal como se describió anteriormente. (10).

La Figura 24 muestra una sección coronal de la capa cortical cerebral manchada con hematoxilina y eosina. Rata de control (A), rata isquémica tratada con PBS (B), rata isquémica tratada con rhEPO (5,000 U/kg-bw, intraperitonealmente (i.p.), seguido

124

inmediatamente por MCAO) (C). La sección B muestra una disminución marcada en el tejido manchado consistente en una inflamación acompañada por pérdida del componente neuronal en comparación con las ratas de control (A). La administración sistémica de rhEPO reduce considerablemente el daño isquémico localizando la muerte celular o lesión en un área restringida (C).

(Ampliación 2,5x. tamaño bar = 800 μ m.)

La Figura 25 muestra las secciones coronales de la corteza frontal adyacente a la región del infarto manchada con anticuerpos GFAP. Rata de control (A), rata isquémica tratada con PBS (B) y rata isquémica tratada con rhEPO (C). Los astrocitos activados son visualizados mediante sus procesos positivos APGF (panel B). Se nota una marcada reducción en el número así como en la intensidad de manchado en un animal representativo tratado con rhEPO (Panel C). (Ampliación 10x. tamaño bar = 200 μ m.)

La Figura 26 muestra secciones coronales de la capa cortical cerebral manchada con el anticuerpo OX-42. Rata isquémica tratada con PBS (A), y rata isquémica tratada con rhEPO (B). En el hemisferio cerebral isquémico el manchado celular es especialmente prominente alrededor del tejido infartado en ambos grupos de tratamiento, pero es mucho más denso y se extiende más en el grupo tratado con solución salina. (Ampliación 20x; tamaño bar = 100 μ m).

La Figura 27 muestra secciones coronales de la capa cortical cerebral adyacente a la región del infarto, manchada con el anticuerpo OX-42. Se observa una densidad mucho mayor de células inflamatorias mononucleares en el tejido de una rata isquémica tratada con PBS (A), en comparación con una rata isquémica tratada con rhEPO (B). Los leucocitos infiltrados con una forma típica redonda, ampliaron potencialmente el volumen del infarto. (Ampliación 10x; tamaño bar = 200 μ m)

Se esperarían resultados similares en tratamientos terapéuticos con citoquina recombinante protectora de tejido de la presente invención.

Encéfalomiелitis alérgica experimental aguda. (EAE) en ratas Lewis

Se compraron ratas hembra Lewis de 6 a 8 semanas a Charles River (Calco, Italy). Se indujo EAE en las ratas inyectando 50 μ g MBP de cerditos de guinea (Sigma, St. Louis, MO) emulsificado en agua en volúmenes iguales para completar el adyuvante Freund (CFA, Sigma), adicionado con 7 mg/ml de tuberculosis M. matada al calor H37Ra (Difco, Detroit, MI) en un volumen final de 100 μ l bajo anestesia en éter leve en ambos miembros posteriores. 1. Las ratas fueron examinadas en un estudio ciego en cuanto a señales EAE y el puntaje se marcó así: 0, sin enfermedad; 1, cola flácida; 2, ataxia; 3, parálisis completa del miembro posterior con incontinencia urinaria. Después de 3 días de haber iniciado la inmunización, a las ratas se les administró r-Hu-EPO (EPOyetina

125

alfa, Procrit, Ortho Biotech, Raritan, NJ) intraperitonealmente (i.p.), una vez al día a la dosis indicada, en PBS. Puesto que la Epo grado clínico contenía albúmina de suero humana, a los animales bajo control siempre se les suministró PBS que contenía una cantidad idéntica a la albúmina de suero humano. La administración diaria de 5,000 U/kg-bw de EPO aumentó los hematocritos en un 30%. Cuando se indicó, las ratas fueron inyectadas subcutáneamente (s.c.) una vez al día desde el día 3 hasta el día 18 con 1,3 mg/kg-bw de dexametasona (DEX), sal disódica de fosfato (Sigma) correspondiente a 1 mg/kg-bw de DEX, disuelta en PBS. Cuando se indicó, TNF y IL-6 se cuantificaron en homogenatos en el cerebro y en la médula espinal tal como se describió previamente [Agnello, 2000 #10].

La Figura 28 muestra el efecto protector en los signos clínicos de EAE de las diferentes dosis de EPO suministradas a partir del día tercero siguiente a la inmunización con MBP hasta el día 18. EPO en dosis dependiente retrasó la aparición de la enfermedad y redujo la severidad de la misma, tal como se resume en la Tabla 1, pero no tardó mucho tiempo en presentarse la severidad. Tal como se muestra en esta tabla, las dosis de EPO de 2,500 y 5,000 U/kg-bw redujeron significativamente el promedio del puntaje acumulado.

En experimentos donde se discontinuó el tratamiento con EPO luego de retroceder la enfermedad se monitorearon las ratas hasta por dos meses, no se observó recaída, al contrario de DEX, que induce una exacerbación de la enfermedad luego de suspender su administración (Figura 29). Se esperarían resultados similares con el tratamiento terapéutico con citoquina recombinante protectora de tejido de la presente invención.

Estudios In Vitro:

Se prepararon cultivos primarios de células gliales en ratas Sprague-Dawley de 1 y 2 días. Los hemisferios cerebrales fueron liberados de las meninges y se interrumpieron en forma mecánica. Las células se dispersaron en una solución de tripsina al 2.5% y ADNasa al 1%, se filtraron a través de una malla de 100 μ m y se laminaron (140,000 células por plato de 35 mm) en un medio esencial mínimo Eagle suplementado con 10% de suero bovino fetal, 0,6% glucosa, estreptomicina (0,1 mg/ml) y penicilina (100 UI/ml). Los cultivos gliales se alimentaron dos veces por semana y cultivaron a 37 °C en una incubadora humedecida con CO₂ al 5%. Todos los experimentos se hicieron en cultivos de células gliales de 2 a 3 semanas con 97% de astrocitos y 3% de microglia, según lo evaluado por la inmunquímica de GFAP e isolectina simplicifolia B4 Griffonia. Se establecieron cultivos neuronales del hipocampo de fetos de ratas de 18 días. Se removieron los cerebros y se liberaron de las meninges y se aisló el hipocampo. Las células se dispersaron mediante incubación durante 15 a 20 minutos a 37 °C en solución de tripsina al 2,5%, seguida por titulación. La suspensión celular se diluyó en el medio

utilizado para células gliales y se laminó en cubiertas revestidas con poliometina a una densidad de 160,000 células por cubierta. Un día después de la incubación, se pasaron a platos que contenían una monocapa glial en medio de mantenimiento de neuronas. (medio Eagle modificado de Dubecco y mezcla de nutriente Ham F12 suplementada con 5 µg/ml, 100 µg/ml transferina, 100 µg/ml putrescina, 30 nM Na selenita, 20 nM progesterona y 100 U/ml penicilina) suplementado con 5 µM de citosina arabinosida. Las cubiertas se invirtieron de modo que las neuronas del hipocampo quedaran frente a la monocapa glial. Puntos de parafina adheridos a las cubiertas las soportaban por encima de la glial, creando un espacio estrecho evitando contacto de los dos tipos de células, pero permitiendo la difusión de otras sustancias solubles. Estas condiciones de cultivo permitieron el crecimiento de cultivos neurales diferenciados con >98 % de homogeneidad, según lo evaluado por medio de inmunohistoquímica de proteína 2 asociada con microtúbulos GFAP. Las células fueron tratadas durante 24 horas con 1 µM de estaño de trimetilo (TMT), en presencia o ausencia de rhEPO (10 U/ml), los sobrenadantes utilizados en la prueba TNF y la viabilidad celular se evaluaron tal como se describe a continuación. Cuando se indicó, las células gliales se cultivaron en presencia de LPS durante 24 horas con o sin rhEPO y se midió TNF en los sobrenadantes cultivados. La viabilidad de las células se midió por medio de la prueba 3-(4,5-dimetilo-tiazol-2-il)-2,5- bromuro de difeniltetrazolio (MTT): Denizot, F., y Lang, R. 1986. *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.. J Immunol Methods* 89:271-277. En resumen, la sal de tetrazolio MTT se disolvió en un medio libre de suero hasta una concentración final de 0,75 mg/ml y se adicionó a las células al final del tratamiento durante 3 horas a 37 °C. El medio se removió y se extrajo el formazano con 1N HCl:isopropanol (1:24). La absorbancia a 560 nm se leyó en un lector de microplacas.

La Figura 30 muestra que rhEPO previene la producción TNF inducida por muerte neuronal en cultivos mezclados de neurona-glia. Panel A: Porcentaje de muerte celular neuronal inducida por 1 µM de TMT con o sin tratamiento, con rhEPO (10 U/ml). Panel B: Liberación de TNF de células gliales expuestas a 1 µM de TMT en presencia de (barras divididas) o ausencia de (barras rellenas) de neuronas, con o sin rhEPO (10 U/ml). Se esperarían resultados en tratamientos terapéuticos con citoquina recombinante protectora de tejido de la presente invención.

6.14. EJEMPLO 14: PRUEBA DE MUERTE CELULAR INDUCIDA POR NMDA

La excitotoxicidad se puede definir como una activación excesiva de receptores de glutamatos, tal como el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). El receptor NMDA

127

exhibe actividad aumentada en respuesta a isquemia y otros traumas (Fauci et al, 1998, Harrison: *Principles of Internal Medicine*), (Nishizawa, 2001, Life Sci. 69,369-381), (White et al, 2000, J. Neurol. Sci. 179, 1-33). Por ello, esta prueba sirve como modelo para evaluar el efecto de los compuestos en la lesión y muerte celular.

Protocolo de exitotoxicidad NMDA en neuronas primarias del hipocampo

Se prepararon cultivos primarios de neuronas del hipocampo utilizando ratones recién nacidos (de menos de 24 horas) esencialmente, tal como se describió anteriormente por Krohn et al. (1998). En resumen, el hipocampo se disectó en del DMEM que contenía 0,02% de BSA. El tejido se transfirió a DMEM que contenía papaína al 0,1% y se incubó durante 20 minutos a 37 °C. La digestión se detuvo por aspiración de la papaína que contenía el medio y la adición de MEMII y las células hipocampo se disociaron por titulación con la punta de una pipeta de 1000 µl. Se dejaron reposar las piezas del tejido y el sobrenadante que contenía las células se transfirió en un MEMII que contenía un inhibidor de tripsina al 1% (tipo II-O) y BSA al 1%. El paso de titulación se repitió tres veces antes que las células se centrifugaran a 600 U/minuto durante 10 minutos y se resuspendieron en un medio de crecimiento (MEMII, 20 mM D-glucosa, 100 U/ml penicilina, 1005 µg de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, suero Nu (bovino) al 10%, 2% suplemento B27, NaHCO₃ 26,2 mM). Se usaron células de 10 hipocampos para sembrar una placa de 24 pozos. Un día después de sembrarlas, la células se trataron con citosina-arabina-furanosida (1µM). En el día 2 el medio se cambió y se agregó citosina-arabina-furanosida (1µM).

Ensayo de Excitotoxicidad

Se preincubaron cultivos de 12 días con el compuesto de prueba (vehículo, R103E, R150E, o EPO) a 5 nM durante 24 horas. En el día 13, el medio se retiró de las células y se mantuvo mientras que los cultivos se retaron con 300 µM de NMDA durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego de la inducción de exitotoxicidad, se regresó el medio precondicionado a los cultivos y se cuantificó la lesión por medio de exclusión de azul de triptano luego de otras 24 horas de incubación. Se contaron aproximadamente 300 neuronas por condición en por los menos cuatro pozos separados y los experimentos se repitieron por lo menos dos veces (Krohn, A.J., Preis, E. y Prehn, J.H.M. (1998) J. Neurosci. 18(20):8186-8197).

La Figura 31 muestra que la eritropoyetina humana y las citoquinas recombinantes protectoras de tejido R130E y R150E reducen efectivamente la muerte celular inducida por NMDA cuando se agregan a los cultivos primarios de células neuronales del hipocampo antes de tratamiento con NMDA. Las células tratadas con R103E (5 nM) exhibieron muerte celular considerablemente menor en comparación con células de control del vehículo (p=0,01). Las células tratadas con R103E (5nM)

106

exhibieron muerte celular considerablemente más baja en comparación con las células de control del vehículo ($p=0,01$). Las células tratadas con R150E (5 nM) exhibieron aproximadamente una reducción de 20% en muerte celular en comparación con células de control del solvente ($p=0,001$). Estadística: ANOVA más prueba post-hoc de Tukey.

6.15. EJEMPLO 15: PROTECCIÓN NEURONAL POR RETIRO DE SUERO EN CÉLULAS P19

Con el fin de examinar el efecto neuronal protector de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la invención, el retiro el suero de los cultivos de las células PC19 se utilizó como modelo. El clon P19S1801 fue suministrado gentilmente por el Dr. W.H. Fischer. Las células se mantuvieron en un medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementadas con 2 mM de L. glutamina L, 100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina y suero bovino fetal al 10% (FCS; todos de Gibco, Paisley, Scotland, UK), que contenían 1,2 g/l de NaHCO_3 , 10 mM tamponador Hepes (Carlo Erba, Milano, Italia), referido en adelante como un medio completo en un incubado humedecido bajo una atmósfera de 7% de CO_2 en aire. El medio sin suero (N2) tiene los mismos constituyentes que lo anterior eliminando suero y adicionando lo siguiente: 5 µg/ml de insulina, 100 µg/ml de transferina, 20 nM de progesterona, 100 mM de putrecina y 30 nM Na_2SeO_3 (todos de Sigma). Para los experimentos de muerte se separaron las células con pancreatina al 10% (Gibco), se lavó una vez con el medio completo, dos veces con el medio N2 y se colocó en placas, y salvo indicación al contrario, se colocó en placas en frascos de cultivos de tejido de 25 cm² (Falcon Becton Dickinson, Lincoln Park, New Jersey) a una densidad final de 104 células/cm² en 5 ml de un medio sin suero. La L-acetilcarnitina (100 µM) se toma como un control positivo que protege reduciendo en un 50% el porcentaje de núcleos apoptóticos 24 horas después del retiro del suero. Veinticuatro horas después de retirado el suero, las células fueron separadas cubriendo el frasco (sin tripsina) sembradas en unas diapositivas de microscopio por centrifugación con citospina (Shandon Southern, USA) a 600 rpm durante 10 minutos y se fijaron en una solución de Carnoy (metanol: ácido acético, 3:1) durante 10 min, se mancharon con Hoechst 33258 (0.1 µg/ml PBS) durante 1 hora a 37° C, se lavaron con agua durante 15 minutos, se secaron al aire y se montaron. Las diapositivas se observaron con un microscopio fluorescente (Zeiss, Alemania) a una longitud de onda de excitación de 365 Mn. El porcentaje de núcleos apoptóticos se determinó haciendo un conteo ciego de un total de 100 células en al menos 5 determinaciones.

Las células P19 se preincubaron con 3 nM Epo o citoquina recombinante protectora de tejido S100E durante 24 horas. Este tratamiento resultó en una protección

significativa ($p < 0,001$) contra apoptosis provocada por el retiro del suero. Los datos son promedios de determinaciones triplicadas dentro de un experimento. El experimento se hizo dos veces con resultados similares.

La Figura 32 muestra protección neuronal desde el retiro de suero en células P19. El porcentaje de células apópticas disminuyó para células pretratadas con Epo, Epo WT, y la citoquina recombinante protectora de tejido S100E. Las células tratadas con Epo mostraron una reducción aproximadamente de 20% en muerte celular apóptica en comparación con las células de control no tratadas. Las células tratadas con EpoWT y S100E exhibieron una disminución de 10% en muerte celular apóptica en comparación con las células de control no tratadas.

6.16. EJEMPLO 16: RETIRO NGF EN CÉLULAS PC12 DIFERENCIADAS

Para examinar el efecto protector de las citoquinas recombinantes protectoras de tejido de la invención, se usó como modelo el retiro del NGF en células PC12 diferenciadas. Esta prueba es un modelo bien establecido de apoptosis. Esta línea celular de rata PC12 se derivó de un feocromocitoma medular adrenal y puede diferenciarse en células del tipo neuronal en presencia de NGF (Masuda et al., 1993, *J Biol Chem* 268, 11208-11216). La línea celular PC12 es una línea celular neuroendocrina que en presencia de NGF puede diferenciarse para expresar un fenotipo de tipo neuronal (Vaudry et al., 2002, *Science* 296, 1648-1649). Una vez las células están totalmente diferenciadas se vuelven dependientes de NGF y el retiro de NGF induce apoptosis.

Las células PC12 se mantuvieron en el medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero equino inactivado por calor, 5% de suero bovino fetal inactivado por calor, 1% sodio-piruvato y 1 % penicilina-estreptomicina (PIS) (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Para los experimentos las células fueron diferenciadas durante 7 días en placas de 48 pozos recubiertas con colágeno G a una densidad de 24,000 células/pozo en DMEM suplementado con suero equino inactivado por calor, 1 % piruvato de sodio, 1 % P/S y 100 ng/ml NGF (factor de crecimiento nervioso 7S, glándulas submaxilares de ratones adquiridas de Calbiochem, Cat. No.480354) con un medio que cambiaba cada 2 a 3 días. En el día 6, se agregó a las células el mutante Epo en ácido amino 100 (=S100E) en las concentraciones indicadas durante 24 horas después de lo cual, el medio se reemplazó por RPMI1640, 1% P/S, para remover el NGF de todas las células. Se volvió a agregar S100E ya que NGF (100 ng/ml) era control positivo (+NGF). Luego de 24 horas, la viabilidad se midió por medio de una prueba de reducción de tetrazolio (MTT).

Las Figuras 33A y 33B muestran el efecto de pre-incubación con S100E en células diferenciadas PC12 sometidas a retiro de NGF en dos experimentos

130

independientes. Las células diferenciadas PC12 fueron pretratadas con S100E a las concentraciones indicadas durante 24 horas, Figura 33 A (3 pM), Figura 33B (0,00003 pM-3pM). La viabilidad se midió en la prueba MTT. Se utilizó NGF (100 ng/ml) como control positivo y el medio libre de NGF (-NGF) como control negativo. Los datos presentados en la Figura 33 son % de la viabilidad del control positivo (+NGF) (n=8 en ambos experimentos). Hay un aumento estadísticamente importante en la viabilidad de células tratadas con S100E en comparación con las células de control negativo (-NGF) mediante el uso de ANOVA de una vía y prueba Bonferroni post-hoc. ***p<0,001, *p<0,05. Los efectos observados con S100E fueron similares a los de Epo en este sistema de prueba con respecto a potencia y eficacia.

La Figura 34 muestra el efecto de pre-incubación con Epo en células diferenciadas PC12 sometidas a retiro de NGF. Las diferenciadas células PC12 fueron pretratadas con Epo, S100E o Epo carbamylado (30 pM-30 nM) durante 24 horas. La molécula Epo modificada químicamente, AA24496, tiene una actividad 10000 veces más baja que EPO en la prueba de células UT-7. La viabilidad se midió en la prueba MTT. NGF (100 ng/ml) se utilizó como control positivo y el medio libre de NGF (-NGF) como control negativo.

6.17. EJEMPLO 17: BIO-ENSAYO EPO DE PROLIFERACIÓN CÉLULAR UT-7

UT-7 es una línea celular de leucemia dependiente de EPO que se usa para determinar el efecto eritroide de la citoquina recombinante protectora de tejido tal como K45D. Las células UT-7 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Cat. No. ACC 363) fueron cultivadas normalmente en presencia de FBS al 10% y 5 ng/ml Epo. La respuesta de proliferación/sobrevivencia (= incremento de viabilidad) de las células expuestas a Epo es mediada por el receptor EPO clásico tipo periférico. La respuesta de proliferación es una medida cuantitativa y correlaciona la capacidad de las variantes Epo para estimular el receptor Epo clásico.

Métodos de la prueba de viabilidad de las células UT - 7

La línea celular de leucemia humana UT-7 se hizo dependiente de EPO y la respuesta proliferativa a las citoquinas recombinantes protectoras de tejido – agregadas por Epo se utilizó como una medida de su actividad biológica. En el día uno de la prueba, las células se transfirieron a un medio fresco completo RPMI 1640 con suero al 10% que contenía Epo (5 ng/ml) (10% de suero de donante bovino, 4mM L-glutamina, suplementado con 5 ng/ml de rhuEPO). Las células se cultivaron en frascos de 75 cm² con 20 ml del cultivo/frasco. En el día 2 de la prueba, las células se transfirieron al frasco

(o frascos) en un tubo cónico de 50 ml y se centrifugaron a 1,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el medio anterior y las células se lavaron dos veces con 10 ml de un medio de inanición (3 % suero de donante bovino, 4 mM glutamina). Las células fueron resuspendidas en un medio de inanición utilizando una pipeta que se acciona hacia arriba y hacia abajo para obtener una suspensión de células simples. Para determinar la densidad celular, las células resuspendidas se diluyeron con un medio de inanición hasta una densidad de 4×10^5 células/ml con un volumen total de cultivo de 10 ml y se colocaron en un frasco de 25 cm². La mezcla se incubó durante 4 horas en una incubadora humedecida con 5% de CO₂ a 37 °C. Durante la última hora de incubación se preparó una placa de 96 pozos. Al final de la cuarta hora de incubación, los cultivos celulares se retiraron de la incubadora y las células fueron transferidas de un frasco a un tubo cónico de 50 ml. El contenido se mezcló manualmente para mantener las células suspendidas. Se agregó 50 ml del medio de inanición como el blanco medio sin células. Cinco pozos eran las células de control sin reactivo. La siguiente fila adyacente de pozos contenía la concentración más baja de citoquinas recombinantes protectoras de tejido. Cada fila adyacente de pozos de allí en adelante fue llenada con concentraciones secuencialmente mayores. Los cultivos celulares que se incubaron en un medio con 3% de suero y sin EPO se colocaron en láminas a 200,000 células/ml y 100/μl por pozo en placas de 96 pozos. El contenido se mezcló lenta y cuidadosamente usando la plataforma vibradora orbital colocada en la parte superior de la placa de agitación. La placa se incubó a diferentes concentraciones de variantes Epo (desde 0,2 pM hasta 20 nM) durante 48 horas en un medio RPMI 1640 que contenía 3% de suero en un incubador humedecido con 5% de CO₂ a 37 °C. En el día cuarto del ensayo se sacó la placa de 96 pozos de la incubadora y se dejó a temperatura ambiente en la capota de fluido laminar. Inmediatamente, se cuantificó la bioactividad (absorción espectrofotométrica a 450 nm, sustraída de la absorción de fondo a 620 nm) midiendo formazan creado durante el metabolismo celular "metabolismo celular del colorante tetrazolio WST1, el cual se correlaciona con la viabilidad celular/número de células.

Resultados

Las células UT-7 mostraron un crecimiento estable y confiable en un medio que contenía EPO medio durante 3 meses.

K45D indujo un aumento de viabilidad de las células UT-7 dependientes de Epo en una forma de dosis dependiente con un EC₅₀ de 294.0. En comparación el EC₅₀ fue de 58,13 para Epo (Figura 35) y de 608 para Epo marcada (Epo WT). S100E no aumentó la viabilidad (más del 50%) de las células UT-7 dependientes de Epo en concentraciones <50 nM (es decir, dentro del rango medible). Por ello, K45D mostró potencia dentro del mismo orden de magnitud que Epo, mientras que S100E mostró por lo menos una

132
potencia 1000 veces menor en comparación con Epo.

R103E no aumentó la supervivencia de las células UT-7 dependientes de Epo en concentraciones hasta de 20 nM, es decir, su potencia comparada con Epo fue al menos de cuatro órdenes de magnitud más bajo. R150E indujo supervivencia de las células UT-7 dependientes de Epo en una dosis dependiente con un EC_{50} de 20 nM. En comparación, EC_{50} fue 66,5 para Epo (Epo #4) (Figura 36). Por ello, R150E mostró tres órdenes de magnitud de potencia más bajos en comparación con Epo.

La Figura 35 muestra las curvas de respuesta de concentración de Epo, K45D y S100E en células UT-7. Diferentes concentraciones de Epo, EpoWT, K45D y S100E se agregaron a las células UT-7. La viabilidad se midió 48 horas más tarde en la prueba WST-1. Los datos son promedio $\pm$ SD de tres experimentos diferentes cada uno por duplicado. La curva es un ajuste de curva de regresión no lineal.

La Figura 36 muestra curvas de respuesta de dosis de Epo, R103E y R150E en células UT-7. Diferentes concentraciones de Epo, EpoWT, R103E y R150E se agregaron a las células UT-7. La viabilidad se midió 48 horas más tarde en la prueba WST-1. Los datos son promedio $\pm$ SD de tres experimentos diferentes cada uno por duplicado. La curva es un ajuste de curva de regresión no lineal.

6.18 EJEMPLO 18: PROTECCIÓN CONTRA ISQUEMIA RETINAL CON CITOQUINA RECOMBINANTE PROTECTORA DE TEJIDO, ADMINISTRADA PERIFÉRICAMENTE

Tal como se describió en la sección 6.9, las células retinales son muy sensibles a isquemia, demodo que muchas mueren luego de 30 minutos de estrés isquémico. En este experimento, el modelo de glaucoma reversible en ratas se utilizó nuevamente tal como lo describe Rosenbaum et al. (1997; Vis. Res. 37:3443-51). Se examinaron los efectos de la citoquina recombinante protectora de tejido.

Se lesionó un ojo en cada una de las ratas según el protocolo señalado en el ejemplo presentado en la sección 6.9 para la inyección de solución salina en la cámara anterior del ojo de la rata macho adulta. En el momento de la reperusión es decir, cuando se libera la presión en la cámara anterior del ojo, a las ratas se les administró 10 μ g/kg de EPO, una de las cuatro citoquinas recombinantes protectoras de tejido: R103E, R150E, S100E, y S100E/K45D, o solución salina por vía intravenosa. En los días 1, 3, 5 y 6 siguientes a la lesión, se tomaron electrorretinogramas tanto en el ojo lesionado como normal de cada rata. La latencia en el ojo dañado de cada rata se comparó con la latencia en el ojo normal de la misma rata. Los datos se registraron como una relación de la latencia del ojo lesionado sobre la latencia del ojo normal, resultando en una relación de

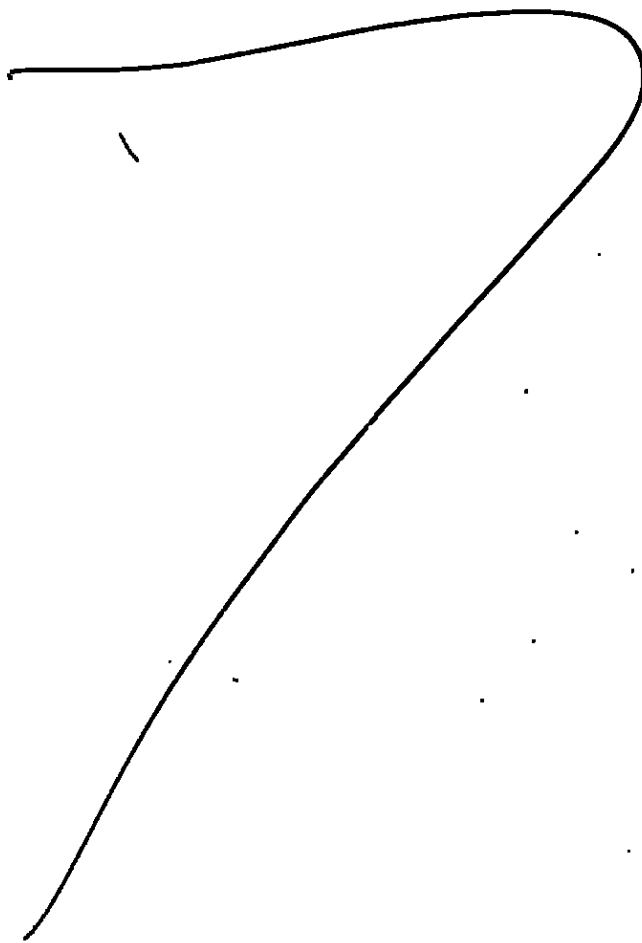
133

uno cuando el ojo dañado tiene una función normal. Hay dos componentes para los resultados de la lesión: amplitud (la diferencia entre el pico a la línea baja) tal como se muestra en la Figura 17, Panel A, indicado por 'b' y la latencia, el tiempo que toma para alcanzar el pico en respuesta al estímulo.

La Figura 38 muestra la relación de la latencia del ojo lesionado sobre la latencia del ojo normal para los varios regímenes de tratamiento. La rata tratada con EPO demostró una latencia de 1,2, que es mejor que el de la rata tratada con salina. Cada una de las cuatro citoquinas recombinantes protectoras de tejido resultó en resultados de latencia iguales o mejores que EPO con R103, R150E y S100E demostrando una mejora estadística sobre EPO

La invención no está limitada al alcance por realizaciones específicas descritas que tratan ser ilustraciones sencillas de aspectos individuales de la invención y métodos y componentes equivalentes funcionalmente que están dentro del alcance de la invención. De hecho varias modificaciones de la invención, adicionales a aquellas mostradas y descritas aquí serán aparentes para aquellas personas versadas en la materia de descripciones anteriores y dibujos anexos. Dichas modificaciones tratan estar dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

Todas las referencias aquí mencionadas se incorporan como referencia en su totalidad para todos los fines.



REIVINDICACIONES:

1. Una citoquina recombinante protectora de tejido de mutelna que le falta al menos una actividad seleccionada de un grupo consistente en aumento de hematocritos, acción vasoactiva, hiperactivación de plaquetas, actividades pro-coagulantes y aumento en la producción de trombocitos; la citoquina que comprende al menos una actividad protectora celular de respuesta seleccionada del grupo consistente en proteger, mantener, mejorar o restarurar la función o viabilidad de una célula de respuesta, tejido u órgano mamífero.
2. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 1, que comprende uno o más residuos de aminoácidos alterados entre la posición 11 a 15 de SEQ ID NO:10 [SEQ ID NO:1], posición 44 a 51 de SEQ ID NO 10 [SEQ ID NO:2], posición 100-108 de SEQ ID NO [SEQ ID NO:3], o posición 146-151 de SEQ ID NO 10 [SEQ ID NO:4].
3. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 1, que comprende uno o más residuos de aminoácidos alterados o una o más de las siguientes posiciones SEQ ID NO: 10: 7, 20, 21, 29, 33, 38, 42, 59, 63, 67, 70, 83, 96, 126, 142, 143, 152, 153, 155, 156 o 161.
4. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 1, que comprende las secuencias aminoácidas de SEQ ID NO: 10 con una o más substituciones de residuos de aminoácidos de SEQ ID NOs: 15-105 y 119.
5. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 1, que comprende la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 10 con una supresión de residuos de amino ácidos en 44-49 de SEQ ID NO: 10.
6. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 1, que comprende la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 10 con al menos una de las siguientes sustituciones de residuos de aminoácidos en SEQ ID NOs: 106-118.
7. La citoquina recombinante protectora de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además una modificación química de uno o más aminoácidos.

8. La citoquina recombinante protectora de la reivindicación 7, en donde la modificación química comprende alterar la carga de la citoquina recombinante protectora de tejido.
9. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 8, en donde carga positiva o negativa es adicionada químicamente a un residuo aminoácido, donde el residuo aminoácido es modificado a un residuo no cargado.
10. La citoquina recombinante protectora de tejido de cualquiera de las reivindicaciones de 1-6, en donde dicha citoquina es una muteína de eritropoyetina humana.
11. La citoquina recombinante protectora de tejido de cualquiera de las reivindicaciones de 1-6, en donde dicha citoquina es una muteína eritropoyetina de fenilglioxal.
12. La citoquina recombinante protectora de tejido de cualquiera de las reivindicaciones de 1-6, en donde la célula mamífera de respuesta comprende una célula neuronal, muscular, de corazón, pulmón, hígado, riñón, intestino delgado, corteza suprarrenal, médula suprarrenal, capilar, testículo, ovario, endotelial o de tallo.
13. La célula mamífera de respuesta la citoquina recombinante protectora de tejido de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que comprende una célula foto receptora de ganglio, bipolar, horizontal, amacrina, Muller, miocardio, marcapaso, nodo sinusal, nodo sinus, nodo atrio ventricular, haz de His, hepatocito, estelada, Kupffer, mesagial, glándula intestinal, endocrina enteral, glomerulosa, fasciculada, reticularis, cromafina, pericito, Leydig, Sertoli, espermatozoide, folículos Graafian, folículos primordiales, estroma endometrial y célula endometrial.
14. La citoquina recombinante protectora de tejido de cualquiera de las reivindicaciones de 1-6 en donde dicha citoquina puede atravesar la barrera de células endoteliales.
15. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 14, en donde la barrera de células endoteliales comprende la barrera sangre-cerebro, sangre-ojo, sangre-testículos, sangreovario y sangre-útero.
16. La citoquina recombinante protectora de tejido de cualquiera de las reivindicaciones de 1-6, en donde dicha citoquina es seleccionada de un grupo que consiste de:
 - i. una citoquina que tiene un número reducido o ningún medio de mitad de ácido siálico;
 - ii. una citoquina que tiene un número reducido o ningún carbohidrato enlazado N o enlazado O;
 - iii. una citoquina que tiene al menos un contenido de carbohidrato reducido en virtud del tratamiento de citoquina nativa con al menos una glicosidasa;
 - iv. una citoquina que tiene al menos uno o más carbohidratos oxidados;

- v. una citoquina que tiene al menos uno o más carbohidratos oxidados y está reducida químicamente;
 - vi. una citoquina que tiene al menos uno o más residuos de arginina modificados;
 - vii. una citoquina que tiene al menos uno o más residuos de lisina modificados o una modificación del grupo amino de terminal N de una molécula de citoquina;
 - viii. una citoquina que tiene al menos un residuo de tirosina modificado;
 - ix. una citoquina que tiene al menos un residuo de ácido aspártico o de ácido glutámico modificado;
 - x. una citoquina que tien un residuo de tritofan modificado;
 - xi. una citoquina a la que se le ha removido al menos un grupo aminoácido;
 - xii. una citoquina que tiene al menos una abertura de al menos uno de los enlaces de cisteína en la molécula de citoquina;
 - xiii. una citoquina truncada;
 - xiv. una citoquina que tiene fija al menos una molécula de polietilen glicol;
 - xv. una citoquina que fijo al menos un ácido graso;
 - xvi. una citoquina que tiene un patrón de glicosilación no mamífero en virtud de la expresión de citoquina recombinante en células no-mamíferas; y
 - xvi. una citoquina que tiene al menos un aminoácido marcado con histidina para facilitar la purificación.
17. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 16 en donde dicha citoquina es un asialoeritropoyetina.
18. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 17, en donde dicha asialoeritropoyetina es asialoeritropoyetina humana.
19. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 16, en donde dicha citoquina es hiposialilada o hipersialilada.
20. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 16, en donde dicha citoquina comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o 13 medios de ácido siálico .
21. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 16, en donde dicha citoquina comprende mas de 14 medios de ácido siálico presentes en eritropoyetina nativa.

22. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 16, en donde dicha citoquina es una eritropoyetina sin carbohidratos enlazados N.
 23. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 22, en donde dicha citoquina es una eritropoyetina sin carbohidratos enlazados O.
 24. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 16, en donde dicha citoquina es tratada con al menos una glicosidasa.
 25. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 16, en donde dicha citoquina es eritropoyetina oxidada con periodato.
 26. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 25, en donde dicha eritropoyetina oxidada con periodato es reducida químicamente con cianoborohidruro sódico.
 27. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 1116, en donde dicha citoquina comprende un medio R-glioxal en uno o más de los residuos de arginina, en donde R es un medio arilo o alquilo.
 28. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 27, en donde dicha citoquina es fenilglioxal-eritropoyetina.
 29. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 16, en donde dicha citoquina es una eritropoyetina en la que un residuo de arginina es modificado por reacción con una dicetona vecinal seleccionada del grupo compuesto por 2,3-butanediona y ciclohexanediona.
 30. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 16, en donde dicha citoquina es una eritropoyetina en la que un residuo de arginina es reaccionado con 3-deoxiglucosona.
 31. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 16, en donde dicha citoquina es una molécula que tiene al menos un grupo amino de terminal N o lisina biotinilado.
 32. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 16, en donde dicha citoquina es una eritropoyetina de glucitolil lisina o una eritropoyetina de fructosil lisina.
 33. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 16, en donde dicha citoquina comprende al menos un residuo de lisina carbamylado.
 34. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 16, en donde dicha citoquina comprende al menos un residuo de lisina carbamylado.
- La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 33, en donde dicha citoquina carbamylada comprende alfa-N-carbamoyl-eritropoyetina; N-epsilon-

carbamoileritropoyetina; alfa-N-carbamoil, N-epsilon-carbamoileritropoyetina; alfa-N-carbamoilasialoeritropoyetina; N-epsilon-carbamoilasialoeritropoyetina; alfa-N-carbamoil, N-epsilon-carbamoilasialoeritropoyetina; alfa-N-carbamoilhiposialoeritropoyetina; N-epsilon-carbamoilhiposialoeritropoyetina; y alfa-N-carbamoil, N-epsilon-carbamoilhiposialoeritropoyetina

35. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 16, en donde dicha citoquina comprende al menos un residuo de lisina acilado.

36. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 35, en donde dicha citoquina comprende al menos un residuo de lisina acilado.

37. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 36, en donde dicha citoquina comprende al menos un residuo de lisina acilado.

38. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 37, en donde dicha citoquina acetilada comprende alfa-N-acetileritropoyetina; N-epsilon-acetileritropoyetina; alfa-N-acetil, N-epsilon-acetileritropoyetina; alfa-N-acetilasialoeritropoyetina; N-epsilon-acetilasialoeritropoyetina; alfa-N-acetil, N-epsilon-acetilasialoeritropoyetina; alfa-N-acetilhiposialoeritropoyetina; N-epsilon-acetilhiposialoeritropoyetina; y alfa-N-acetil, N-epsilon-acetilhiposialoeritropoyetina.

39. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 35, en donde un residuo de lisina de dicha citoquina es succinilado.

40. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 39, en donde dicha citoquina succinilada comprende alfa-N-succinileritropoyetina; N-epsilon-succinileritropoyetina; alfa-N-succinil, N-epsilon-succinileritropoyetina; alfa-N-succinilasialoeritropoyetina; N-epsilon-succinilasialoeritropoyetina; alfa-N-succinil, N-epsilon-succinilasialoeritropoyetina; alfa-N-succinilhiposialoeritropoyetina; N-epsilon-succinilhiposialoeritropoyetina; y alfa-N-succinil, N-epsilon-succinilhiposialoeritropoyetina.

41. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 16, en donde dicha citoquina comprende al menos un residuo de lisina modificado por 2, 4, 6 trinitrobenzenosulfonato sódico u otra sal del mismo.

42. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 16, en donde dicha citoquina comprende al menos un residuo de tiosina nitrado o iodinado.

43. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 16, en donde dicha citoquina comprende un residuo de ácido aspártico o de ácido glutámico que es reaccionado con una carbodimida seguido por una reacción con una amina.

- 139
44. La citoquina recombinante protectora de tejido de la reivindicación 16, en donde dicha amina es glicinamida.
 45. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleótida que codifica un polipéptido que comprende la citoquina recombinante protectora de tejido de cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
 46. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 45
 47. Un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 45 y al menos una región reguladora enlazada de manera operativa a la molécula de ácido nucleico.
 48. El vector de la reivindicación 46 ó 47 que es un vector pCiNeo.
 49. Una célula diseñada genéticamente que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 45.
 50. Una célula que comprende el vector expresión según la reivindicación 45.
 51. Una composición farmacéutica que comprende una citoquina recombinante protectora de tejido de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que le falta al menos una actividad seleccionada del grupo compuesto por aumento de hematocritos, acción vasoactiva, hiperactivación de plaquetas, actividades pro-coagulantes y aumento en la producción de trombocitos; la citoquina tiene al menos una actividad protectora celular de respuesta seleccionada del grupo consistente en proteger, mantener, mejorar o restaurar la función oviabilidad de una célula, tejido u órgano mamífero de respuesta.
 52. La composición farmacéutica de la reivindicación 51, formulada para administración oral, intranasal o parenteral.
 53. La composición farmacéutica de la reivindicación 51, formulada como una solución perfusada.
 54. Un método para proteger, mantener o mejorar la viabilidad de una célula, tejido u órgano aislado de un cuerpo mamífero, que comprende exponer dicha célula, tejido u órgano a una composición farmacéutica que comprende una citoquina recombinante protectora de tejido de muteína.
 55. El método de reivindicación 54, en donde la protección no afecta la médula ósea.
 56. Un método para proteger, mantener o mejorar la viabilidad de una célula, tejido o órgano aislado de un cuerpo mamífero, que comprende enexponer dicha célula, tejido u órgano a una composición farmacéutica que comprende una citoquina recombinante protectora de tejido de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, a la que le falta al menos una actividad seleccionada del grupo compuesto por aumento de hematocritos, acción

vasoactiva, hiperactivación de plaquetas, actividad pro-coagulante y aumento en la producción de trombocitos.

57. El uso de una citoquina recombinante protectora de tejido según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 a la que le falta al menos una actividad seleccionada del grupo compuesto por aumento de hematocritos, acción vasoactiva, hiperactivación de plaquetas, actividad pro-coagulante y aumento en la producción de trombocitos, para la preparación de una composición farmacéutica para la protección y prevención de lesiones en tejidos, así como la restauración y rejuvenecimiento de tejidos y función de los tejidos en un mamífero.

58. El uso según la reivindicación 57, en donde la lesión es causada por un trastorno convulsivo, esclerosis múltiple, ataque, hipotensión, paro cardíaco, isquemia, infarto del miocardio, inflamación, pérdida de la función cognitiva asociada con la edad, daño por radiación, parálisis cerebral, enfermedad neurodegenerativa, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, enfermedad de Leigh, SIDA, demencia, pérdida de la memoria, esclerosis lateral amiotrófica, alcoholismo, trastorno depresivo, ansiedad, trastorno de falta de atención, autismo, enfermedad Creutzfeld-Jakob, trauma o isquemia cerebral o la médula espinal, bypass cardíaco-pulmonar, falla cardíaca crónica, degeneración macular, neuropatía diabética, retinopatía diabética, glaucoma, isquemia retinal o trauma retinal.

59. Un método para facilitar la transcitosi de una molécula a través de una barrera de células endoteliales, que comprende administrar a dicho mamífero una composición que comprende dicha molécula en asociación con una citoquina recombinante protectora de tejido de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que le falta al menos una actividad seleccionada de un grupo que consiste en aumento de hematocritos, acción vasoactiva, hiperactivación de plaquetas, actividad pro-coagulante y aumento en la producción de trombocitos.

60. El método de la reivindicación 59, en donde dicha asociación es un enlace covalente lábil, un enlace covalente estable o una asociación no covalente con un sitio de enlace de dicha molécula.

61. El método de la reivindicación 59, en donde dicha barrera de células endoteliales es seleccionada del grupo compuesto por la barrera sangre-cerebro, sangre-ojo, sangre-testículos, sangre-ovarios, sangre-corazón, sangre-riñón y sangre-placenta.

62. El método de la reivindicación 59, en donde dicha molécula es una hormona receptora, agonista o antagonista, un factor neurotrófico, un agente antimicrobiano, un agente antiviral, un producto radiofarmacéutico, un oligonucleótido antisentido, un anticuerpo, un inmunosupresor, un colorante, un marcador o un medicamento

141
anticancerígeno.

63. Una composición para transportar una molécula vía transcitosis a través de una barrera de células endoteliales que comprende dicha molécula en asociación con una citoquina recombinante protectora de tejido según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, a la que le falta al menos una actividad seleccionada del grupo compuesto por aumento de hematocritos, acción vasoactiva, hiperactivación de plaquetas, actividad pro-coagulante y aumento en la producción de trombocitos.

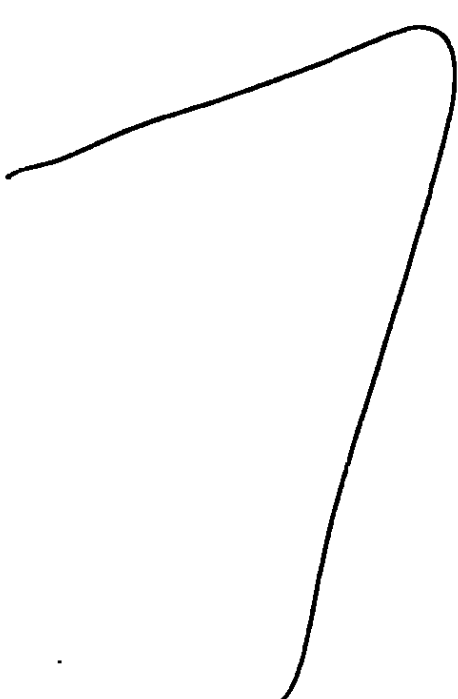
64. La composición de la reivindicación 63, en donde dicha asociación es un enlace covalente lábil, una enlace covalente estable, o una asociación no covalente con un sitio de enlace de dicha molécula

65. La composición de la reivindicación 63, en donde dicha molécula es una hormona receptora, agonista o antagonista, un factor neurotrófico, un agente antimicrobiano, un producto radiofarmacéutico, un oligonucleótido antisentido, un anticuerpo, un inmunosupresor, un colorante, un marcador, o un medicamento anticancerígeno.

66. El uso de una citoquina recombinante protectora de tejido o de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que le falta al menos una actividad seleccionada del grupo compuesto por aumento de hematocritos, acción vasoactiva, hiperactivación de plaquetas, actividad pro-coagulante y aumento en la producción de trombocitos.

67. El uso de la reivindicación 66, en donde dicha asociación es un enlace covalente lábil o una asociación no covalente con un sitio de enlace para dicha molécula.

68. El uso de la reivindicación 66, en donde dicha molécula es una hormona receptora, agonista o antagonista, un factor neurotrófico, un agente antimicrobiano, un radiofarmacéutico, un oligonucleótido antisentido, un anticuerpo, un inmunosupresor, un colorante, un marcador o un medicamento anticancerígeno.



142

RESUMEN

Se proveen métodos y composiciones para proteger o mejorar una célula de respuesta, tejido, órgano o función o viabilidad de una parte corporal *in vivo*, *in situ* o *ex vivo* en mamíferos, incluidos seres humanos, mediante la administración sistémica o local de un modulador de actividad receptora de eritropoyetina, tal como una citoquina recombinante protectora de tejido.

(183)

SEQUENCE LISTING

<110> Nielsen, J
Pedersen, J.
Gerwien, J.
Bay, K.
Pedersen, L.
Leist, M.
Geist, M.
Kallunki, P.
Christensen, S.
Sager, T.
Brines, M.
Cerami, A.
Cerami, C.

<120> RECOMBINANT TISSUE PROTECTIVE CYTOKINES AND ENCODING NUCLEIC
ACIDS THEREOF FOR PROTECTION, RESTORATION, AND ENHANCEMENT OF
RESPONSIVE CELLS, TISSUES AND ORGANS

<130> 10165-022-999

<140>

<141>

<150> 60/392,455

<151> 2002-07-01

<150> 60/393,423

<151> 2002-07-03

<160> 212

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Val Leu Gln Arg Tyr
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu
1 5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

149

Ser Asn Phe Leu Arg Gly
1 5

<210> 5
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 5

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Glu Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 6
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

145

<400> 6

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 7

<211> 580

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggctttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60
ctgggcctcc cagtcctggg cgtcccaacca cgctcatct gtgacagccg agtcctggag 120
aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cgggctgtgc tgaacactgc 180
agcttgaatg agaatatcac tgtcccagac accaaagtta atttctatgc ctggaagagg 240
atggagggtcg ggcagcaggc cgtagaagtc tggcagggcc tggccctgct gtcggaagct 300
gtcctgcggg gccaggccct gttggtcaac tcttcccagc cgtgggagcc cctgcactgc 360
atgtggataa agccgtcagt ggccttcgca gcctcaccac tctgcttcgg gctctgggag 420

146

cccagaagga agccatctcc cctccagatg cggcctcagc tgctccactc cgaacaatca 480
 ctgctgacac ttctgcaaac tcttccgagt ctactccaat ttcctccggg gaaagctgaa 540
 gctgtacaca ggggaggcct gcaggacagg ggacagatga 580

<210> 8
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 8
 agctctcgag gcgcggagat ggggggtgcac gaatg 35

<210> 9
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 9
 atgctctaga cacacctggt catctgtccc ctgtcc 36

<210> 10
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

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

147

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 11
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 11
catgtggata aagccgtcga gggccttcgc agcctcacca ctctg 45

<210> 12
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 12
cagagtgggtg aggctgcgaa ggccctcgac ggctttatcc acatg 45

<210> 13
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 13
gagaatatca ctgtcccaga caccgacgtt aatttctatg cctgg 45

<210> 14
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 14
ccaggcatag aaattaacgt cggtgtctgg gacagtgata ttctc 45

<210> 15
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 15

148

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 16
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 16

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

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

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

1269

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 17
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 17

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 18
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 18

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 19
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 19

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

152

Arg

<210> 20
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 20
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 21
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

153

<400> 21

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 22

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 22

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

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

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

154

35

40

45

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 23
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 23

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu

155

	85		90		95
Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser	100		105		110
Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly	115		120		125
Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu	130		135		140
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile	145		150		155
Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu		165		170	175
Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp		180		185	190

Arg

<210> 24
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 24

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu	1	5	10	15
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu	20	25	30	
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Gln Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu	35	40	45	
Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu	50	55	60	
Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg	65	70	75	80
Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu	85	90	95	
Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser	100	105	110	
Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly	115	120	125	
Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu				

156

130

135

140

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 25
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein
<400> 25

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

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

158

180

185

190

Arg

<210> 26
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 26

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 27
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

158

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 27

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 28

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 28

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

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

159

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 29
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein
<400> 29

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

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

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

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

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

168

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 30
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein
<400> 30

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 31
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein
<400> 31

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

162

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 32
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 32

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 33
<211> 193
<212> PRT

163

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 33

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45
Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60
Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80
Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95
Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110
Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125
Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160
Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175
Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 34

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 34

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

164

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu	20	25	30
35 40 45			
Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Asn Glu His Cys Ser Leu Asn Glu			
50 55 60			
Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg			
65 70 75 80			
Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu			
85 90 95			
Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser			
100 105 110			
Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly			
115 120 125			
Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu			
130 135 140			
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile			
145 150 155 160			
Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu			
165 170 175			
Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp			
180 185 190			

Arg

<210> 35
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 35

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

65				70				75				80			
Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu
			85						90					95	
Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu	Leu	Val	Asn	Ser	Ser
			100						105				110		
Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ser	Gly
			115				120						125		
Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu
			130				135					140			
Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Leu	Arg	Thr	Ile
					150					155					160
Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val	Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu
					165				170					175	
Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala	Cys	Arg	Thr	Gly	Asp
			180						185				190		

166

115		120		125
Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu				
130		135		140
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile				
145		150		155
Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu				
		165		170
Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp				
		180		185
				190

Arg

<210> 37
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 37

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu				
1		5		10
				15
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu				
		20		25
				30
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu				
		35		40
				45
Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Tyr Ser Leu Asn Glu				
		50		55
				60
Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg				
65		70		75
				80
Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu				
		85		90
				95
Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser				
		100		105
				110
Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly				
		115		120
				125
Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu				
		130		135
				140
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile				
145		150		155
				160
Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu				

165

170

175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 38
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 38

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 39

168

<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 39

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

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

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 40
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 40

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 41
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 41

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

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

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

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

170

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 42
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 42

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

171

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 43
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 43

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

172

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 44
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 44

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

193

<210> 45
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 45

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 46
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 46

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu

175

50

55

60

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 48
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein
<400> 48

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser

176

100

105

110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 49
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 49

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile

197

```

145                150                155                160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
      165                170                175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
      180                185                190

Arg

<210> 50
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 50

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
      85                90                95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
      100               105               110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
      115               120               125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
      165                170                175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
      180                185                190

Arg

```

178

<210> 51
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 51

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 52
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 52

179

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45
Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60
Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Phe Lys Arg
65 70 75 80
Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95
Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110
Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125
Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160
Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175
Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 53
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 53

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

180

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 54
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 54

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

181

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 55
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 55

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

182

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 56
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 56

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Thr Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

143

Arg

<210> 57
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 57

Met	Gly	Val	His	Glu	Cys	Pro	Ala	Trp	Leu	Trp	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	1	5	10	15
Leu	Ser	Leu	Pro	Leu	Gly	Leu	Pro	Val	Leu	Gly	Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	20	25	30	
Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	35	40	45	
Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His	Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	50	55	60	
Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe	Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	65	70	75	80
Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp	Gln	Gly	Ser	Ala	Leu	85	90	95	
Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu	Leu	Val	Asn	Ser	Ser	100	105	110	
Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ser	Gly	115	120	125	
Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	130	135	140	
Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	145	150	155	160
Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val	Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	165	170	175	
Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala	Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	180	185	190	

Arg

<210> 58
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

1984

<400> 58

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Ala Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 59

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 59

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

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

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

185

35

40

45

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Arg Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 60
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 60

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu

186

85

90

95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Ala Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 61
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 61

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Arg Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu

187

130

135

140

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 62
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 62

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Glu Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

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

188

180

185

190

Arg

<210> 63
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 63

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ala Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 64
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

189

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 64

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Thr Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 65

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 65

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

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

190

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Ala
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 66
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 66

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

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

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 67
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 67

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

192

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 68
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 68

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

193

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 69
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 69

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 70
 <211> 193
 <212> PRT

194

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 70

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 71

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 71

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

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu

195

20					25					30					
Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ala	Lys	Glu
	35						40					45			
Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His	Cys	Ser	Leu	Asn	Glu
	50					55					60				
Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe	Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg
65					70					75					80
Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu
			85						90					95	
Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu	Leu	Val	Asn	Ser	Ser
			100					105					110		
Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ser	Gly
		115					120					125			
Leu	Arg	Ile	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu
	130					135					140				
Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Leu	Arg	Thr	Ile
145					150					155					160
Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val	Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu
				165					170					175	
Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala	Cys	Arg	Thr	Gly	Asp
		180						185					190		

Arg

<210> 72
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 72

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

65		70		75		80									
Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu
			85					90					95		
Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu	Leu	Val	Asn	Ser	Ser
		100					105					110			
Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ser	Gly
		115					120					125			
Leu	Arg	Ser	Ala	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu
	130					135					140				
Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Leu	Arg	Thr	Ile
145					150					155					160
Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val	Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu
				165					170					175	
Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala	Cys	Arg	Thr	Gly	Asp
		180						185					190		

Arg

<210> 73
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 73

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

115

120

125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

- <210> 74
- <211> 193
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 74

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu

198

165

170

175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 75
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 75

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 76

<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 76

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85          90          95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100         105         110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115         120         125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165         170         175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180         185         190
```

Arg

<210> 77
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 77

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 78
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 78

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

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

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

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

201

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 79
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 79

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

202

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 80
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 80

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

202

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 81
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 81

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

204

<210> 82
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 82

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Ala Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 83
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 83

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu

1			5			10			15						
Leu	Ser	Leu	Pro	Leu	Gly	Leu	Pro	Val	Leu	Gly	Ala	Pro	Pro	Arg	Leu
		:	20					25					30		
Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ala	Lys	Glu
		35					40					45			
Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His	Cys	Ser	Leu	Asn	Glu
	50					55					60				
Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe	Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg
65					70					75					80
Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu
				85					90					95	
Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu	Leu	Val	Asn	Ser	Ser
			100					105					110		
Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ser	Gly
		115					120					125			
Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu
	130					135					140				
Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala
145					150					155					160
Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val	Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu
				165					170					175	
Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala	Cys	Arg	Thr	Gly	Asp
			180					185					190		

Arg

<210>	84
<211>	193
<212>	PRT
<213>	Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 84

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

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

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

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu

206

50

55

60

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Ala Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 85
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 85

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser

207

100	105	110
Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly 115 120 125		
Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu 130 135 140		
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile 145 150 155 160		
Thr Ala Asp Thr Phe Arg Ala Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu 165 170 175		
Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp 180 185 190		

Arg

<210> 86
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 86

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu 1 5 10 15		
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu 20 25 30		
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu 35 40 45		
Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu 50 55 60		
Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg 65 70 75 80		
Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu 85 90 95		
Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser 100 105 110		
Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly 115 120 125		
Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu 130 135 140		
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile		

145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Ile Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

```
<210> 87
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial
```

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> B7

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Ala Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

209

<210> 88
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 88

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ala Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 89
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 89

210

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45
Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60
Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80
Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95
Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110
Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125
Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160
Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Lys Phe Leu
165 170 175
Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 90
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 90

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Ala Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 91
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 91

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

212
1

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Tyr Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 92
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 92

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

213

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Ala Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 93
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 93

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Ala
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 94
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 94

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Ala Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 95
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

215

<400> 95

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Glu Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 96

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 96

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

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

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

216

35

40

45

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Ala Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 97
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein
<400> 97

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu

217

85

90

95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Ala Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 98
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 98

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu

218

130

135

140

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Trp Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 99
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 99

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

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

219

180

185

190

Arg

<210> 100
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 100

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Ala Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 101
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

220

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 101

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 102

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 102

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

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

221

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Ala Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 103
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein
<400> 103

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

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

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

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

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

222

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Ser Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 104
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 104

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Ala Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 105
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 105

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

223
203

224

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Ala Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 106
<211> 192
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 106

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

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

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

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

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

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

Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln
100 105 110

Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Glu Gly Leu
115 120 125

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

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

Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg
165 170 175

Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg
180 185 190

<210> 107
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

225

<400> 107

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 108

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 108

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

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

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

226

35	40	45
Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu 50 55 60		
Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Asp Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg 65 70 75 80		
Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu 85 90 95		
Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser 100 105 110		
Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly 115 120 125		
Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu 130 135 140		
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile 145 150 155 160		
Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu 165 170 175		
Glu Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp 180 185 190		

Arg

<210> 109
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 109

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

85 90 95
 Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110
 Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125
 Leu Glu Ser Leu Thr Thr Ser Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140
 Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160
 Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175
 Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 110
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 110

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30
 Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45
 Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60
 Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Ala Arg
 65 70 75 80
 Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95
 Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110
 Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125
 Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu

22

28
N

130

135

140

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Ala Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 111
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein
<400> 111

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Ala Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

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

229

180

185

190

Arg

<210> 112
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 112

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45
Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60
Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80
Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95
Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110
Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125
Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160
Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175
Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 113
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

1230

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 113

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Ala Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Ala Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 114

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 114

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

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

231

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Ala Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Ala Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 115
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 115

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

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

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

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

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

232

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Ala Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Ala Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Ala Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 116
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 116

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Ala Ala Val Ser Gly
115 120 125

233

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Ala Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Ala Leu Ala Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 117
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 117

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

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

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

234

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 118
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 118

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 119
<211> 193
<212> PRT

245

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 119

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

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

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

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

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

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 120

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 120

gtctactcca atttcctcga gggaaagctg aagctg

36

<210> 121

<211> 34

<212> DNA

236

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 127
ccagagccccg aagcgaagtg gtgaggctgc g 31

<210> 128
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 128
gaatatcact gtcccagacg gtggtgcctg gaagaggatg 40

<210> 129
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 129
catcctcttc caggcaccac cgtctgggac agtgatattc 40

<210> 130
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 130
tacctcttgg aggccgcgga ggccgagaat atc 33

<210> 131
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 131
gatattctcg gcctccgcgg cctccaagag gta 33

<210> 132
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 132
gctgacactt tccgcgcact cttccgagtc tactc 35

<210> 133
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

```

237

<400> 133
gagtagactc ggaagagtgc gcggaaagtg tcagc 35

<210> 134
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 134
atttcctccg gggagcgctg aagctgtaca cag 33

<210> 135
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 135
ctgtgtacag cttcagcgct ccccgaggga aat 33

<210> 136
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 136
ctccggggaa agctggcgct gtacacaggg ga 32

<210> 137
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 137
tcccctgtgt acagcgccag ctttccccgg ag 32

<210> 138
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 138
actgtcccag acaccgcagt taattttctat gcctg 35

<210> 139
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 139

258

caggcataga aattaactgc ggtgtctggg acagt

35

<210> 140
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 140
agttaatttc tatgcctggg cgaggatgga ggtcg

35

<210> 141
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 141
cgacctccat cctcgcccag gcatagaaat taact

35

<210> 142
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 142
tgcagctgca tgtggatgca gccgtcagtg gcc

33

<210> 143
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 143
ggccactgac ggctgcatcc acatgcagct gca

33

<210> 144
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 144
ctctgggagc ccaggcggaa gccatctccc ct

32

<210> 145
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 145
aggggagatg gcttccgcct gggctcccag ag

32

229

<210> 146
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 146
gctgacactt tccgcgcact cttccgagtc tactc 35

<210> 147
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 147
gagtagactc ggaagagtgc gcggaaagtg tcagc 35

<210> 148
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 148
agttaatttc tatgcctggg cgaggatgga ggtagc 35

<210> 149
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 149
cgacctccat cctcgcccag gcatagaaat taact 35

<210> 150
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 150
gctgacactt tccgcgcact cttccgagtc tactc 35

<210> 151
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 151
gagtagactc ggaagagtgc gcggaaagtg tcagc 35

<210> 152

240

<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 152
agttaatttc tatgcctggg cgaggatgga ggtcg 35

<210> 153
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 153
cgacctccat cctcgcccag gcatagaaat taact 35

<210> 154
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 154
actgtcccag acaccgcagt taattttctat gcctg 35

<210> 155
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 155
caggcataga aattaactgc ggtgtctggg acagt 35

<210> 156
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 156
tgcagctgca tgtggatgca gccgtcagtg gcc 33

<210> 157
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 157
ggccactgac ggctgcatcc acatgcagct gca 33

<210> 158
<211> 33
<212> DNA

241

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 158

atttcctccg gggagcgctg aagctgtaca cag

33

<210> 159

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 159

ctgtgtacag cttcagcgct ccccgaggga aat

33

<210> 160

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 160

tgcagctgca tgtggatgca gccgtcagtg gcc

33

<210> 161

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 161

ggccactgac ggctgcatcc acatgcagct gca

33

<210> 162

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 162

atttcctccg gggagcgctg aagctgtaca cag

33

<210> 163

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 163

ctgtgtacag cttcagcgct ccccgaggga aat

33

<210> 164

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

242

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 164
actgtcccag acaccgcagt taatttctat gcctg 35

<210> 165
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 165
caggcataga aattaactgc ggtgtctggg acagt 35

<210> 166
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 166
tgcagctgca tgtggatgca gccgtcagtg gcc 33

<210> 167
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 167
ggccactgac ggctgcatcc acatgcagct gca 33

<210> 168
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 168
atttcctccg gggagcgtg aagctgtaca cag 33

<210> 169
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 169
ctgtgtacag cttcagcgct ccccgaggga aat 33

<210> 170
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

243

<400> 170
actgtcccag acaccgcagt taatttctat gcctg 35

<210> 171
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 171
caggcataga aattaactgc ggtgtctggg acagt 35

<210> 172
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 172
agttaatttc tatgcctggg cgaggatgga ggtcg 35

<210> 173
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 173
cgacctccat cctcgcccag gcatagaaat taact 35

<210> 174
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 174
tgcagctgca tgtggatgca gccgtcagtg gcc 33

<210> 175
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 175
ggccactgac ggctgcatcc acatgcagct gca 33

<210> 176
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 176

244

atttcctccg gggagcgctg aagctgtaca cag 33

<210> 177
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 177
ctgtgtacag cttcagcgct ccccgaggga aat 33

<210> 178
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 178
actgtcccag acaccgcagt taatttctat gcctg 35

<210> 179
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 179
caggcataga aattaactgc ggtgtctggg acagt 35

<210> 180
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 180
agttaatttc tatgcctggg cgaggatgga ggtcg 35

<210> 181
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 181
cgacctccat cctcgcccag gcatagaaat taact 35

<210> 182
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 182
gctgacactt tccgcgcact cttccgagtc tactc 35

245

<210> 183
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 183
gagtagactc ggaagagtgc gcggaaagtg tcagc 35

<210> 184
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 184
tgcagctgca tgtggatgca gccgtcagtg gcc 33

<210> 185
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 185
ggccactgac ggctgcatcc acatgcagct gca 33

<210> 186
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 186
atttcctccg gggagcgctg aagctgtaca cag 33

<210> 187
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 187
ctgtgtacag cttcagcgct ccccgaggga aat 33

<210> 188
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 188
actgtcccag acaccgcagt taattttctat gcctg 35

<210> 189

246

<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 189
caggcataga aattaactgc ggtgtctggg acagt 35

<210> 190
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 190
agttaatttc tatgcctggg cgaggatgga ggtcg 35

<210> 191
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 191
cgacctccat cctcgcccag gcatagaaat taact 35

<210> 192
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 192
gctgacactt tccgcgcact cttccgagtc tactc 35

<210> 193
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 193
gagtagactc ggaagagtgc gcggaaagtg tcagc 35

<210> 194
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 194
ctccggggag cgctggcgct gtacacaggg ga 32

<210> 195
<211> 32
<212> DNA

247

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 195

tcccctgtgt acagcgccag cgctccccgg ag

32

<210> 196

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 196

caaggaggcc gagaaaatca cgacgggctg t

31

<210> 197

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 197

acagcccgtc gtgattttct cggcctcctt g

31

<210> 198

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 198

actgcagctt gaatgagaaa atcactgtcc cagacac

37

<210> 199

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 199

gtgtctggga cagtgatttt ctcatccaag ctgcagt

37

<210> 200

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 200

aggccctgtt ggtcaaatct tcccagccgt g

31

<210> 201

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

248
248

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 201
cacggctggg aagatttgac caacagggcc t 31

<210> 202
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 202
atttcctccg gggatggctg aagctgtaca cag 33

<210> 203
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 203
ctgtgtacag cttcagccat ccccgaggga aat 33

<210> 204
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 204
agccgagtc tggaggcggc cctcttgag gccaa 35

<210> 205
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 205
ttggcctcca agagggccgc ctccaggact cggct 35

<210> 206
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 206
agccgagtc tggagagggc cctcttgag gccaa 35

<210> 207
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

249

<400> 207
ttggcctcca agagggccct ctccaggact cggct

35

<210> 208
<211> 6059
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: plasmid

<400> 208
ctagagtcga cccgggaggc cgcttcctt tagtgagggt taatgcttcg agcagacatg 60
ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaag aaaatgcttt 120
atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaacia 180
gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcagggtc agggggagat gtgggagggt 240
ttttaaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtaaaatcc gataaggatc gatccgggct 300
ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagtgcgc agcctgaatg 360
gcgaatggac gcgccctgta gcggcgcatc aagcgaggcg ggtgtggtgg ttacgcgcag 420
cgtgaccgct acacttgcca gcgccctagc gcccgctcct ttcgctttct tcccttcctt 480
tctcgccacg ttcgcccggct ttccccgtca agctctaaat cgggggctcc ctttaggggt 540
ccgatttagt gctttacggc acctcgacct caaaaaactt gattaggggtg atggttcacg 600
tagtgggcca tcgccctgat agacgggtttt tcgccctttg acgttgagat ccacgttctt 660
taatagtggc ctcttggtcc aaactggaac acaactcaac cctatctcgg tctattcttt 720
tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctattgggta aaaaatgagc tgatttaaca 780
aaaatttaac gcgaatttta acaaaatatt aacgcttaca atttcctgat gcgggtatatt 840
ctccttacgc atctgtgagg tatttcacac cgcatacggc gatctgcgc gcacatggc 900
ctgaaataac ctctgaaaga ggaacttggt taggtacctt ctgaggcgga aagaaccagc 960
tgtggaatgt gtgtcagttt ggggtgggaa agtccccagg ctccccagca ggcagaagta 1020
tgcaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa ccagggtgtgg aaagtcccca ggctccccag 1080
caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa 1140
ctccgcccct cccgccccta actccgccc gttccgccc ttctccgccc catggctgac 1200
taattttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt 1260
agtgaggagg ctttttttga ggcctaggct tttgcaaaaa gcttgattct tctgacacaa 1320
cagtctcgaa cttaaggcta gagccacctt gattgaacaa gatggattgc acgcagggtc 1380
tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggtg 1440
ctctgatgcc gccgtgttcc ggtgtgcagc gcagggggcg ccggttcttt ttgtcaagac 1500
cgacctgtcc ggtgcctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat cgtggctggc 1560
cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgct actgaagcgg gaagggactg 1620
gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg ctctgccga 1680
gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc cggctacctg 1740
cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga tggagccgg 1800

tcttgtcgat	caggatgatc	tggacgaaga	gcatcagggg	ctcgcgccag	ccgaactggt	1860
cgccaggctc	aaggcgcgca	tgcccgcgag	cgaggatctc	gtcgtgaccc	atggcgatgc	1920
ctgcttgccg	aatatcatgg	tggaaaatgg	ccgcttttct	ggattcatcg	actgtggccg	1980
gctgggtgtg	gcggaaccgt	atcaggacat	agcgttggct	acccgtgata	ttgctgaaga	2040
gcttggcggc	gaatgggctg	accgcttcct	cgtgctttac	ggtatcgccg	ctcccgattc	2100
gcagcgcata	gcctttctatc	gcctttcttga	cgagttcttc	tgagcgggac	tctgggggtt	2160
gaaatgaccg	accaagcgac	gccaacctg	ccatcacgat	ggccgcaata	aaatatcttt	2220
attttcatta	catctgtgtg	ttgggttttt	gtgtgaatcg	atagcgataa	ggatccgcgt	2280
atggtgcact	ctcagtacaa	tctgctctga	tgccgcatag	ttaagccagc	cccgacaccc	2340
gccaacaccc	gctgacgcgc	cctgacgggc	ttgtctgctc	ccggcatccg	cttacagaca	2400
agctgtgacc	gtctccggga	gctgcatgtg	tcagaggttt	tcaccgtcat	caccgaaacg	2460
cgcgagacga	aagggcctcg	tgatacgctt	atttttatag	gttaatgtca	tgataataat	2520
ggtttcttag	acgtcagggt	gcacttttct	gggaaatgtg	cgcggaaccc	ctatttggtt	2580
atttttctaa	atacattcaa	atatgtatcc	gctcatgaga	caataaccct	gataaatgct	2640
tcaataatat	tgaaaaagga	agagtatgag	tattcaacat	ttccgtgtcg	cccttattcc	2700
cttttttgcg	gcattttgcc	ttcctgtttt	tgctcaccca	gaaacgctgg	tgaaagtaaa	2760
agatgctgaa	gatcagttgg	gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	2820
taagatcctt	gagagttttc	gccccgaaga	acgtttttcca	atgatgagca	cttttaaagt	2880
tctgctatgt	ggcgcggtat	tatcccgat	tgacgccggg	caagagcaac	tcggtcgccg	2940
catacactat	tctcagaatg	acttggttga	gtactcacca	gtcacagaaa	agcatcttac	3000
ggatggcatg	acagtaagag	aattatgcag	tgctgccata	accatgagtg	ataacactgc	3060
ggccaactta	cttctgacaa	cgatcggagg	accgaaggag	ctaaccgctt	ttttgcacaa	3120
catgggggat	catgtaactc	gccttgatcg	ttgggaaccg	gagctgaatg	aagccatacc	3180
aaacgacgag	cgtgacacca	cgatgcctgt	agcaatggca	acaacgttgc	gcaaactatt	3240
aactggcgaa	ctacttactc	tagcttcccc	gcaacaatta	atagactgga	tggaggcgga	3300
taaagttgca	ggaccacttc	tgcgctcggc	ccttccggct	ggctggttta	ttgctgataa	3360
atctggagcc	ggtgagcgtg	ggtctcgcgg	tatcattgca	gcactggggc	cagatggtaa	3420
gccctcccg	atcgtagtta	tctacacgac	ggggagtcag	gcaactatgg	atgaacgaaa	3480
tagacagatc	gctgagatag	gtgcctcact	gattaagcat	tggtaactgt	cagaccaagt	3540
ttactcatat	atactttaga	ttgatttaaa	acttcatttt	taatttaaaa	ggatctaggt	3600
gaagatcctt	tttgataatc	tcatgaccaa	aatcccttaa	cgtgagtttt	cgttccactg	3660
agcgtcagac	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	gatccttttt	ttctgcgcgt	3720
aatctgctgc	ttgcaaacaa	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtgggtttgt	tgccggatca	3780
agagctacca	actctttttc	cgaaggtaac	tggcttcagc	agagcgcaga	taccaaatat	3840
tgttcttcta	gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	caccgcctac	3900
atacctcgct	ctgctaatac	tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	agtcgtgtct	3960
taccgggttg	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	cagcggtcgg	gctgaacggg	4020

251

```

gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca 4080
gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 4140
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 4200
tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 4260
gtcagggggg cgagacctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 4320
cttttgctgg ccttttgctc acatggctcg acagatcttc aatattggcc attagccata 4380
ttattcattg gttatatagc ataaatcaat attggctatt ggccattgca tacgttgtat 4440
ctatatcata atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa tatgaccgcc atgttggcat 4500
tgattattga ctagttatta atagtaatca attacggggg cattagttca tagcccatat 4560
atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccg ctagctgacc gcccaacgac 4620
ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gtcccatag taacgccaat agggactttc 4680
cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg 4740
tatcatatgc caagtccgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggc cgcctggcat 4800
tatgcccagt acatgacctt acgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc 4860
atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacacca atgggcgtgg atagcggttt 4920
gactcacggg gattttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac 4980
caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactgcg atcgcccgcc ccgttgacgc 5040
aaatgggcgg taggcgtgta cgggtgggagg tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc 5100
gtcagatcac tagaagcttt attgcggtag tttatcacag ttaaattgct aacgcagtca 5160
gtgcttctga cacaacagtc tcgaacttaa gctgcagtga ctctcttaag gtagccttgc 5220
agaagttggt cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga 5280
gaccaataga aactgggctt gtcgagacag agaagactct tgcgtttctg ataggcacct 5340
attggtctta ctgacatcca ctttgccctt ctctccacag gtgtccactc ccagttcaat 5400
tacagctctt aaggctagag tacttaatac gactcactat aggctagcct cgagcgcgga 5460
gatgggggtg cacgaatgtc ctgcctggct gtggcttctc ctgtccctgc tgtcgtccc 5520
tctgggcctc ccagtcctgg gcgccccacc acgcctcatc tgtgacagcc gagtcctgga 5580
gaggtaacct ttggaggcca aggaggccga gaatatcacg acgggctgtg ctgaacactg 5640
cagcttgaat gagaatatca ctgtcccaga caccaaagtt aatttctatg cctggaagag 5700
gatggaggtc gggcagcagg ccgtagaagt ctggcagggc ctggccctgc tgtcgggaagc 5760
tgtcctgcgg ggccaggccc tgttgggtcaa ctcttcccag ccgtgggagc ccctgcagct 5820
gcatgtggat aaagccgtca gtggccttcg cagcctcacc actctgcttc gggctctgcg 5880
agcccagaag gaagccatct cccctccaga tgcggcctca gctgctccac tccgaacaat 5940
cactgctgac actttccgca aactcttccg agtctactcc aatttcctcc ggggaaagct 6000
gaagctgtac acaggggagg cctgcaggac aggggaccat catcaccatc accattgat 6059

```

<210> 209
 <211> 6059
 <212> DNA
 <213> Artificial

252

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: plasmid

<400> 209

ctagagtcga	ccccggcggc	cgcttccctt	tagtgagggt	taatgcttcg	agcagacatg	60
ataagataca	ttgatgagtt	tggacaaacc	acaactagaa	tgcagtgaaa	aaaatgcttt	120
at ttgtgaaa	tttgtgatgc	tattgcttta	ttt gtaacca	ttataagctg	caataaacia	180
gttaacaaca	acaattgcat	tcatttttatg	tttcagggttc	agggggagat	gtggggagggt	240
ttttaaagca	agtaaaacct	ctacaaatgt	ggtaaaatcc	gataaggatc	gatccgggct	300
ggcgtaatag	cgaagaggcc	cgcaccgatc	gcccttccca	acagttgcgc	agcctgaatg	360
gcgaatggac	gcgccctgta	gcggcgcatc	aagcgcgggc	gggtgtggtg	ttacgcgcag	420
cgtgaccgct	acacttgcca	gcgccctagc	gcccgtcctt	ttcgttttct	tcccttcctt	480
tctcgccacg	ttcgccggct	ttccccgtca	agctctaaat	cgggggctcc	ctttaggggt	540
ccgatttagt	gctttacggc	acctcgaccc	caaaaaactt	gattaggggtg	atggttcacg	600
tagtgggcca	tgcacctgat	agacggtttt	tgcacctttg	acgttggagt	ccacgttctt	660
taatagtggg	ctcttggtcc	aaactggaac	aacactcaac	cctatctcgg	tctattcttt	720
tgatttataa	gggattttgc	cgatttcggc	ctattgggta	aaaaatgagc	tgatttaaca	780
aaaatttaac	gcgaatttta	acaaaatatt	aacgcttaca	atttcctgat	gcgggtatttt	840
ctccttacgc	atctgtgcgg	tatttcacac	cgcatacgcg	gatctgcgca	gcaccatggc	900
ctgaaataac	ctctgaaaga	ggaacttggt	taggtacctt	ctgaggcgga	aagaaccagc	960
tgtggaatgt	gtgtcagtta	gggtgtggaa	agtccccagg	ctccccagca	ggcagaagta	1020
tgcaaagcat	gcatctcaat	tagtcagcaa	ccagggtgtg	aaagtcccca	ggctccccag	1080
caggcagaag	tatgcaaagc	atgcatctca	attagtcagc	aaccatagtc	ccgccccctaa	1140
ctccgcccac	cccgccccta	actccgcccc	gttccgcccc	ttctccgccc	catggctgac	1200
taattttttt	tatttatgca	gaggccgagg	ccgcctcggc	ctctgagcta	ttccagaagt	1260
agtgaggagg	cttttttggg	ggcctaggct	tttgcaaaaa	gcttgattct	tctgacacaa	1320
cagtctcgaa	cttaaggcta	gagccaccat	gattgaacaa	gatggattgc	acgcagggttc	1380
tccggccgct	tgggtggaga	ggctattcgg	ctatgactgg	gcacaacaga	caatcggtcg	1440
ctctgatgcc	gccgtgttcc	ggctgtcagc	gcaggggcgc	ccggttcttt	ttgtcaagac	1500
cgacctgtcc	ggtgccctga	atgaactgca	ggacgaggca	gcgcggctat	cgtggctggc	1560
cacgacgggc	gttccttgcg	cagctgtgct	cgacgttgtc	actgaagcgg	gaagggactg	1620
gctgctattg	ggcgaagtgc	cggggcagga	tctcctgtca	tctcaccttg	ctcctgccga	1680
gaaagtatcc	atcatggctg	atgcaatgcg	gcggctgcat	acgcttgatc	cggctacctg	1740
cccattcgac	caccaagcga	aacatcgcat	cgagcgagca	cgtactcgga	tggaaagccgg	1800
tcttgtcgat	caggatgatc	tggacgaaga	gcatcagggg	ctcgcgccag	ccgaactggt	1860
cgccaggctc	aaggcgcgca	tgcccagcgg	cgaggatctc	gtcgtgaccc	atggcgatgc	1920
ctgcttgccg	aatatcatgg	tggaaaatgg	ccgcttttct	ggattcatcg	actgtggccg	1980
gctgggtgtg	gcggaccgct	atcaggacat	agcgttggct	acccgtgata	ttgctgaaga	2040
gcttggcggc	gaatgggctg	accgcttcct	cgtgctttac	ggtatcgccg	ctcccgattc	2100

253

gcagcgcac gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagcgggac tctggggttc 2160
gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg ccatcacgat ggccgcaata aaatatcttt 2220
attttcatta catctgtgtg ttggtttttt gtgtgaatcg atagcgataa ggatccgcgt 2280
atggtgcact ctcaagtacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc 2340
gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca 2400
agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg 2460
cgcgagacga aagggcctcg tgatacgctt atttttatag gttaatgtca tgataataat 2520
ggtttcttag acgtcagggtg gcacttttct gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttggtt 2580
atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 2640
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 2700
cttttttgcg gcattttgcc ttctgttttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagttaa 2760
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 2820
taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaggt 2880
tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg 2940
catacactat tctcagaatg acttggttga gtactacca gtcacagaaa agcatcttac 3000
ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc 3060
ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaa 3120
catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 3180
aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt 3240
aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 3300
taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggtt ggctggttta ttgctgataa 3360
atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcaactatgg atgaacgaaa 3420
gccctccggt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 3480
tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 3540
ttactcatat atactttaga ttgattttaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 3600
gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 3660
agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt 3720
aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggttttgt tgccggatca 3780
agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 3840
tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 3900
atacctcgct ctgctaattc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 3960
taccggggtg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 4020
gggttcgtgc acacagccca gcttgagcgc aacgacctac accgaactga gataacctaca 4080
gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 4140
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 4200
tctttatagt cctgtcgggt ttccgccact ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 4260
gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 4320

254

cttttgctgg ccttttgctc acatgggtcg acagatcttc aatattggcc attagccata 4380
 ttattcattg gttatatagc ataaatcaat attggctatt ggccattgca tacgttgat 4440
 ctatatcata atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa tatgaccgcc atgttggcat 4500
 tgattattga ctagttatta atagtaatca attacggggc cattagttca tagcccatat 4560
 atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccg cttggtgacc gcccaacgac 4620
 ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc 4680
 cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagt 4740
 tatcatatgc caagtccgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat 4800
 tatgccagat acatgacctt acgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc 4860
 atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacacca atgggctgg atagcggttt 4920
 gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac 4980
 caaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactgcg atcgcccgcc ccgttgacgc 5040
 aaatgggcgg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc 5100
 gtcagatcac tagaagcttt attgcggtag tttatcacag ttaaattgct aacgcagtca 5160
 gtgcttctga cacaacagtc tcgaacttaa gctgcagtga ctctcttaag gtagccttgc 5220
 agaagttggt cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga 5280
 gaccaataga aactgggctt gtcgagacag agaagactct tgcgtttctg ataggcacct 5340
 attggtctta ctgacatcca ctttgccttt ctctccacag gtgtccactc ccagttcaat 5400
 tacagctctt aaggctagag tacttaatac gactcactat aggctagcct cgagcgcgga 5460
 gatgggggtg cacgaatgtc ctgcctggct gtggcttctc ctgtccctgc tgtcgtccc 5520
 tctgggcctc ccagtcctgg gcgccccacc acgcctcctc tgtgacagcc gagtccctga 5580
 gaggtacctc ttggaggcca aggaggccga gaatatcacg acgggctgta atgaaacctg 5640
 cagcttgaat gagaatatca ctgtcccaga caccaaagtt aatttctatg cctggaagag 5700
 gatggaggtc gggcagcagg ccgtagaagt ctggcagggc ctggccctgc tgtcgggaagc 5760
 tgtcctgcgg ggccaggccc tgttggtcaa ctcttcccag ccgtgggagc ccctgcagct 5820
 gcatgtgat aaagccgtca gtggccttcg cagcctcacc actctgcttc gggctctgcg 5880
 agcccagaag gaagccatct cccctccaga tgcggcctca gctgctccac tccgaacaat 5940
 cactgctgac actttccgca aactcttccg agtctactcc aatttccctc ggggaaagct 6000
 gaagctgtac acaggggagg cctgcaggac aggggaccat catcaccatc accattgat 6059

<210> 210
 <211> 6059
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: plasmid

<400> 210
 ctagagtcca cccgggctgc cgcttccctt tagtgagggt taatgcttcg agcagacatg 60
 ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcaagttaa aaaatgcttt 120
 atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaaca 180

gttaacaaca	acaattgcat	tcattttatg	tttcagggtc	agggggagat	gtgggagggt	240
ttttaaaagca	agtaaaacct	ctacaaatgt	ggtaaaatcc	gataaggatc	gatccgggct	300
ggcgtaatag	cgaagaggcc	cgcaccgatc	gcccttccca	acagttgcgc	agcctgaatg	360
gcgaatggac	gcgccctgta	gcggcgcatc	aagcgcggcg	ggtgtggtgg	ttacgcgcag	420
cgtgaccgct	acacttgcca	gcgccctagc	gcccgcctct	ctcgttttct	tcccttcctt	480
tctcgccacg	ttcgccggct	ttccccgtca	agctctaaat	cgggggctcc	ctttaggggt	540
ccgatttagt	gctttacggc	acctcgaccc	caaaaaactt	gattaggggtg	atggttcacg	600
tagtgggcca	tcgccctgat	agacgggttt	tcgccctttg	acgttggagt	ccacgttctt	660
taatagtgga	ctcttggttc	aaactggaac	aacactcaac	cctatctcgg	tctattcttt	720
tgatttataa	gggattttgc	cgatttcggc	ctattgggta	aaaaatgagc	tgatttaaca	780
aaaattttaac	gcgaatttta	acaaaatatt	aacgcttaca	atttcctgat	gcggtatttt	840
ctccttacgc	atctgtgcgg	tatttcacac	cgcatacgcg	gatctgcgca	gcaccatggc	900
ctgaaataac	ctctgaaaga	ggaacttggc	taggtacctt	ctgaggcgga	aagaaccagc	960
tgtggaatgt	gtgtcagtta	gggtgtggaa	agtccccagg	ctccccagca	ggcagaagta	1020
tgcaaagcat	gcatctcaat	tagtcagcaa	ccagggtgtg	aaagtcccca	ggctccccag	1080
caggcagaag	tatgcaaagc	atgcatctca	attagtcagc	aaccatagtc	ccgcccctaa	1140
ctccgcccct	cccggcccct	actccgcccc	gttccgcccc	ttctccgccc	catggctgac	1200
taattttttt	tattttatgca	gaggccgagg	ccgcctcggc	ctctgagcta	ttccagaagt	1260
agtgaggagg	cttttttgga	ggcctaggct	tttgcaaaaa	gcttgattct	tctgacacaa	1320
cagtctcgaa	cttaaggcta	gagccaccat	gattgaacaa	gatggattgc	acgcagggtc	1380
tccggccgct	tgggtggaga	ggctattcgg	ctatgactgg	gcacaacaga	caatcggtcg	1440
ctctgatgcc	gccgtgttcc	ggctgtcagc	gcaggggcgc	ccggttcttt	ttgtcaagac	1500
cgacctgtcc	ggtgccctga	atgaactgca	ggacgaggca	gcgcggctat	cgtggctggc	1560
cacgacgggc	gttccttgcg	cagctgtgct	cgacgttgct	actgaagcgg	gaagggactg	1620
gctgctattg	ggcgaagtgc	cggggcagga	tctcctgtca	tctcaccttg	ctcctgccga	1680
gaaagtatcc	atcatggctg	atgcaatgcg	gcggctgcat	acgcttgatc	cggctacctg	1740
cccattcgac	caccaagcga	aacatcgcat	cgagcgagca	cgtactcgga	tggaaagccgg	1800
tcttgtcgat	caggatgatc	tggacgaaga	gcatcagggg	ctcgcgccag	ccgaactggt	1860
cgccaggctc	aaggcgcgca	tgcccagcgg	cgaggatctc	gtcgtgacct	atggcgatgc	1920
ctgcttgccg	aatatcatgg	tggaaaatgg	ccgcttttct	ggattcatcg	actgtggccg	1980
gctgggtgtg	gcggaccgct	atcaggacat	agcgttggct	acccgtgata	ttgctgaaga	2040
gcttggcggc	gaatgggctg	accgcttctc	cgtgctttac	ggtatcgccg	ctcccgatcc	2100
gcagcgcatc	gccttctatc	gccttcttga	cgagttcttc	tgagcggggc	tctgggggtc	2160
gaaatgaccg	accaagcgac	gcccacacct	ccatcacgat	ggccgcaata	aaatatcttt	2220
attttcatta	catctgtgtg	ttggtttttt	gtgtgaatcg	atagcgataa	ggatccgcgt	2280
atpgtgcact	ctcagtacaa	tctgctctga	tgccgcatag	ttaagccagc	cccgcacccc	2340
gccaacaccc	gctgacgcgc	cctgacgggc	ttgtctgctc	ccggcatccg	cttacagaca	2400

25

agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagagggtt tcaccgtcat caccgaaacg 2460
 cgcgagacga aagggcctcg tgatacgccct atttttatag gttaatgtca tgataataat 2520
 ggtttcttag acgtcagggtg gcacttttctg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttggtt 2580
 atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 2640
 tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 2700
 cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa 2760
 agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 2820
 taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt 2880
 tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg 2940
 catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac 3000
 ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataactctgc 3060
 ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaaa 3120
 catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 3180
 aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt 3240
 aactggcgaa ctacttactc tagcttcccc gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 3300
 taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa 3360
 atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa 3420
 gccctcccg atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 3480
 tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 3540
 ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 3600
 gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 3660
 agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt 3720
 aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca 3780
 agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 3840
 tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 3900
 atacctcgct ctgctaatac tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 3960
 taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 4020
 gggttcgtgc acacagccca gcttgagcgc aacgacctac accgaactga gatacctaca 4080
 gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 4140
 aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 4200
 tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 4260
 gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 4320
 cttttgctgg ctttttgctc acatggctcg acagatcttc aatattggcc attagccata 4380
 ttattcattg gttatatagc ataaatcaat attggctatt ggccattgca tacgttgtat 4440
 ctatatcata atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa tatgaccgcc atgttggcat 4500
 tgattattga ctagttatta atagtaatca attacgggt cattagttca tagcccatat 4560
 atggagttcc gcgttacata acttacggt aatggccgc ctggctgacc gcccaacgac 4620

157

```

ccccgcccac tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc 4680
cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgcc acttggcagt acatcaagtg 4740
tatcatatgc caagtccgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat 4800
tatgcccagt acatgacctt acgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc 4860
atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacacca atgggcgtgg atagcggttt 4920
gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac 4980
caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactgcg atcgcccgcc ccgttgacgc 5040
aaatgggcgg taggcgtgta cgggtgggagg tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc 5100
gtcagatcac tagaagcttt attgcggtag tttatcacag ttaaattgct aacgcagtca 5160
gtgcttctga cacaacagtc tcgaacttaa gctgcagtga ctctcttaag gtagccttgc 5220
agaagttggt cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga 5280
gaccaataga aactgggctt gtcgagacag agaagactct tgcgtttctg ataggcacct 5340
attggtctta ctgacatcca ctttgccttt ctctccacag gtgtccactc ccagttcaat 5400
tacagctctt aaggctagag tacttaatac gactcactat aggctagcct cgagcgcgga 5460
gatgggggtg cacgaatgtc ctgcctggct gtggcttctc ctgtccctgc tgtcgctccc 5520
tctgggcctc ccagtcctgg gcgccccacc acgcctcatc tgtgacagcc gagtcctgga 5580
gaggtagctc ttggaggcca aggaggccga gaatatcacg acgggctgtg ctgaacactg 5640
cagcttgaat gagaatatca ctgtcccaga caccgacgtt aatttctatg cctggaagag 5700
gatggaggtc gggcagcagg ccgtagaagt ctggcagggc ctggccctgc tgtcggaagc 5760
tgtcctgagg ggccaggccc tgttgggtcaa ctcttcccag ccgtgggagc ccctgcagct 5820
gcatgtggat aaagccgtca gtggccttcg cagcctcacc actctgcttc gggctctgcg 5880
agcccagaag gaagccatct cccctccaga tgcggcctca gctgctccac tccgaacaat 5940
cactgctgac actttccgca aactcttccg agtctactcc aatttccctcc ggggaaagct 6000
gaagctgtac acaggggagg cctgcaggac aggggaccat catcaccatc accattgat 6059

```

```

<210> 211
<211> 6059
<212> DNA
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: plasmid

```

```

<400> 211
ctagagtcga cccgggaggc cgcttccctt tagtgagggt taatgcttcg agcagacatg 60
ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaac aaaatgcttt 120
atattgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaaca 180
gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcagggtc agggggagat gtgggagggt 240
ttttaaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtaaaatcc gataaggatc gatccgggct 300
ggcgtaatat cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg 360
gcgaatggac gcgcctgtg gcggcgcatc aagcgcgagg ggtgtggtgg ttacgcgcag 420
cgtgaccgct acacttgcca gcgccttagc gcccgctcct ttcgctttct tcccttccct 480

```

tctcgccacg	ttcgccggct	ttccccgtca	agctctaaat	cgggggctcc	ctttaggggtt	540
ccgatttagt	gctttacggc	acctcgaccc	caaaaaactt	gattaggggtg	atggttcacg	600
tagtgggcca	tcgccctgat	agacggtttt	tcgccctttg	acgttggagt	ccacgttctt	660
taatagtgga	ctcttggtcc	aaactggaac	aacactcaac	cctatctcgg	tctattcttt	720
tgatttataa	gggattttgc	cgatttcggc	ctattgggta	aaaaatgagc	tgatttaaca	780
aaaatttaac	gcgaatttta	acaaaatatt	aacgcttaca	atttcctgat	gcggtatttt	840
ctccttacgc	atctgtgcgg	tatttcacac	cgcatacgcg	gatctgcgca	gcaccatggc	900
ctgaaataac	ctctgaaaga	ggaacttggg	taggtacctt	ctgaggcgga	aagaaccagc	960
tgtggaatgt	gtgtcagtta	gggtgtggaa	agtccccagg	ctccccagca	ggcagaagta	1020
tgcaaagcat	gcctctcaat	tagtcagcaa	ccagggtgtg	aaagtcccca	ggctccccag	1080
caggcagaag	tatgcaaagc	atgcatctca	attagtcagc	aaccatagtc	ccgcccctaa	1140
ctccgcccac	cccgcacctc	actccgcccc	gttccgcccc	ttctccgccc	catggctgac	1200
taattttttt	tatttatgca	gaggccgagg	ccgcctcggc	ctctgagcta	ttccagaagt	1260
agtgaggagg	cttttttgga	ggcctaggct	tttgcaaaaa	gcttgattct	tctgacacaa	1320
cagtctcgaa	cttaaggcta	gagccaccat	gattgaacaa	gatggattgc	acgcagggtc	1380
tccggccgct	tgggtggaga	ggctattcgg	ctatgactgg	gcacaacaga	caatcggctg	1440
ctctgatgcc	gccgtgttcc	ggctgtcagc	gcaggggcgc	ccggttcttt	ttgtcaagac	1500
cgacctgtcc	ggtgccctga	atgaactgca	ggacgaggca	gcgcggctat	cgtggctggc	1560
cacgacgggc	gttccttgcg	cagctgtgct	cgacgttgtc	actgaagcgg	gaagggactg	1620
gctgctattg	ggcgaagtgc	cggggcagga	tctcctgtca	tctcaccttg	ctcctgccga	1680
gaaagtatcc	atcatggctg	atgcaatgcg	gcggctgcat	acgcttgatc	cggctacctg	1740
cccattcgac	caccaagcga	aacatcgcat	cgagcgagca	cgtactcgga	tggaaagccgg	1800
tcttgtcgat	caggatgatc	tggacgaaga	gcatcagggg	ctcgcgccag	ccgaactggt	1860
cgccaggctc	aaggcgcgca	tggccgacgg	cgaggatctc	gtcgtgaccc	atggcgatgc	1920
ctgcttgccg	aatatcatgg	tggaaaatgg	ccgcttttct	ggattcatcg	actgtggccg	1980
gctgggtgtg	gcggaccgct	atcaggacat	agcgttggtc	accogtgata	ttgtgaaga	2040
gcttggcggc	gaatgggctg	accgcttcct	cgtgctttac	ggtatcgccg	ctcccgatcc	2100
gcagcgcac	gccttctatc	gccttcttga	cgagttcttc	tgagcgggac	tctgggggtc	2160
gaaatgaccg	accaagcgac	gccaacctg	ccatcacgat	ggccgcaata	aaatatcttt	2220
attttcatta	catctgtgtg	ttgggttttt	gtgtgaatcg	atagcgataa	ggatccgcgt	2280
atggtgcact	ctcagtacaa	tctgctctga	tgccgcatag	ttaagccagc	cccgcacccc	2340
gccaacaccc	gctgacgcgc	cctgacgggc	ttgtctgctc	ccggcatccg	cttacagaca	2400
agctgtgacc	gtctccggga	gctgcatgtg	tcagagggtt	tcaccgtcat	caccgaaacg	2460
cgcgagacga	aagggcctcg	tgatacgctt	atttttatag	gttaatgtca	tgataataat	2520
ggtttcttag	acgtcagggtg	gcacttttct	gggaaatgtg	cgcggaaccc	ctatttggtt	2580
atttttctaa	atacattcaa	atatgtatcc	gctcatgaga	caataaccct	gataaatgct	2640
tcaataatat	tgaaaaagga	agagtatgag	tattcaacat	ttccgtgtcg	cccttattcc	2700

258

259

cttttttgcg	gcattttgcc	ttcctgtttt	tgctcaccca	gaaacgctgg	tgaaagtaaa	2760
agatgctgaa	gatcagttgg	gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	2820
taagatcctt	gagagttttc	gccccgaaga	acgttttcca	atgatgagca	cttttaaagt	2880
tctgctatgt	ggcgcggtat	tatcccgtat	tgacgccggg	caagagcaac	tcggtcgccg	2940
catacactat	tctcagaatg	acttggttga	gtactcacca	gtcacagaaa	agcatcttac	3000
ggatggcatg	acagtaagag	aattatgcag	tgctgccata	accatgagtg	ataaactgc	3060
ggccaactta	cttctgacaa	cgatcggagg	accgaaggag	ctaaccgctt	ttttgcacaa	3120
catgggggat	catgtaactc	gccttgatcg	ttgggaaccg	gagctgaatg	aagccatacc	3180
aaacgacgag	cgtgacacca	cgatgcctgt	agcaatggca	acaacgttgc	gcaaactatt	3240
aactggcgaa	ctacttactc	tagcttcccc	gcaacaatta	atagactgga	tggaggcgga	3300
taaagttgca	ggaccacttc	tgcgctcggc	ccttccggct	ggctggttta	ttgctgataa	3360
atctggagcc	ggtgagcgtg	ggtctcgcgg	tatcattgca	gcactggggc	cagatggtaa	3420
gccctcccgt	atcgtagtta	tctacacgac	ggggagtcag	gcaactatgg	atgaacgaaa	3480
tagacagatc	gctgagatag	gtgcctcact	gattaagcat	tggtaactgt	cagaccaagt	3540
ttactcatat	atactttaga	ttgatttaaa	acttcatttt	taatttaaaa	ggatctaggt	3600
gaagatcctt	tttgataatc	tcatgaccaa	aatcccttaa	cgtgagtttt	cgttccactg	3660
agcgtcagac	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	gatccttttt	ttctgcgcgt	3720
aatctgctgc	ttgcaaacaa	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtggtttggt	tgccggatca	3780
agagctacca	actctttttc	cgaaggtaac	tggcttcagc	agagcgcaga	taccaaatac	3840
tgttcttcta	gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	caccgcctac	3900
atacctcgct	ctgctaattc	tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	agtcgtgtct	3960
taccgggttg	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	cagcggtcgg	gctgaacggg	4020
gggttcgtgc	acacagccca	gcttgagcgg	aacgacctac	accgaactga	gatacctaca	4080
gcgtgagcta	tgagaaagcg	ccacgccttc	cgaagggaga	aaggcggaca	ggtatccggt	4140
aagcggcagg	gtcggaacag	gagagcgcac	gagggagctt	ccagggggaa	acgcctggta	4200
tctttatagt	cctgtcgggt	ttcgccacct	ctgacttgag	cgtcgatttt	tgtgatgctc	4260
gtcagggggg	cggagccctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gcctttttac	ggttcctggc	4320
cttttgctgg	ccttttgctc	acatggctcg	acagatcttc	aatattggcc	attagccata	4380
ttattcattg	gttatatagc	ataaatcaat	attggctatt	ggccattgca	tacgttgtat	4440
ctatatcata	atatgtacat	ttatattggc	tcatgtccaa	tatgaccgcc	atgttggcat	4500
tgattattga	ctagttatta	atagtaatca	attacggggg	cattagttca	tagcccatat	4560
atggagttcc	gcgttacata	acttacggta	aatggcccg	ctggctgacc	gccaacgac	4620
ccccgcccat	tgacgtcaat	aatgacgtat	gttcccatag	taacgccaat	agggactttc	4680
cattgacgtc	aatgggtgga	gtattttacg	taaactgccc	acttggcagt	acatcaagtg	4740
tatcatatgc	caagtccgcc	ccctattgac	gtcaatgacg	gtaaatggcc	cgcctggcat	4800
tatgcccagt	acatgacctt	acgggacttt	cctacttggc	agtacatcta	cgtattagtc	4860
atcgctatta	ccatggtgat	gcggttttgg	cagtacacca	atgggcgtgg	atagcggttt	4920

260

```

gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac 4980
caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactgcg atcgcccgcc ccgttgacgc 5040
aaatgggcgg taggcgtgta cggtagggagg tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc 5100
gtcagatcac tagaagcttt attgcggtag tttatcacag ttaaattgct aacgcagtca 5160
gtgcttctga cacaacagtc tcgaacttaa gctgcagtga ctctcttaag gtagccttgc 5220
agaagtgggt cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ctacaagaca ggtttaagga 5280
gaccaataga aactgggctt gtcgagacag agaagactct tgcgtttctg ataggcacct 5340
attggtctta ctgacatcca ctttgccctt ctctccacag gtgtccactc ccagttcaat 5400
tacagctctt aaggctagag tacttaatac gactcactat aggctagcct cgagcgcgga 5460
gatgggggtg cacgaatgtc ctgcctggct gtggcttctc ctgtccctgc tgtcgctccc 5520
tctgggcctc ccagtcctgg gcgccccacc acgcctcatc tgtgacagcc gagtcctgga 5580
gaggtaacct ttggaggcca aggaggccga gaatatcacg acgggctgtg ctgaacactg 5640
cagcttgaat gagaatatca ctgtcccaga caccaaagtt aatttctatg cctggaagag 5700
gatggaggtc gggcagcagg ccgtagaagt ctggcagggc ctggccctgc tgtcggaagc 5760
tgtcctgcgg ggccaggccc tgttgggtcaa ctcttcccag ccgtgggagc ccctgcagct 5820
gcatgtggat aaagccgtcg agggccttcg cagcctcacc actctgcttc gggctctgcg 5880
agcccagaag gaagccatct cccctccaga tgcggcctca gctgctccac tccgaacaat 5940
cactgctgac actttccgca aactcttccg agtctactcc aatttcctcc ggggaaagct 6000
gaagctgtac acaggggagg cctgcaggac aggggaccat catcaccatc accattgat 6059

```

```

<210> 212
<211> 6059
<212> DNA
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: plasmid

```

```

<400> 212
ctagagtcga cccgggcggc cgcttccctt tagtgagggt taatgcttcg agcagacatg 60
ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt 120
atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaaca 180
gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcaggttc agggggagat gtgggagggt 240
ttttaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtaaaatcc gataaggatc gatccgggct 300
ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg 360
gcgaatggac gcgccttgta gcggcgcatc aagcgcggcg ggtgtggtgg ttacgcgcag 420
cgtgaccgct acacttgcca gcgccttagc gcccgctcct ttcgctttct tcccttcctt 480
tctcgccacg ttcgcgggct ttccccgtca agctctaaat cgggggctcc ctttaggggt 540
ccgatttagt gctttacggc acctcgaccc caaaaaactt gattaggggt atggttcacg 600
tagtgggcca tcgccctgat agacgggttt tcgccctttg acgttggagt ccacgttctt 660
taatagtgga ctcttgttcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg tctattcttt 720
tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctattgggtt aaaaatgagc tgatttaaca 780

```

261

aaaattttaac	gcgaatttta	acaaaatatt	aacgcttaca	atttcctgat	gcggtatfff	840
ctccttacgc	atctgtgcgg	tatttcacac	cgcatacgcg	gatctgcgca	gcacccatggc	900
ctgaaataac	ctctgaaaga	ggaacttggg	taggtacctt	ctgaggcgga	aagaaccagc	960
tgtggaatgt	gtgtcagtta	gggtgtggaa	agtccccagg	ctccccagca	ggcagaagta	1020
tgcaaagcat	gcatctcaat	tagtcagcaa	ccagggtgtg	aaagtcccca	ggctccccag	1080
caggcagaag	tatgcaaagc	atgcatctca	attagtcagc	aaccatagtc	ccgcccctaa	1140
ctccgcccac	cccgcacct	actccgcccc	gttccgcccc	ttctccgccc	catggctgac	1200
taatfffff	tatttatgca	gaggccgagg	ccgcctcggc	ctctgagcta	ttccagaagt	1260
agtgaggagg	ctfffff	ggcctaggct	tttgcaaaaa	gcttgattct	tctgacacaa	1320
cagtctcgaa	cttaaggcta	gagccaccat	gattgaacaa	gatggattgc	acgcagggttc	1380
tccggccgct	tgggtggaga	ggctattcgg	ctatgactgg	gcacaacaga	caatcggctg	1440
ctctgatgcc	gccgtgttcc	ggctgtcagc	gcaggggcgc	ccggttcttt	ttgtcaagac	1500
cgacctgtcc	ggtgccctga	atgaactgca	ggacgaggca	gcgcggctat	cgtggctggc	1560
cacgacgggc	gttccttgcg	cagctgtgct	cgacgttgtc	actgaagcgg	gaagggactg	1620
gctgctattg	ggcgaagtgc	cggggcagga	tctcctgtca	tctcaccttg	ctcctgccga	1680
gaaagtatcc	atcatggctg	atgcaatgcg	gcggctgcat	acgcttgatc	cggctacctg	1740
cccattcgac	caccaagcga	aacatcgcat	cgagcgagca	cgtactcgga	tggaagccgg	1800
tcttgtcgat	caggatgatc	tggacgaaga	gcatcagggg	ctcgcgccag	ccgaactggt	1860
cgccaggctc	aaggcgcgca	tggccgacgg	cgaggatctc	gtcgtgaccc	atggcgatgc	1920
ctgcttgccg	aatatcatgg	tggaaaatgg	ccgcttttct	ggattcatcg	actgtggccg	1980
gctgggtgtg	gcggaccgct	atcaggacat	agcgttggct	acccgtgata	ttgtgaaga	2040
gcttggcggc	gaatgggctg	accgcttcct	cgtgctttac	ggtatcgccg	ctcccgattc	2100
gcagcgcac	gccttctatc	gccttcttga	cgagttcttc	tgagcgggac	tctgggggttc	2160
gaaatgaccg	accaagcgac	gcccacctg	ccatcacgat	ggccgcaata	aaatatcttt	2220
atffffcatta	catctgtgtg	ttggttffff	gtgtgaatcg	atagcgataa	ggatccgcgt	2280
atggtgcact	ctcagtacaa	tctgctctga	tgccgcatag	ttaagccagc	cccgcacccc	2340
gccaacaccc	gctgacgcgc	cctgacgggc	ttgtctgctc	ccggcatccg	cttacagaca	2400
agctgtgacc	gtctccggga	gctgcatgtg	tcagagggtt	tcaccgtcat	caccgaaacg	2460
cgcgagacga	aagggcctcg	tgatacgcct	atfffftatag	gttaatgtca	tgataataat	2520
ggtttcttag	acgtcagggtg	gcactffffc	gggaaatgtg	cgcggaaccc	ctatffgttt	2580
atfffftctaa	atacattcaa	atatgtatcc	gctcatgaga	caataacctt	gataaatgct	2640
tcaataatat	tgaaaaagga	agagtatgag	tattcaacat	ttccgtgtcg	cccttattcc	2700
ctfffftgcg	gcattffgcc	ttcctgtttt	tgctcaccca	gaaacgctgg	tgaaagtaaa	2760
agatgctgaa	gatcagttgg	gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	2820
taagatcctt	gagagttttc	gccccgaaga	acgtffffcca	atgatgagca	ctffffaaagt	2880
tctgctatgt	ggcgcggtat	tatcccgat	tgacgccggg	caagagcaac	tcggtcgccg	2940
catacactat	tctcagaatg	acttgggttga	gtactcacca	gtcacagaaa	agcatcttac	3000

ggatggcatg	acagtaagag	aattatgcag	tgctgccata	accatgagtg	ataacactgc	3060
ggccaactta	cttctgacaa	cgatcggagg	accgaaggag	ctaaccgctt	ttttgcacaa	3120
catgggggat	catgtaactc	gccttgatcg	ttgggaaccg	gagctgaatg	aagccatacc	3180
aaacgacgag	cgtgacacca	cgatgcctgt	agcaatggca	acaacgttgc	gcaaactatt	3240
aactggcgaa	ctacttactc	tagcttcccg	gcaacaatta	atagactgga	tggaggcgga	3300
taaagttgca	ggaccacttc	tgcgctcggc	ccttccggct	ggctggttta	ttgctgataa	3360
atctggagcc	ggtgagcgtg	ggtctcgcgg	tatcattgca	gcactggggc	cagatggtaa	3420
gccctcccgt	atcgtagtta	tctacacgac	ggggagtcag	gcaactatgg	atgaacgaaa	3480
tagacagatc	gctgagatag	gtgcctcact	gattaagcat	tggtaactgt	cagaccaagt	3540
ttactcatat	atactttaga	ttgatttaaa	acttcatttt	taattttaaa	ggatctaggt	3600
gaagatcctt	tttgataatc	tcatgaccaa	aatcccttaa	cgtgagtttt	cgttccactg	3660
agcgtcagac	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	gatccttttt	ttctgcgcgt	3720
aatctgctgc	ttgcaaacaa	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtggtttggt	tgccggatca	3780
agagctacca	actctttttc	cgaaggtaac	tggcttcagc	agagcgcaga	taccaaatac	3840
tgttcttcta	gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	caccgcctac	3900
atacctcgct	ctgctaatcc	tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	agtcgtgtct	3960
taccgggttg	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	cagcggtcgg	gctgaacggg	4020
gggttcgtgc	acacagccca	gcttggagcg	aacgacctac	accgaactga	gatacctaca	4080
gcgtgagcta	tgagaaagcg	ccacgcttcc	cgaagggaga	aaggcggaca	ggtatccggt	4140
aagcggcagg	gtcggaaacag	gagagcgcac	gagggagctt	ccagggggaa	acgcctggta	4200
tctttatagt	cctgtcgggt	ttcgccacct	ctgacttgag	cgtcgatttt	tgtgatgctc	4260
gtcagggggg	cggagcctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gcctttttac	ggttcctggc	4320
cttttgetgg	ccttttgtc	acatggctcg	acagatcttc	aatattggcc	attagccata	4380
ttattcattg	gttatatagc	ataaatcaat	attggctatt	ggccattgca	tacgttgatat	4440
ctatatcata	atatgtacat	ttatatggc	tcatgtccaa	tatgaccgcc	atgttggtcat	4500
tgattattga	ctagttatta	atagtaatca	attacggggg	cattagttca	tagcccatat	4560
atggagttcc	gcgttacata	acttacggta	aatggccccg	ctggctgacc	gcccacgcac	4620
ccccgcccat	tgacgtcaat	aatgacgtat	gttcccatag	taacgccaat	agggactttc	4680
cattgacgtc	aatgggtgga	gtattttacg	taaactgccc	acttggcagt	acatcaagtg	4740
tatcatatgc	caagtccgcc	ccctattgac	gtcaatgacg	gtaaatggcc	cgcttggcat	4800
tatgcccagt	acatgacctt	acgggacttt	cctacttggc	agtacatcta	cgtattagtc	4860
atcgctatta	ccatggtgat	gcggtttttg	cagtacacca	atgggcgtgg	atagcggttt	4920
gactcacggg	gatttccaag	tctccacccc	attgacgtca	atgggagttt	gttttggcac	4980
caaaatcaac	gggactttcc	aaaatgtcgt	aacaactgcg	atcgccccgc	ccgttgacgc	5040
aaatgggcgg	taggcgtgta	cggtgggagg	tctatataag	cagagctcgt	ttagtgaacc	5100
gtcagatcac	tagaagcttt	attgcggtag	tttatcacag	ttaaattgct	aacgcagtca	5160
gtgcttctga	cacaacagtc	tcgaacttaa	gctgcagtga	ctctcttaag	gtagccttgc	5220

262

agaagttggt	cgtgaggcac	tgggcaggta	agtatcaagg	ttacaagaca	ggtttaagga	5280
gaccaataga	aactgggctt	gtcgagacag	agaagactct	tgcgtttctg	ataggcacct	5340
attggtctta	ctgacatcca	ctttgccttt	ctctccacag	gtgtccactc	ccagttcaat	5400
tacagctctt	aaggctagag	tacttaatac	gactcactat	aggctagcct	cgagcgcgga	5460
gatgggggtg	cacgaatgtc	ctgcctggct	gtggcttctc	ctgtccctgc	tgtcgctccc	5520
tctgggcctc	ccagtcctgg	gcgccccacc	acgcctcatc	tgtgacagcc	gagtcctgga	5580
gaggtagctc	ttggaggcca	aggaggccga	gaatatcacg	acgggctgtg	ctgaacactg	5640
cagcttgaat	gagaatatca	ctgtcccaga	caccgaagtt	aatttctatg	cctggaagag	5700
gatggaggtc	gggcagcagg	ccgtagaagt	ctggcagggc	ctggccctgc	tgtcggaagc	5760
tgtcctgcgg	ggccaggccc	tgttggtcaa	ctcttcccag	ccgtgggagc	ccctgcagct	5820
gcatgtggat	aaagccgtcg	agggccttcg	cagcctcacc	actctgcttc	gggctctgcg	5880
agcccagaag	gaagccatct	cccctccaga	tgcggcctca	gctgctccac	tccgaacaat	5940
cactgctgac	actttccgca	aactcttccg	agtctactcc	aatttcctcc	ggggaaagct	6000
gaagctgtac	acaggggagg	cctgcaggac	aggggaccat	catcaccatc	accattgat	6059

263

Extracto publicación
F. O. S. 264 y 265

266
264

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ☒	()	()
MODELO DE UTILIDAD	()	()
Indicación de que se solicita la concesión de una patente	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
Comprobante de Pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ☒	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud	()	()
Representación grafica del esquema de trazado	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable



Fecha

265.767

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Folio 267

2020
Bogotá, D.C.,

Doctor(a)
LUIS FELIPE CASTILLO GIBSON

Oficio N° 12293

ASUNTO:	Radicación N°	05-8131
	Solicitud internacional	PCT/US2003/020964
	Fecha inicio fase nacional	01/07/2003
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- El poder aportado con la solicitud difiere de la sociedad solicitante por lo tanto se deben presentar los poderes debidamente otorgados, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
- La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente de los inventores a los solicitantes o a sus causantes. (Art. 26-k) Decisión 486/00.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en Nolas 5, 7 y 10
fecha, 04 MAR. 2005.

202027

Conmutador: 382 0840

Fax: 350 5220

E-mail: info sic.gov.co

www.sic.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia