

TÍTULO

Eritropoyetina humana modificada

CAMPO DE LA TECNOLOGÍA

La presente invención describe moléculas de eritropoyetina modificadas con capacidad neuroplástica y neuroprotectora útiles para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central tales como accidentes cerebrovasculares, neurotrauma, neuroinflamación y neurodegeneración.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La eritropoyetina (EPO) forma parte de la superfamilia de citoquinas tipo I que se caracterizan por su importante actividad pleiotrópica [1]. Dicha citoquina es uno de los principales reguladores de la eritropoyesis, actuando sinérgicamente con otras moléculas para promover la proliferación, diferenciación y supervivencia de los progenitores celulares de linajes eritroides y mantener la masa de eritrocitos circulantes [2].

La EPO humana (hEPO) es una proteína altamente glicosilada, cuya masa molecular oscila entre 30-39 kDa. Presenta tres sitios consenso de N-glicosilación y uno de O-glicosilación [3] que pueden presentarse con un grado total de ocupación. Las cadenas de azúcares están compuestas por secuencias variables de monosacáridos y por una cantidad variable de ácido siálico (AS) [4, 5]. Los carbohidratos N-unidos pueden contener dos, tres o cuatro ramificaciones, cada una de las cuales finaliza con una molécula de AS cargada negativamente. Por su

parte, el carbohidrato unido en el sitio de O-glicosilación puede contener hasta dos moléculas de AS [6].

La glicosilación, especialmente el AS terminal de los N-glicanos, es fundamental para la actividad biológica *in vivo* de la EPO, no así para la unión al receptor *in vitro* [7, 8]. Es por ello que las moléculas de EPO con menor contenido glicosídico tienen una alta afinidad por el receptor para EPO (EPOR); sin embargo, su actividad *in vivo* se ve disminuida por un incremento en su depuración plasmática [8]. El grado de glicosilación que presentan estas citoquinas afecta su eficiencia de producción, la afinidad por el receptor, la vida media en plasma, su secreción y la estabilidad de la proteína [5, 9].

Desde el clonado del gen de hEPO en 1985, los conocimientos de la biología de la citoquina han cambiado drásticamente. Uno de los primeros avances fue el descubrimiento de un nuevo accionar biológico de la molécula, que extendió su capacidad eritropoyética e incluyó varios procesos fisiológicos importantes. Entre ellos se destacan la angiogénesis, la regulación de la resistencia vascular y -más importante aún- la protección celular [10, 11]. Si bien la actividad más importante de la eritropoyetina es la hematopoyesis, la presencia de EPO y su receptor en varios tejidos y células no eritropoyéticas, han confirmado la hipótesis antes mencionada, que la EPO presenta múltiples funciones dentro de las cuales se destaca la función citoprotectora sobre células del sistema nervioso central, corazón, riñones, sistema gastrointestinal, tracto reproductivo y endotelio [12], promoviendo la proliferación celular, la angiogénesis e inhibiendo la apoptosis celular [13]. Estos descubrimientos expandieron las

expectativas de uso clínico para el tratamiento de otras patologías como infartos de miocardio, ataques cerebrovasculares y muchos otros relacionados con la neuroprotección [14].

La neuroprotección puede definirse como una aproximación al mantenimiento y la restauración de las interacciones celulares en el cerebro, que resultan en una máxima protección de las funciones neuronales [15]. Mediante la neuroprotección se pretende evitar la pérdida neuronal patológica en enfermedades del sistema nervioso central tales como accidentes cerebrovasculares, neurotrauma, neuroinflamación y neurodegeneración.

Las enfermedades neurodegenerativas son un conjunto de patologías que afectan al sistema nervioso, y provocan desórdenes cognitivos, alteraciones de conducta y cambios en la regulación del organismo. Se caracterizan por su cronicidad y evolución progresiva. Estas patologías incluyen enfermedades como Parkinson, diferentes tipos de demencias, Alzheimer, esclerosis múltiple y enfermedad de Huntington, entre otras, que constituyen un problema desde el punto de vista médico, asistencial, social y económico al que deben enfrentarse todos los países [16]. No obstante, a medida que la población del mundo envejezca, el impacto de los trastornos neurológicos se será mayor tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo. La carga de los trastornos neurológicos está alcanzando proporciones importantes en los países donde aumenta el porcentaje de personas mayores a 65 años. Considerando exclusivamente a la enfermedad de Alzheimer, las estadísticas indican que aproximadamente 44 millones de personas viven con demencia en todo el mundo, cifra que se estima aumentará a 115

millones en el año de 2050. Es por ello, que se considera a esta patología como una epidemia mundial [17 - 19]. Por este motivo, numerosos grupos de investigación en todo el mundo están comprometidos en la búsqueda de tratamientos que provean una cura para controlar este tipo de patologías neurodegenerativas.

El esfuerzo mancomunado de numerosos grupos de investigación ha permitido que los avances en la investigación estén entregando nuevos y promisorios antecedentes sobre el origen del problema y brindando esperanzas de poder detectarlas en etapas tempranas, como así también definir formas más específicas para atacarlas. Sin embargo, aún tales esfuerzos no han identificado algún bioterapéutico que permita curar dichas patologías. En este sentido, el mercado farmacéutico sólo ofrece medicamentos indicados para retrasar el progreso de estas enfermedades una vez que las mismas han sido detectadas pero sus beneficios son frecuentemente imperceptibles, por lo cual es necesario desarrollar nuevos tratamientos. El éxito del enfrentamiento del problema de salud que representan hoy las enfermedades neurodegenerativas dependerá, entre otros aspectos del logro de una terapia que genere beneficios y efectos perdurables por influir de manera favorable sobre la etiología o patogenia subyacente, impidiendo o demorando el inicio de la enfermedad, o el deterioro clínico gradual de manera segura, eficaz y efectiva. Pero a su vez, será necesario que devenga en una tecnología eficiente tal que se viabilice el acceso a ella por parte de grandes poblaciones. Encontrar compuestos capaces de atacar puntos claves y comunes en el desarrollo de muchas enfermedades del sistema nervioso central -tales como apoptosis, estrés oxidativo, inflamación, disfunción metabólica o neuroplasticidad comprometida- ha sido

el objetivo primordial de la industria farmacéutica durante los últimos años.

En esta área de investigación, la EPO cumple un rol muy importante debido a su capacidad para desarrollar un amplio rango de respuestas celulares en el cerebro, directamente relacionadas con la protección y la reparación del daño celular [20]. La EPO puede inducir neuroprotección a través de mecanismos antiinflamatorios, antioxidantes, antineurotóxicos, angiogénicos, neurotróficos, regenerativos y anti-apoptóticos.

En este sentido, otro avance sumamente importante en el estudio de la EPO, fue la identificación de dos sitios moleculares diferentes asociados a sus actividades biológicas eritropoyética y citoprotectora. Esas dos actividades son conferidas a través de la unión de la citoquina a dos sistemas receptores diferentes; el receptor homodimérico (EPOR)₂, responsable de la actividad eritropoyética y el receptor heterodimérico EPOR- β CR, relacionado con la actividad citoprotectora [21]. Estos descubrimientos han sido sumamente importantes, ya que han aportado la información necesaria para poder comprender las vías a través de las cuales la EPO desarrolla sus actividades biológicas y, de esta forma, permitir la modulación selectiva de su respuesta eritropoyética o citoprotectora, con el objetivo de evitar o al menos disminuir los efectos colaterales asociados al uso de agentes no selectivos como EPO o análogos de EPO.

En este sentido, si bien la EPO es considerada una droga segura y bien tolerada en el tratamiento de la anemia, cuando la EPO pretende ser utilizada como agente citoprotector en pacientes con ataques cerebrovasculares o infartos de

miocardio, es decir, como agente neuroprotector en pacientes que no padecen anemia, sus efectos hematológicos deben ser considerados como efectos secundarios, ya que puede causar policitemia, hipertensión y fenómenos protrombóticos [22-25]. Es por ello que resulta de elevada relevancia el desarrollo de análogos de EPO que modulen selectivamente su rol eritropoyético y su rol citoprotector [14]. Siguiendo este propósito, se han diseñado diversas estrategias para anular la actividad eritropoyética de la citoquina, manteniendo su potencial neuroprotector, mediante la realización de modificaciones químicas sobre la molécula o manipulación del contenido glicosídico.

Con respecto a las estrategias que emplean modificaciones químicas sobre la molécula de EPO, se ha evaluado la carbamilación de siete residuos de lisina, generando residuos de homocitrulina [26]; sin embargo, esta metodología genera cambios conformacionales en la proteína que afectan su función. Basándose en estos resultados, diferentes grupos de trabajo han modificado completamente la hEPO recombinante (rhEPO) por carbamilación, obteniendo una nueva molécula, denominada CEPO, que conserva su actividad citoprotectora, pero carece de actividad eritropoyética [26-28]. No obstante, se requieren elevadas y numerosas dosis para obtener el objetivo buscado y mantener su eficacia terapéutica.

Por otro lado, se han realizado modificaciones sobre la rhEPO, manipulando su contenido de ácido siálico (AS). En 2003, Erbayraktar y col. [29] eliminaron por completo los residuos de AS presentes en los extremos de las cadenas glicosídicas de la EPO, generando de esta forma, la denominada Asialo EPO. Esta nueva variante de EPO demostró una alta actividad *in vitro*.

Sin embargo, su actividad neuroprotectora *in vivo* fue comparable a la obtenida con la rhEPO.

Por su parte, y con el objetivo de aumentar la vida media en circulación de la citoquina estimulante de la eritropoyesis, Egrie y Brown [6] desarrollaron una proteína estimulante de la eritropoyesis: NESP, que deriva de la hEPO y exhibe dos sitios de N-glicosilación adicionales. Esta modificación permitió incrementar 3 veces el tiempo de vida media en plasma y su potencia hematopoyética *in vivo*.

Respecto a la manipulación del contenido glucídico, los inventores de la presente solicitud han obtenido una variante de la rhEPO con características similares a la EPO cerebral (rhNEPO), que es una combinación de isoformas menos acídicas de rhEPO. Ésta presentó una actividad neuroprotectora equivalente a la de rhEPO y exhibió menos de un 4% de actividad hematopoyética [30]. No obstante, la rápida eliminación plasmática de la rhNEPO resulta una desventaja al proponer a dicha molécula como candidato para el tratamiento de enfermedades neurológicas crónicas, donde se requiere una concentración plasmática sostenida en el tiempo y adecuada para ejercer su accionar biológico. Más aún, dado que la combinación de glicoformas conserva su actividad eritropoyética *in vitro*, la administración de altas y frecuentes dosis para alcanzar el objetivo conlleva el riesgo de producir efectos hematológicos, considerados como efectos secundarios adversos.

Asimismo, el estado de la técnica muestra muchos otros esfuerzos en obtener moléculas de eritropoyetina o péptidos derivados de ella que muestren actividad neuroprotectora y ausencia de actividad eritropoyética. En este sentido, la

patente US2015119325 describe una asialoerythropoietin (asialo-rhEPO) producida en vegetales. Las solicitudes de patente US2009170759, US2003130197, MXPA02011727, y US2003130197 describen péptidos que se unen al receptor de EPO para el tratamiento de enfermedades que involucran al sistema nervioso central.

El documento W02004043382 describe una variante del polipéptido de eritropoyetina humana que contiene una secuencia de aminoácidos que tiene una diferencia de aminoácidos en dos o más regiones de modificación de EPO diferentes y una actividad de eritropoyetina potenciada. La invención está dirigida a una variante humana del polipéptido de eritropoyetina que contiene una secuencia de aminoácidos de eritropoyetina humana que tiene una diferencia de aminoácidos en dos o más regiones de modificación de EPO diferentes y una actividad de eritropoyetina moderada y relacionada con su capacidad citoprotectora.

La patente US2011008363 describe diferentes variantes de EPO en las cuales se han eliminado entre 1 y 10 aminoácidos en el extremo C de la proteína. Se trata de variantes de menor masa molecular de reducida actividad eritropoyética y conservada acción neuroprotectora.

La solicitud US2007027068 describe péptidos de EPO glicopegilados. Uno de los péptidos de EPO mutado comprende la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 73) y tiene al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en Arg<139> a Ala <139>, Arg<143> en Ala <143> y Lys<154> a Ala <154>.

ES2457398 (T3) se refiere a un polinucleótido que codifica una variante de EPO.

La PCT W02005025606 (A1) describe una EPO modificada que incorpora oligosacáridos con la finalidad de aumentar la actividad eritropoyética, manteniendo su actividad citoprotectora.

Asimismo, W02006127910 describe EPO con glicosilaciones para potenciar la producción de glóbulos rojos. Sin embargo, menciona que también es útil para tratar afecciones neurodegenerativas ya que ejerce función citoprotectora.

La solicitud presentada en Argentina AR055654 describe una eritropoyetina recombinante para el tratamiento de desórdenes neurodegenerativos. En la descripción se detallan los aminoácidos que se podrían modificar para añadir sitios de glicosilación; donde se hace hincapié en la modificación de los siguientes residuos: 87, 88, 90 // 30, 32, 87, 88, 90 // 24, 87, 88, 90 // 38, 87, 88, 90 // 83, 87, 88, 90. La misma busca incorporar glicanos con el objetivo de aumentar la vida media en circulación para aumentar la actividad eritropoyética. Este mismo objeto se busca con las modificaciones introducidas en la patente W09505465 que describe variantes de eritropoyetina que poseen sitios adicionales de glicosilación. Algunos de los sitios mencionados en la patente son 25, 30, 51, 57, 69, 88, 89, 136, 138.

Además, se mencionan las siguientes sustituciones:

Asn<30>Thr<32> EPO;

Asn<51>Thr<53> EPO; Asn<57>Thr<59> EPO;

Asn<69>EP0;
 Asn<69>Thr<71> EP0;
 Ser<68>Asn<69>Thr<71> EP0;
 Val<87>Asn<88>Thr<90> EP0;
 Ser<87>Asn<88>Thr<90> EP0;
 Ser<87>Asn<88>Gly<89>Thr<90> EP0;
 Ser<87>Asn<88>Thr<90>Thr<92> EP0;
 Ser<87>Asn<88>Thr<90>Ala<162> EP0;
 Asn<69>Thr<72>Ser<87>Asn<88>Thr<90> EP0;
 Asn<30>Thr<32>Val<87>Asn<88>Thr<90> EP0;
 Asn<89>Ile<90>Thr<91> EP0;
 Ser<87>Asn<89>Ile<90>Thr<91> EP0;
 Asn<136>Thr<138> EP0;
 Asn<138>Thr<140> EP0;
 Thr<125> EP0; y
 Pro<124>Thr<125> Epo.

El documento W02005103076 describe variantes de EP0 que tienen un número par de residuos de cisteína, preferiblemente no más de cuatro residuos de cisteína, o más preferiblemente no más de dos residuos de cisteína. Se prefiere que los residuos de cisteína estén en las posiciones 7, 29, 33 y 161, más preferiblemente en las posiciones 7 y 161. Las realizaciones de variantes adicionales proporcionadas por esta solicitud incluyen cualquier mutación por adición en una o más de las siguientes posiciones: 6, 29, 33, 45, 47, 48, 49, 61, 64, 74, 88, 92, 107, 109, 133, 135, 154, 157 y 158.

En la solicitud US2011003744 se describe una formulación de eritropoyetina que comprende a dicha proteína conjugada a polietilenglicol o polietanolamina a través de los residuos

glicosídicos modificados enzimáticamente con el objetivo de incrementar sus propiedades hematopoyéticas.

El documento MXPA05000063 describe una citoquina recombinante protectora de tejido que carece de al menos uno de los efectos de la eritropoyetina sobre la médula ósea; la citoquina recombinante protectora de tejido carecería de actividad eritropoyética; más preferiblemente la citoquina recombinante protectora de tejido carece de todos los efectos de la eritropoyetina en la médula ósea. En la descripción se menciona que pueden hacerse cambios en uno o más aminoácidos, o deleciones o adiciones a la EP0. En una realización preferida, la citoquina recombinante protectora de tejido tiene una o más modificaciones en una o más de las siguientes regiones: VLQRY (aminoácidos 11-15 de eritropoyetina humana nativa, SEC ID N°: 1) y / o TKVNFYAW (aminoácidos 44-51 de eritropoyetina humana nativa, SEQ ID NO: 2) y / o SGLRSLTTL (aminoácidos 100-108 de eritropoyetina humana nativa, SEQ ID NO: 3) y / o SNFLRG (aminoácidos 146-151 de nativo, eritropoyetina humana; SEC ID N°: 4). Se pueden proporcionar otras mutaciones en los aminoácidos 7, 20, 21, 29, 33, 38, 42, 59, 63, 67, 70, 83, 96, 126, 142, 143, 152, 153, 155, 156 y 161 de SEQ ID NO: 10. Estas otras mutaciones pueden ser únicas o adicionales a al menos una mutación en al menos una de las regiones mencionadas anteriormente. En ciertas realizaciones, los cambios en uno o más aminoácidos de TKVNFYAW (aminoácidos 44-51 de la eritropoyetina humana nativa, SEQ ID NO: 2) dan como resultado una molécula de eritropoyetina modificada con función parcial; es decir, que tiene menos actividad eritropoyética que rhEP0. En otras realizaciones, cambios en uno o más aminoácidos de SGLRSLTTL (aminoácidos 100-108 de eritropoyetina humana nativa, SEC ID NO: 3), incluso se

mencionan modificaciones en el contenido de ácido siálico o moléculas carentes de glicanos o modificaciones en carbohidratos como oxidación, reducción o variantes con modificaciones químicas tales como nitración, acilación, succinilación, biotinilación, yodación y carbamilación. En ningún caso se hace mención de la adición de nuevos glicanos en los sitios responsables de la actividad eritropoyética con el objetivo de reducir o bloquear la misma.

Es posible apreciar que los esfuerzos descritos en el estado de la técnica, desarrollados hasta el momento, no han arrojado resultados exitosos en la obtención de una eritropoyetina que muestre actividad neuroprotectora y ausencia de actividad eritropoyética. La presente invención presenta nuevas muteínas de hEPO que han demostrado efectos neuroprotectores y neurotróficos. Dichas muteínas fueron obtenidas mediante un proceso original, donde se modifica la molécula de hEPO mediante la generación de nuevos sitios consenso para N-glicosilación sobre la región molecular de la hEPO responsable de su unión a los receptores homo y heterodiméricos. De forma inesperada, las nuevas muteínas de hEPO carecen de actividad eritropoyética pero mantienen inalterada, o mejorada aún, su actividad neuroprotectora/neuroplástica y, a su vez, presentan mejoras en sus propiedades farmacocinéticas. Las modificaciones de la EPO original son mínimas, lo cual permite conservar una gran semejanza con la estructura de la proteína natural.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención describe una eritropoyetina humana modificada con ausencia o disminución de su actividad

eritropoyética, preferentemente con hasta un 0,5% de actividad eritropoyética en relación a la eritropoyetina humana, mayor tiempo de vida media en plasma, que mantiene su capacidad neuroprotectora y neuroplástica. Esta eritropoyetina humana modificada tiene anulada parcial o totalmente su unión a al menos uno de los receptores homo o heterodiméricos. Dicha anulación comprende la mutación de uno de los sitios de unión a los receptores homo o heterodiméricos mediante la incorporación de sitios consenso de N-glicosilación.

En una forma preferida de realización de la presente invención, la eritropoyetina humana modificada de la presente invención posee la siguiente mutación Tyr15Asn y Leu17Thr y comprende la SEQ ID N°2.

En una forma preferida de realización de la presente invención, la eritropoyetina humana modificada de la presente invención posee la siguiente mutación Lys45Asn y Asn47Thr y comprende la SEQ ID N°4.

En una forma preferida de realización de la presente invención, la eritropoyetina humana modificada de la presente invención posee la siguiente mutación Glu62Asn y Trp64Thr y comprende la SEQ ID N°8.

En una forma preferida de realización de la presente invención, la eritropoyetina humana modificada de la presente invención posee la siguiente mutación Gln65Asn y Leu67Thr y comprende la SEQ ID N°10.

En una forma preferida de realización de la presente invención, la eritropoyetina humana modificada de la presente invención

posee la siguiente mutación Glu72Asn y Val74Thr y comprende la SEQ ID N°12.

En una forma preferida de realización de la presente invención, la eritropoyetina humana modificada de la presente invención posee la siguiente mutación Arg76Asn y Gln78Thr y comprende la SEQ ID N°14.

En una forma preferida de realización de la presente invención, la eritropoyetina humana modificada de la presente invención posee la siguiente mutación Ala98Asn y Ser100Thr y comprende la SEQ ID N°16.

En una forma preferida de realización de la presente invención, la eritropoyetina humana modificada de la presente invención posee la siguiente mutación Ser104Asn y comprende la SEQ ID N°18.

En una forma preferida de realización de la presente invención, la eritropoyetina humana modificada de la presente invención posee la siguiente mutación Thr106Asn y Leu108Thr y comprende la SEQ ID N°20.

En una forma preferida de realización de la presente invención, la eritropoyetina humana modificada de la presente invención posee la siguiente mutación Leu149Thr y comprende la SEQ ID N°22.

En una forma preferida de realización de la presente invención, la eritropoyetina humana modificada de la presente invención posee la siguiente mutación Gly151Asn y Leu153Thr y comprende la SEQ ID N°24.

La eritropoyetina humana modificada de la presente invención posee una actividad eritropoyética de hasta 1% en relación a la eritropoyetina humana. Preferentemente posee hasta un 0,5% de actividad eritropoyética en relación a la eritropoyetina humana. Mas preferentemente posee hasta un 0,2% de actividad eritropoyética en relación a la eritropoyetina humana.

Por otra parte, en la presente invención se describen ácidos nucleicos que comprenden las secuencias de nucleótidos de la eritropoyetina de la presente invención. Asimismo, se describen las secuencias de ADN que codifican para cada una de las muteínas descritas y generadas, donde dichas secuencias de ADN son SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13, SEQ ID N°15, SEQ ID N°17, SEQ ID N°19, SEQ ID N°21 y SEQ ID N°23. En otra forma alternativa de realización de la presente invención, dichos ácidos nucleicos son vectores para transformar células, o son vectores de expresión o vectores lentivirales.

En una forma preferida de realización de la presente invención la secuencia de ácido nucleico que codifica para la eritropoyetina humana modificada de la presente invención es SEQ ID N°1.

En una forma preferida de realización de la presente invención la secuencia de ácido nucleico que codifica para la eritropoyetina humana modificada de la presente invención es SEQ ID N°3.

En una forma preferida de realización de la presente invención la secuencia de ácido nucleico que codifica para la

eritropoyetina humana modificada de la presente invención es SEQ ID N°7.

En una forma preferida de realización de la presente invención la secuencia de ácido nucleico que codifica para la eritropoyetina humana modificada de la presente invención es SEQ ID N°9.

En una forma preferida de realización de la presente invención la secuencia de ácido nucleico que codifica para la eritropoyetina humana modificada de la presente invención es SEQ ID N°11.

En una forma preferida de realización de la presente invención la secuencia de ácido nucleico que codifica para la eritropoyetina humana modificada de la presente invención es SEQ ID N°13.

En una forma preferida de realización de la presente invención la secuencia de ácido nucleico que codifica para la eritropoyetina humana modificada de la presente invención es SEQ ID N°15.

En una forma preferida de realización de la presente invención la secuencia de ácido nucleico que codifica para la eritropoyetina humana modificada de la presente invención es SEQ ID N°17.

En una forma preferida de realización de la presente invención la secuencia de ácido nucleico que codifica para la eritropoyetina humana modificada de la presente invención es SEQ ID N°19.

En una forma preferida de realización de la presente invención la secuencia de ácido nucleico que codifica para la eritropoyetina humana modificada de la presente invención es SEQ ID N°21.

En una forma preferida de realización de la presente invención la secuencia de ácido nucleico que codifica para la eritropoyetina humana modificada de la presente invención es SEQ ID N°23.

Asimismo, la presente invención describe células genéticamente modificadas con cualquiera de las secuencias de ADN seleccionadas del conjunto comprendido por SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13, SEQ ID N°15, SEQ ID N°17, SEQ ID N°19, SEQ ID N°21 y SEQ ID N°23; donde dicha célula genéticamente modificada es capaz de expresar la eritropoyetina modificada de la presente invención. En un aspecto preferido de realización, dicha célula genéticamente modificada es una célula vegetal, o célula animal o cualquier huésped celular que permita adición de N-galicanos. Preferentemente dicha célula derivada de una línea celular animal. Preferentemente dicha línea celular es seleccionada del conjunto comprendido por CHO.K1, HEK293, NS0, BHK-21 y HeLa.

Por otra parte, la presente invención describe un proceso de obtención de la eritropoyetina humana modificada que comprende los siguientes pasos:

- a. disponer de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican dicha eritropoyetina humana modificada;

- b. construir, al menos, un vector de cotransfección de células empaquetadoras;
- c. cotransfectar células empaquetadoras productoras de partículas lentivirales que contienen dicha secuencia de ácido nucleico que codifica para dicha eritropoyetina humana modificada;
- d. cosechar dichas partículas lentivirales producidas por las células empaquetadoras del paso c-;
- e. transducir células capaces de expresar la eritropoyetina humana modificada con dichas partículas lentivirales de dicho paso d-;
- f. seleccionar las células del paso e- que comprendan la secuencia de ácido nucleico que codifica para la eritropoyetina humana modificada;
- g. cultivar las células del paso f- para que expresen dicha eritropoyetina humana modificada y;
- h. aislar y purificar dicha eritropoyetina humana modificada.

Donde en dicho paso a-, las secuencias de ácido nucleico son seleccionadas del conjunto comprendido por SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13, SEQ ID N°15, SEQ ID N°17, SEQ ID N°19, SEQ ID N°21 y SEQ ID N°23.

Donde en dicho paso b-; comprende un vector que permite la entrada de la partícula lentiviral en la célula, un vector que codifica para proteína de matriz, cápside, proteasa transcriptasa inversa e integrasa lentivirales, un vector de transferencia que comprende la secuencia de eritropoyetina humana modificada y un vector que induce la exportación nuclear de dicho vector de transferencia.

Donde en dicho paso e-, dichas células son seleccionadas del conjunto comprendido por CHO.K1, HEK293, NS0, BHK-21 y HeLa.

Donde dicho paso h-, es una purificación por inmunoafinidad que comprende un anticuerpo anti-rhEPO, y un eluyente.

Donde dicho eluyente es seleccionado del conjunto comprendido por glicina, ácido acético - NaCl, sales de acetato, ácido cítrico, sales de fosfato, etanol, isopropanol, dioxano, etilenglicol tris/HCl, y sus mezclas. Preferentemente, dicho eluyente es seleccionado del conjunto comprendido por glicina, ácido acético- NaCl. Más preferentemente, dicho eluyente es seleccionado del conjunto comprendido por glicina 0,1 M pH=2; glicina 0,15 M pH=2,5 y ácido acético 0,2 M, NaCl 0,15 M pH=3.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Esquema de la secuencia de pasos para obtener las 12 muteínas de hEPO mediante mutagénesis sitio-dirigida.

Figura 2. Análisis de los fragmentos obtenidos en cada una de las reacciones de PCR mediante el empleo de geles de agarosa.
a- Fragmentos obtenidos a partir de la PCR1. b- Fragmentos obtenidos a partir de la PCR2.

Figura 3. Análisis *in silico* de la potencial antigenicidad de las muteínas de hEPO y de la molécula sin modificar empleando la base de datos IEDB.

Figura 4. *Western blot* que confirma la inserción de los nuevos sitios de N-glicosilación.

Figura 5. Capacidad de elución de la molécula de rhEPO o de sus muteínas evaluada mediante técnica de ELISA sándwich

- Protocolo A (capacidad eluyente luego de formarse el complejo Ag-Ac).
- Protocolo B (grado de preservación de la capacidad de unión a las moléculas de interés luego de tratar el mAb con diferentes eluyentes).

Figura 6. Purificación de la muteína Mut 104 de hEPO mediante CIA empleando el mAb 2B2

A- Cromatograma completo obtenido durante la purificación de la muteína Mut 104 de hEPO.

B- Ampliación de la zona de elución del cromatograma A.

Figura 7. Evaluación de la purificación de la muteína Mut 104 mediante CIA empleando glicina 0,15 M pH 2,5 como solución eluyente. Muestras: 1- Siembra, 2- *Flowthrough*, 3- Lavado 1, 4- Lavado 2, 5- Lavado 3, 6 Mezcla de fracciones de elución, 7- Estándar rhEPO (Zelltek S. A).

Figura 8. Evaluación de la pureza de los eluatos obtenidos luego del procedimiento de CIA de las muteínas de hEPO. Muestras: 1. Marcador de masa molecular, 2. Estándar de rhEPO (Zelltek S. A.), 3. Eluato Mut 45_47, 4. Eluato Mut 104, 5. Eluato Mut 151_153.

Figura 9. Determinación de las masas moleculares aparentes de las muteínas de hEPO. MM: Marcador de masa molecular.

Figura 10. IEF de las muteínas de hEPO purificadas mediante CIA. Muestras: 1- Mut 45_47, 2- Mut 104, 3- Estándar de rhEPO (Zelltek S.A).

Figura 11. Electroferogramas de ECZ obtenidos para rhEPO y sus muteínas. A: Mut 45_47; B: Mut 104; C: rhEPO. La denominación *Peak* corresponde a cada pico asignado en el electroferograma de ECZ y Área (%) representa el porcentaje de cada isoforma, calculado mediante la integración del área bajo la curva de cada pico.

Figura 12-a-. Comparación de la actividad biológica eritropoyética específica evaluada *in vitro* de las muteínas de hEPO.

Figura 12 -b-. Evaluación de la actividad eritropoyética *in vivo* de las muteínas de hEPO. La actividad eritropoyética *in vivo* de las muteínas (Mut) de hEPO se evaluó en ratones normocitémicos (n=4), los cuales fueron tratados con igual masa de rhEPO o mut hEPO, según corresponda o con PBS como control. Luego del tratamiento, se cuantificó el % de reticulocitos para cada tratamiento. *** $p \leq 0,001$ y ns (no significativo) representan el grado de significancia estadística luego de la aplicación del test ANOVA y test post-ANOVA de Tukey (n=4).

Figura 13. Actividad cito/neuroprotectora de rhEPO y de la Mut 104, empleando cultivos de células de origen neuronal SH-SY5Y. CSTP: control del agregado de estaurosporina (STP), Ccel: control celular (sin agregado de STP ni de muteínas). * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$ representan el grado de significancia estadística luego de la aplicación del test ANOVA y test post-ANOVA de Dunnet (n=3).

Figura 14. Esquema representativo del desarrollo neuronal en cultivos primarios de neuronas de hipocampo.

Figura 15. Evaluación de la formación de neuritas mediante el empleo de células murinas N2a. (a) Imágenes representativas de cada uno de los grupos estudiados. (b) Representación gráfica obtenida a partir de la evaluación de los siguientes parámetros de las neuritas: longitud promedio, extensión de la neurita más larga y número promedio de neuritas por neurona. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$ representan el grado de significancia estadística luego de la aplicación del test ANOVA y test post-ANOVA Bonferroni (n=3).

Figura 16. Evaluación de densidad de filopodios mediante el empleo de cultivos primarios de neuronas de hipocampo de embriones de rata. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$ representan el grado de significancia estadística luego de la aplicación del test ANOVA y test post-ANOVA Bonferroni (n=3).

Figura 17. Evaluación de la formación de sinapsis mediante el empleo de cultivos primarios de neuronas de hipocampo de embriones de rata. * $p \leq 0,05$ y *** $p \leq 0,001$ representan el grado de significancia estadística luego de la aplicación del test ANOVA y test post-ANOVA Bonferroni (n=3).

Figura 18. Evaluación de la actividad biológica neuroprotectora de las muteínas de hEP0 sobre cultivos neuronales primarios de 11 DIV. La actividad neuroprotectora *in vitro* de las muteínas de hEP0 (Mut) se evaluó a partir de cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratas Sprague-Dawley de 11 DIV. Los cultivos fueron tratados con igual masa de rhEP0 o de las muteínas, según corresponda, o con PBS como control. Luego, se indujo la apoptosis mediante incubación con estaurosporina (STP). Se realizó una inmunofluorescencia con los reactivos Hoescht y phalloidin-FITC para analizar el porcentaje de

núcleos apoptóticos. *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$ y ns (no significativo) representan el grado de significancia estadística luego de la aplicación del test ANOVA y test post-ANOVA de Bonferroni.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Tal como se ha dicho en el estado de la técnica se han intentado diseñar diversas estrategias para disminuir la actividad eritropoyética de la citoquina, manteniendo su potencial neuroprotector y neurotrófico, las cuales se han basado en la realización de modificaciones químicas sobre la molécula o la manipulación de su contenido glicosídico. Sin embargo, el estado de la técnica no ha descrito la utilización de la glicosilación como mecanismo de bloqueo de la porción molecular implicada en la interacción responsable de la eritropoyesis. De este modo, la presente invención provee de una nueva eritropoyetina modificada que resuelve los problemas mencionados del estado de la técnica logrando simultáneamente:

- inhibir la función hematopoyética de la hEPO en pacientes que requieren tratamiento relacionado con la neuroprotección y donde la eritropoyesis se convierte en efecto adverso,
- extender la vida media de la hEPO de manera de mejorar la actividad biológica *in vivo* y así disminuir el número de dosis a aplicar

Así, la presente invención comprende el uso de muteínas hiperglicosiladas derivadas de hEPO para la preparación de una composición farmacéutica destinada a la prevención o el tratamiento de una enfermedad o predisposición genética a

padecer tal enfermedad, en donde la neuroplasticidad y/o la neuroprotección tienen un efecto beneficioso. La presente invención podría suministrarse a pacientes con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), esclerosis amiotrófica lateral (ELA) entre otras; a pacientes que sufren enfermedades de las neuronas motoras, como la enfermedad de Huntington, atrofas espinocerebelosas, la enfermedad de Creutzfeld-Jakob entre otras; enfermedades incapacitantes como la depresión o la esquizofrenia; enfermedades del desarrollo como el síndrome de Down y así como personas que han sufrido daño del tejido nervioso de los accidentes cerebrovasculares (ACV) o las traumatismos cráneo-encefálicos.

Por muteína, este documento, se refiere a una proteína que ha sido modificada mediante una mutación sitio-dirigida que comprende el reemplazo de 1 o 2 de sus residuos aminoácidos de manera de introducir un sitio consenso y potencial para N-glicosilación.

La generación o adición de sitios consenso de N-glicosilación comprende la mutación de un aminoácido en un sitio o región de la molécula de interés. Para que una célula realice la adición de glicanos es necesaria la presencia de un sitio Asn-Xaa-Ser/Thr, donde Xaa puede ser cualquier aminoácido distinto de Pro. Para ello, si en el sitio que desea adicionar un sitio de N-glicosilación existe un residuo de Asn, se muta el aminoácido en posición +2 (con respecto a Asn) por Thr que tiene mayor eficiencia respecto a Ser para que el residuo Asn se ocupe con glicanos. En forma diferente, si en el sitio a modificar existe un aminoácido que en posición +2 con respecto a él evidencia la presencia de Ser o Thr, dicho aminoácido es mutado por Asn.

Es decir en todo momento se está en presencia de cambios conservativos.

La presente invención describe una eritropoyetina humana que presenta una modificación de la estructura de aminoácidos que logra:

- i. No modificar aquellos residuos aminoacídicos que constituyen sitios esenciales para la conformación molecular o para el desarrollo de la actividad neuroprotectora/neuroplástica.
- ii. Modificar los aminoácidos postulados en la anulación de la actividad hematopoyética.
- iii. Generar sitios consenso de N-glicosilación.

Se han construido 12 muteínas de hEPO en las cuales se llevó a cabo la modificación de 1 o 2 aminoácidos para incorporar sitios consenso de N-glicosilación con el fin de anular la actividad hematopoyética, conservar la actividad neuroprotectora/neuroplástica y obtener mutantes con superior vida media plasmática.

A continuación se detallan los ensayos realizados para la obtención de las moléculas de la presente invención. Dichos ensayos son a modo de ejemplo de aplicación y deben ser entendidos en su más amplio sentido, sin limitar el espectro de protección de la presente invención.

1. Diseño y obtención de muteínas derivadas de hEPO que anulan la actividad eritropoyética y conservan la acción neuroprotectora/neuroplástica.

Se procedió al diseño de 26 oligonucleótidos: 2 de ellos, para amplificar las nuevas secuencias de EPO completas y los 24 restantes (oligonucleótidos *forward* y *reverse*) para introducir las 12 mutaciones puntuales.

De acuerdo a lo descrito en la presente invención las modificaciones introducidas deben interpretarse como la sustitución de un aminoácido de una posición dada por otro aminoácido en la misma posición. De esta forma, y tomando como ejemplo la Mutación 1(Lys45 →Asn45) + (Asn47 → Thr47) debe interpretarse, el cambio del residuo de lisina de la posición 45 por el residuo de asparagina en dicha posición y el cambio de asparagina en la posición 47 por treonina.

La estrategia utilizada para generar las muteínas de hEPO mediante mutagénesis sitio-dirigida se resumen en el esquema de la figura 1.

Empleando el ADN de hEPO como templado, los oligonucleótidos para cada mutante y los oligonucleótidos pMATEPOF (GCCGTCAAGGCCACGTGTCTTGTCCA) y PMATEPOR (AGGCCAGTCTTGTGCTCCAGGTACCG) que se unen complementariamente a los extremos de la secuencia de hEPO, se realizó una primera PCR para introducir cada una de las mutaciones que fueron antes mencionadas. Se obtuvieron 24 fragmentos, correspondientes a las 12 muteínas de hEPO. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de dichas 12 muteínas de hEPO (muteínas) sintetizadas son:

MUTEÍNA 15-17 (Tyr15 →Asn15) + (Leu17 → Thr17)

Los *primers* utilizados fueron:

Mut15_17F:GTGCTGGAAAGAAACCTGACGGAAAGCCAAA

MUT15_17R:TTTGGCTTCCGTCAGGTTTCTTTCCAGCAC

SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DE LA MUTEÍNA 15-17 (SEQ ID N°1)

ATGGGCGTGCACGAATGTCCTGCTTGGCTGTGGCTGCTGCTGTCCCTGCTGTCTCTGCCTC
TGGGACTGCCTGTGCTGGGCGCTCCTCCTAGACTGATCTGCGACTCCCGGGTGCTGGAAAG
AAACCTGCTGGAAGCCAAAGAGGCCGAGAACATCACCACCGGCTGCGCCGAGCACTGCTCC
CTGAACGAGAATATCACCGTGCCCGACACCAAAGTGAACCTTCTACGCCTGGAAGCGGATGG
AAGTGGGCCAGCAGGCTGTGGAAGTGTGGCAGGGACTGGCTCTGCTGAGCGAGGCTGTGCT
GAGAGGACAGGCCCTGCTCGTGAACCTCCTCCCAGCCTTGGAACCCCTGCAGCTGCACGTG
GACAAGGCTGTGTCCGGCCTGAGATCCCTGACCACCCTGCTGAGAGCACTGGGAGCCCAGA
AAGAGGCCATCTCTCCACCTGACGCCGCCTCTGCTGCTCCTCTGAGAACCATCACCGCCGA
CACCTTCAGAAAGCTGTTCCGGGTGTACTCCAACCTTCTGCGGGGCAAGCTGAAGCTGTAC
ACCGGCGAGGCTTGCCGGACCGGCGACAGA

SECUENCIA DE AA DE LA MUTEÍNA 15-17 (SEQ ID N°2)

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRILICDSRVLERNLLEAKEAENITTGCAEHCS
LNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHV
DKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLY
TGEACRTGDR

MUTEÍNA 45-47 (Lys45 →Asn45) + (Asn47 → Thr47)

Los *primers* utilizados fueron:

Mut45_47F:CCCGACACCAACGTGACCTTCTACGCC

Mut45_47R:GGCGTGAAGGTCACGTTGGTGTCTGGG

SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DE LA MUTEÍNA 45-47 (SEQ ID N°3)

ATGGGCGTGCACGAATGTCCTGCTTGGCTGTGGCTGCTGCTGTCCCTGCTGTCTCTGCCTC
TGGGACTGCCTGTGCTGGGCGCTCCTCCTAGACTGATCTGCGACTCCCGGGTGCTGGAAAG
ATACCTGCTGGAAGCCAAAGAGGCCGAGAACATCACCACCGGCTGCGCCGAGCACTGCTCC
CTGAACGAGAATATCACCGTGCCCGACACCAACGTGACCTTCTACGCCTGGAAGCGGATGG
AAGTGGGCCAGCAGGCTGTGGAAGTGTGGCAGGGACTGGCTCTGCTGAGCGAGGCTGTGCT
GAGAGGACAGGCCCTGCTCGTGAACCTCCTCCCAGCCTTGGAACCCCTGCAGCTGCACGTG

GACAAGGCTGTGTCCGGCCTGAGATCCCTGACCACCCTGCTGAGAGCACTGGGAGCCCAGA
 AAGAGGCCATCTCTCCACCTGACGCCGCCTCTGCTGCTCCTCTGAGAACCATCACCGCCGA
 CACCTTCAGAAAGCTGTTCCGGGTGTACTCCAACCTTCCTGCGGGGCAAGCTGAAGCTGTAC
 ACCGGCGAGGCTTGCCGGACCGGCGACAGA

SECUENCIA DE AA DE LA MUTEÍNA 45-47 (SEQ ID N°4)

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRILICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCS
 LNENITVPDTNVTIFYAWKRMEVGQQAQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHV
 DKAIVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLY
 TGEACRTGDR

MUTEÍNA 49 (Tyr49 →Thr49)

Los *primers* utilizados fueron:

Mut49F:AAAGTGAACCTTCACCGCCTGGAAGCGG

Mut49R:CCGCTTCCAGGCGGTGAAGTTCACTTT

SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DE LA MUTEÍNA 49 (SEQ ID N°5)

ATGGGCGTGACGAATGTCCTGCTTGGCTGTGGCTGCTGCTGTCCCTGCTGTCTCTGCCTC
 TGGGACTGCCTGTGCTGGGCGCTCCTCCTAGACTGATCTGCGACTCCCGGGTGCTGGAAAG
 ATACCTGCTGGAAGCCAAAGAGGCCGAGAACATCACACCGGCTGCGCCGAGCACTGCTCC
 CTGAACGAGAATATCACCGTGCCCGACACCAAAGTGAACCTTCACCGCCTGGAAGCGGATGG
 AAGTGGGCCAGCAGGCTGTGGAAGTGTGGCAGGGACTGGCTCTGCTGAGCGAGGCTGTGCT
 GAGAGGACAGGCCCTGCTCGTGAACCTCCTCCCAGCCTTGGGAACCCCTGCAGCTGCACGTG
 GACAAGGCTGTGTCCGGCCTGAGATCCCTGACCACCCTGCTGAGAGCACTGGGAGCCCAGA
 AAGAGGCCATCTCTCCACCTGACGCCGCCTCTGCTGCTCCTCTGAGAACCATCACCGCCGA
 CACCTTCAGAAAGCTGTTCCGGGTGTACTCCAACCTTCCTGCGGGGCAAGCTGAAGCTGTAC
 ACCGGCGAGGCTTGCCGGACCGGCGACAGA

SECUENCIA DE AA DE LA MUTEÍNA 49 (SEQ ID N°6)

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRILICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCS
 LNENITVPDTKVNFTAWKRMEVGQQAQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHV

DKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLY
TGEACRTGDR

MUTEÍNA 62-64 (Glu62 →Asn62) + (Trp64→Thr64)

Los *primers* utilizados fueron:

Mut62_64F: CAGGCTGTGAACGTGAACGCAGGGACTG

MUT62_64R: CAGTCCCTGCGTCACGTTACAGCCTG

SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DE LA MUTEÍNA 62-64 (SEQ ID N°7)

ATGGGCGTGCACGAATGTCCTGCTTGGCTGTGGCTGCTGCTGTCCCTGCTGTCTCTGCCTC
TGGGACTGCCTGTGCTGGGCGCTCCTCCTAGACTGATCTGCGACTCCCGGGTGCTGGAAAG
ATACCTGCTGGAAGCCAAAGAGGCCGAGAACATCACACCGGCTGCGCCGAGCACTGCTCC
CTGAACGAGAATATCACCGTGCCCGACACCAAAGTGAACCTTCTACGCCTGGAAGCGGATGG
AAGTGGGCCAGCAGGCTGTGAACGTGACGCAGGGACTGGCTCTGCTGAGCGAGGCTGTGCT
GAGAGGACAGGCCCTGCTCGTGAACCTCCTCCCAGCCTTGGGAACCCCTGCAGCTGCACGTG
GACAAGGCTGTGTCCGGCCTGAGATCCCTGACCACCCTGCTGAGAGCACTGGGAGCCCAGA
AAGAGGCCATCTCTCCACCTGACGCCGCCTCTGCTGCTCCTCTGAGAACCATCACCGCCGA
CACCTTCAGAAAGCTGTTCCGGGTGTACTCCAACCTTCTGCGGGGCAAGCTGAAGCTGTAC
ACCGGCGAGGCTTGCCGGACCGGCGACAGA

SECUENCIA DE AA DE LA MUTEÍNA 62-64 (SEQ ID N°8)

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRILICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCS
LNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVNVTQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHV
DKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLY
TGEACRTGDR

MUTEÍNA 65-67 (Gln65 →Asn65) + (Leu67→Thr67)

Los *primers* utilizados fueron:

Mut65_67F: GAAGTGTGGAACGGAACGGCTCTGCTG

MUT65_67R: CAGCAGAGCCGTTCCGTTCCACACTTC

SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DE LA MUTEÍNA 65-67 (SEQ ID N°9)

ATGGGCGTGACGAATGTCCTGCTTGGCTGTGGCTGCTGCTGTCCCTGCTGTCTCTGCCTC
 TGGGACTGCCTGTGCTGGGCGCTCCTCCTAGACTGATCTGCGACTCCCGGGTGCTGGAAAG
 ATACCTGCTGGAAGCCAAAGAGGCCGAGAACATCACCACCGGCTGCGCCGAGCACTGCTCC
 CTGAACGAGAATATCACCGTGCCCGACACCAAAGTGAACCTTCTACGCCTGGAAGCGGATGG
 AAGTGGGCCAGCAGGCTGTGGAAGTGTGGAACGGAACGGCTCTGCTGAGCGAGGCTGTGCT
 GAGAGGACAGGCCCTGCTCGTGAACCTCCTCCCAGCCTTGGAACCCCTGCAGCTGCACGTG
 GACAAGGCTGTGTCCGGCCTGAGATCCCTGACCACCCTGCTGAGAGCACTGGGAGCCCAGA
 AAGAGGCCATCTCTCCACCTGACGCCGCCTCTGCTGCTCCTCTGAGAACCATCACCGCCGA
 CACCTTCAGAAAGCTGTTCCGGGTGTACTCCAACCTTCTGCGGGGCAAGCTGAAGCTGTAC
 ACCGGCGAGGCTTGCCGGACCGGCGACAGA

SECUENCIA DE AA DE LA MUTEÍNA 65-67 (SEQ ID N°10)

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCS
 LNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQAVEVWNGTALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHV
 DKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLY
 TGEACRTGDR

MUTEÍNA 72-74 (Glu72 →Asn72) + (Val74→Thr74)

Los *primers* utilizados fueron:

Mut72_74F: CTGCTGAGCAACGCTACGCTGAGAGGA

MUT72_74R: TCCTCTCAGCGTAGCGTTGCTCAGCAG

SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DE LA MUTEÍNA 72-74 (SEQ ID N°11)

ATGGGCGTGACGAATGTCCTGCTTGGCTGTGGCTGCTGCTGTCCCTGCTGTCTCTGCCTC
 TGGGACTGCCTGTGCTGGGCGCTCCTCCTAGACTGATCTGCGACTCCCGGGTGCTGGAAAG
 ATACCTGCTGGAAGCCAAAGAGGCCGAGAACATCACCACCGGCTGCGCCGAGCACTGCTCC
 CTGAACGAGAATATCACCGTGCCCGACACCAAAGTGAACCTTCTACGCCTGGAAGCGGATGG
 AAGTGGGCCAGCAGGCTGTGGAAGTGTGGCAGGGACTGGCTCTGCTGAGCAACGCTACGCT
 GAGAGGACAGGCCCTGCTCGTGAACCTCCTCCCAGCCTTGGAACCCCTGCAGCTGCACGTG
 GACAAGGCTGTGTCCGGCCTGAGATCCCTGACCACCCTGCTGAGAGCACTGGGAGCCCAGA
 AAGAGGCCATCTCTCCACCTGACGCCGCCTCTGCTGCTCCTCTGAGAACCATCACCGCCGA

CACCTTCAGAAAGCTGTTCCGGGTGTACTCCAACCTTCCTGCGGGGCAAGCTGAAGCTGTAC
ACCGGCGAGGCTTGCCGGACCGGCGACAGA

SECUENCIA DE AA DE LA MUTEÍNA 72-74 (SEQ ID N°12)

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCS
LNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAWEVWQGLALLSNATLRGQALLVNSSQPWEPLQLHV
DKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLY
TGEACRTGDR

MUTEÍNA 76-78 (Arg76 →Asn76) + (Gln78→Thr78)

Los *primers* utilizados fueron:

Mut76_78F: GCTGTGCTGAACGGAACGGCCCTGCTC

MUT76_78R: GAGCAGGGCCGTTCCGTTCAGCACAGC

SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DE LA MUTEÍNA 76-78 (SEQ ID N°13)

ATGGGCGTGACGAATGTCCTGCTTGGCTGTGGCTGCTGCTGTCCCTGCTGTCTCTGCCTC
TGGGACTGCCTGTGCTGGGCGCTCCTCCTAGACTGATCTGCGACTCCCGGGTGCTGGAAAG
ATACCTGCTGGAAGCCAAAGAGGCCGAGAACATCACCACCGGCTGCGCCGAGCACTGCTCC
CTGAACGAGAATATCACCGTGCCCGACACCAAAGTGAACCTTCTACGCCTGGAAGCGGATGG
AAGTGGGCCAGCAGGCTGTGGAAGTGTGGCAGGGACTGGCTCTGCTGAGCGAGGCTGTGCT
GAACGGAACGGCCCTGCTCGTGAACCTCCTCCAGCCTTGGAACCCCTGCAGCTGCACGTG
GACAAGGCTGTGTCCGGCCTGAGATCCCTGACCACCCTGCTGAGAGCACTGGGAGCCCAGA
AAGAGGCCATCTCTCCACCTGACGCCGCCTCTGCTGCTCCTCTGAGAACCATCACCGCCGA
CACCTTCAGAAAGCTGTTCCGGGTGTACTCCAACCTTCCTGCGGGGCAAGCTGAAGCTGTAC
ACCGGCGAGGCTTGCCGGACCGGCGACAGA

SECUENCIA DE AA DE LA MUTEÍNA 76-78 (SEQ ID N°14)

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCS
LNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAWEVWQGLALLSEAVLNGTALLVNSSQPWEPLQLHV
DKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLY
TGEACRTGDR

MUTEÍNA 98-100 (Ala98 →Asn98) +(Ser100→Thr100)

Los *primers* utilizados fueron:

Mut98_100F:GTGGACAAGAAATGTGACCGGCCTGAGATCC

MUT98_100R:GGATCTCAGGCCGGTCACATTTCTTGTCCAC

SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DE LA MUTEÍNA 98-100 (SEQ ID N°15)

ATGGGCGTGCACGAATGTCCTGCTTGGCTGTGGCTGCTGCTGTCCCTGCTGTCTCTGCCTC
TGGGACTGCCTGTGCTGGGCGCTCCTCCTAGACTGATCTGCGACTCCCGGGTGCTGGAAAG
ATACCTGCTGGAAGCCAAAGAGGCCGAGAACATCACCACCGGCTGCGCCGAGCACTGCTCC
CTGAACGAGAATATCACCGTGCCCGACACCAAAGTGAAC TTCTACGCCTGGAAGCGGATGG
AAGTGGGCCAGCAGGCTGTGGAAGTGTGGCAGGGACTGGCTCTGCTGAGCGAGGCTGTGCT
GAGAGGACAGGCCCTGCTCGTGAAC TCCTCCCAGCCTTGGAACCCCTGCAGCTGCACGTG
GACAAGAATGTGACCGGCCTGAGATCCCTGACCACCCTGCTGAGAGCACTGGGAGCCCAGA
AAGAGGCCATCTCTCCACCTGACGCCGCCTCTGCTGCTCCTCTGAGAACCATCACCGCCGA
CACCTTCAGAAAGCTGTTCCGGGTGTACTCCAAC TTCTGCGGGGCAAGCTGAAGCTGTAC
ACCGGCGAGGCTTGCCGGACCGGCGACAGA

SECUENCIA DE AA DE LA MUTEÍNA 98-100 (SEQ ID N°16)

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPR LICDSRV LERYLLEAKEAENITTGCAEHCS
LNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQA VE VWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHV
DKNVTGLRSLTTL LRALGAQKEAISPPDAASAAPLRITITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLY
TGEACRTGDR

MUTEÍNA 104 (Ser104 →Asn104)

Los *primers* utilizados fueron:

Mut104F:TCCGGCCTGAGAAAACCTGACCACCCTG

MUT104R: CAGGGTGGTCAGGTTTCTCAGGCCGGA

SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DE LA MUTEÍNA 104 (SEQ ID N°17)

ATGGGCGTGCACGAATGTCCTGCTTGGCTGTGGCTGCTGCTGTCCCTGCTGTCTCTGCCTC
TGGGACTGCCTGTGCTGGGCGCTCCTCCTAGACTGATCTGCGACTCCCGGGTGCTGGAAAG
ATACCTGCTGGAAGCCAAAGAGGCCGAGAACATCACCACCGGCTGCGCCGAGCACTGCTCC

CTGAACGAGAATATCACCGTGCCCGACACCAAAGTGAAC TTCTACGCCTGGAAGCGGATGG
 AAGTGGGCCAGCAGGCTGTGGAAGTGTGGCAGGGACTGGCTCTGCTGAGCGAGGCTGTGCT
 GAGAGGACAGGCCCTGCTCGTGAACCTCTCCAGCCTTGCGGAACCCCTGCAGCTGCACGTG
 GACAAGGCTGTGTCCGGCCTGAGAAACCTGACCACCCTGCTGAGAGCACTGGGAGCCCAGA
 AAGAGGCCATCTCTCCACCTGACGCCGCCTCTGCTGCTCCTCTGAGAACCATCACCGCCGA
 CACCTTCAGAAAGCTGTTCCGGGTGTACTCCAACCTTCCTGCGGGGCAAGCTGAAGCTGTAC
 ACCGGCGAGGCTTGCCGGACCGGCGACAGA

SECUENCIA DE AA DE LA MUTEÍNA 104 (SEQ ID N°18)

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPR LICDSRV LERYLLEAKEAENITTGCAEHCS
 LNENITVPDTKVN FYAWKRMEVGQQA VE VWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHV
 DKAVSGLRNLTTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLY
 TGEACRTGDR

MUTEÍNA 106-108 (Thr106 →Asn106) +(Leu108→Thr108)

Los *primers* utilizados fueron:

Mut106_108F: AGATCCCTGAACACCACGCTGAGAGCA

MUT106_108R: TGCTCTCAGCGTGGTGTTCAGGGATCT

SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DE LA MUTEÍNA 106-108 (SEQ ID N°19)

ATGGGCGTGCACGAATGTCCTGCTTGGCTGTGGCTGCTGCTGTCCCTGCTGTCTCTGCCTC
 TGGGACTGCCTGTGCTGGGCGCTCCTCCTAGACTGATCTGCGACTCCCGGGTGCTGGAAAG
 ATACCTGCTGGAAGCCAAAGAGGCCGAGAACATCACCAACCGGCTGCGCCGAGCACTGCTCC
 CTGAACGAGAATATCACCGTGCCCGACACCAAAGTGAAC TTCTACGCCTGGAAGCGGATGG
 AAGTGGGCCAGCAGGCTGTGGAAGTGTGGCAGGGACTGGCTCTGCTGAGCGAGGCTGTGCT
 GAGAGGACAGGCCCTGCTCGTGAACCTCTCCAGCCTTGCGGAACCCCTGCAGCTGCACGTG
 GACAAGGCTGTGTCCGGCCTGAGATCCCTGAACACCACGCTGAGAGCACTGGGAGCCCAGA
 AAGAGGCCATCTCTCCACCTGACGCCGCCTCTGCTGCTCCTCTGAGAACCATCACCGCCGA
 CACCTTCAGAAAGCTGTTCCGGGTGTACTCCAACCTTCCTGCGGGGCAAGCTGAAGCTGTAC
 ACCGGCGAGGCTTGCCGGACCGGCGACAGA

SECUENCIA DE AA DE LA MUTEÍNA 106-108 (SEQ ID N°20)

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRILICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCS
 LNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAWEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHV
 DKAVSGLRSLNTTLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLY
 TGEACRTGDR

MUTEÍNA 149 (Leu149→Thr149)

Los *primers* utilizados fueron:

Mut149F: TACTCCAACCTTCACGCGGGGCAAGCTG

MUT149R: CAGCTTGCCCCGCGTGAAGTTGGAGTA

SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DE LA MUTEÍNA 149 (SEQ ID N°21)

ATGGGCGTGACGAATGTCCTGCTTGGCTGTGGCTGCTGCTGTCCCTGCTGTCTCTGCCTC
 TGGGACTGCCTGTGCTGGGCGCTCCTCCTAGACTGATCTGCGACTCCCGGGTGCTGGAAAG
 ATACCTGCTGGAAGCCAAAGAGGCCGAGAACATCACCACCGGCTGCGCCGAGCACTGCTCC
 CTGAACGAGAATATCACCGTGCCCGACACCAAAGTGAACCTTCTACGCCTGGAAGCGGATGG
 AAGTGGGCCAGCAGGCTGTGGAAGTGTGGCAGGGACTGGCTCTGCTGAGCGAGGCTGTGCT
 GAGAGGACAGGCCCTGCTCGTGAACCTCCTCCCAGCCTTGGAACCCCTGCAGCTGCACGTG
 GACAAGGCTGTGTCCGGCCTGAGATCCCTGACCACCCTGCTGAGAGCACTGGGAGCCCAGA
 AAGAGGCCATCTCTCCACCTGACGCCGCCTCTGCTGCTCCTCTGAGAACCATCACCGCCGA
 CACCTTCAGAAAGCTGTTCCGGGTGTACTCCAACCTTACGCGGGGCAAGCTGAAGCTGTAC
 ACCGGCGAGGCTTGCCGGACCGGCGACAGA

SECUENCIA DE AA DE LA MUTEÍNA 149 (SEQ ID N°22)

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRILICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCS
 LNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAWEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHV
 DKAVSGLRSLTTLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFTRGKCLKLY
 TGEACRTGDR

MUTEÍNA 151-153 (Gly151 →Asn151) + (Leu153→Thr153)

Los *primers* utilizados fueron:

Mut151_153F: AACTTCCTGCGGAACAAGACGAAGCTGTAC

MUT151_153R: GTACAGCTTCGTCTTGTCCGCAGGAAGTT

SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DE LA MUTEÍNA 151-153 (SEQ ID N°23)

ATGGGCGTGCACGAATGTCCTGCTTGGCTGTGGCTGCTGCTGTCCCTGCTGTCTCTGCCTC
 TGGGACTGCCTGTGCTGGGCGCTCCTCCTAGACTGATCTGCGACTCCCGGGTGCTGGAAAG
 ATACCTGCTGGAAGCCAAAGAGGCCGAGAACATCACCACCGGCTGCGCCGAGCACTGCTCC
 CTGAACGAGAATATCACCGTGCCCGACACCAAAGTGAACCTTCTACGCCTGGAAGCGGATGG
 AAGTGGGCCAGCAGGCTGTGGAAGTGTGGCAGGGACTGGCTCTGCTGAGCGAGGCTGTGCT
 GAGAGGACAGGCCCTGCTCGTGAACCTCCTCCAGCCTTGGGAACCCCTGCAGCTGCACGTG
 GACAAGGCTGTGTCCGGCCTGAGATCCCTGACCACCCTGCTGAGAGCACTGGGAGCCCAGA
 AAGAGGCCATCTCTCCACCTGACGCCGCCTCTGCTGCTCCTCTGAGAACCATCACCGCCGA
 CACCTTCAGAAAGCTGTTCCGGGTGTACTCCAACCTTCTGCGGAACAAGACGAAGCTGTAC
 ACCGGCGAGGCTTGCCGGACCGGCGACAGA

SECUENCIA DE AA DE LA MUTEÍNA 151-153 (SEQ ID N°24)

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCS
 LNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHV
 DKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRNKTKLY
 TGEACRTGDR

SECUENCIA DE EPO HUMANA**SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DE LA EPO HUMANA (SEQ ID N°25)**

ATGGGCGTGCACGAATGTCCTGCTTGGCTGTGGCTGCTGCTGTCCCTGCTGTCTCTGCCTC
 TGGGACTGCCTGTGCTGGGCGCTCCTCCTAGACTGATCTGCGACTCCCGGGTGCTGGAAAG
 ATACCTGCTGGAAGCCAAAGAGGCCGAGAACATCACCACCGGCTGCGCCGAGCACTGCTCC
 CTGAACGAGAATATCACCGTGCCCGACACCAAAGTGAACCTTCTACGCCTGGAAGCGGATGG
 AAGTGGGCCAGCAGGCTGTGGAAGTGTGGCAGGGACTGGCTCTGCTGAGCGAGGCTGTGCT
 GAGAGGACAGGCCCTGCTCGTGAACCTCCTCCAGCCTTGGGAACCCCTGCAGCTGCACGTG
 GACAAGGCTGTGTCCGGCCTGAGATCCCTGACCACCCTGCTGAGAGCACTGGGAGCCCAGA
 AAGAGGCCATCTCTCCACCTGACGCCGCCTCTGCTGCTCCTCTGAGAACCATCACCGCCGA
 CACCTTCAGAAAGCTGTTCCGGGTGTACTCCAACCTTCTGCGGGGCAAGCTGAAGCTGTAC
 ACCGGCGAGGCTTGCCGGACCGGCGACAGA

SECUENCIA DE AA DE LA EPO HUMANA (SEQ ID N°26)

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRILICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCS
 LNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHV
 DKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLY
 TGEACRTGDR

Los mismos se muestran en la Figura 2a. Estos fragmentos fueron usados como templado para realizar una segunda PCR, esta vez utilizando sólo los oligonucleótidos que se unen a los extremos de hEP0, para obtener la secuencia de las 12 mutantes (Figura 2b). Luego de las reacciones de PCR, los productos correspondientes a las 12 muteínas de hEP0, fueron digeridos con las enzimas de restricción XbaI/SalI -que flanquean la molécula de hEP0- para ser clonados en el vector pLV-PLK, digerido con las mismas enzimas de restricción. Bacterias TOP TEN fueron transformadas y seleccionadas mediante ampicilina. Se amplificaron 3-4 colonias de cada muteína de hEP0 en medio líquido para realizar minipreparaciones de ADN plasmídico. Se procedió a confirmar la presencia del inserto mediante digestión con enzimas de restricción de los sitios presentes en la secuencia de hEP0 y ausentes en la secuencia del vector. Finalmente, minipreparaciones de ADN plasmídico fueron secuenciadas para confirmar la inserción de las mutaciones llevadas a cabo sobre la molécula de hEP0.

2. Análisis *in silico* de la potencial antigenicidad que presentan las muteínas de hEP0 desarrolladas

Se empleó la base de datos IEDB (*Immune Epitope Database and Analysis Resources*) para comparar *in silico* la potencial antigenicidad de las muteínas de hEP0 con respecto a la molécula sin modificar. Para todas ellas, se realizó una predicción de epitopes T reconocidos en el contexto del

Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo II (MHC II), analizando los 8 alelos más representativos a nivel mundial (HUMAN, HLA-DR: DRB1*01.01, DRB1*03.01, DRB1*04.01, DRB1*07.01, DRB1*08.01, DRB1*11.01, DRB1*13.01, DRB1*15.01). Para cada variante de hEP0 se obtuvo un *score* de antigenicidad que fue comparado con el obtenido para hEP0. En la Figura 3 se resume esquemáticamente el grado de antigenicidad potencial para cada una de ellas. De este modo, se observaron dos muteínas con igual grado de antigenicidad que hEP0 (Mut98_100, Mut151_153), dos potencialmente más antigénicas (Mut72_74 y Mut62_64) y, finalmente, 8 potencialmente menos antigénicas (Mut45_47, Mut49, Mut15_17, Mut65_67, Mut149, Mut76_78, Mut104 y Mut106_108), siendo estas dos últimas las de menor antigenicidad.

3. Obtención de líneas celulares productoras de las mencionadas muteínas

Se procedió al ensamblado de partículas lentivirales para posteriormente transducir células CHO.K1. Con tal motivo, se co-transfectaron células HEK 293 T/17 (células empaquetadoras) con 4 vectores para generar las partículas lentivirales correspondientes a cada una de las 12 muteínas. Los 4 vectores utilizados fueron: pREV (que induce la exportación nuclear del vector de transferencia y su empaquetamiento), pVSVG (que codifica la proteína G de envoltura del VSV, necesaria para la entrada de la partícula viral en la célula, con un amplio tropismo), pMDL (que codifica las proteínas de matriz y cápside, -capaces de empaquetar el vector de expresión-, la proteasa, la transcriptasa reversa y la integrasa, requeridas para el clivaje de los elementos estructurales y para la integración al genoma celular) y el vector de transferencia

pLV-PLK-Mut X en el cual se han eliminado todos los genes virales y sustituidos por los genes de interés correspondientes a las muteínas de hEP0 de la presente invención. Dos días posteriores a la transfección de células HEK 293T/17, se cosecharon los sobrenadantes de cada una de las células conteniendo las partículas lentivirales mut X, las cuales se utilizaron para transducir células CHO.K1. Se obtuvieron las 12 líneas CHO.K1 mut X hEP0. Luego de 72 h, se cosecharon los sobrenadantes, y se conservaron para su posterior caracterización. Asimismo, con el propósito de generar líneas celulares recombinantes estables, las mismas fueron presionadas con cantidades crecientes del antibiótico puromicina, de manera de seleccionar aquellas células que incorporaron el transgén. Las líneas celulares presionadas fueron amplificadas y criopreservadas en una mezcla criogénica 90% (v/v) SFB/ 10% (v/v) DMSO y conservadas en tanques de nitrógeno líquido.

Inicialmente, a partir del cultivo de las líneas celulares obtenidas mediante procedimiento de transducción, se procedió a la determinación de su concentración, mediante ELISA sándwich, empleando anticuerpos específicos para la molécula de hEP0. Se empleó un anticuerpo monoclonal como captura y anticuerpos policlonales de conejo para la detección (ambos tipos de anticuerpos fueron desarrollados en nuestro laboratorio). Las concentraciones obtenidas se muestran en la tabla I, consideradas adecuadas para la continuidad de los estudios.

Por otra parte, se analizaron los sobrenadantes de cultivo mediante técnica de *western blot*, empleando los anticuerpos policlonales para detectar todas las muteínas de hEP0. Dicha

metodología permitió visualizar que las muteínas presentaron mayor masa molecular que la hEPO no modificada, correspondiéndose con la inserción de nuevos sitios de N-glicosilación en la estructura molecular (Figura 4).

Asimismo, se estudió el número de glicoisofomas que presentan cada una de las muteínas de hEPO expresadas en sobrenadantes de cultivo de células CHO.K1 mediante isoelectroenfoque y posterior *western blot*. El número de isoformas obtenido en 11 de las 12 muteínas evaluadas fue superior al de la hEPO sin modificar. El rango de isoformas osciló entre 8 y 16 isoformas con relación a las 7 que se observaron en el sobrenadante de cultivo de la hEPO no modificada.

La presente invención provee muteínas de hEPO que tienen escasa o nula actividad eritropoyética para evitar los efectos secundarios producidos por la citoquina al ser empleada como posible candidato neuroprotector/neuroplástico. Por tal motivo, se estudió la mencionada actividad *in vitro*, empleando células TF-1 cuya proliferación depende de la presencia de hEPO. Para medir la actividad eritropoyética, se evaluó la proliferación de dichas células luego de 96 h de estimulación con un estándar de hEPO de actividad biológica conocida. Satisfactoriamente, todas las muteínas de hEPO desarrolladas presentaron nula o reducida actividad eritropoyética comparada con el estándar comercial de hEPO y con la molécula de hEPO sin modificar con excepción de la Mut49 que conservó la actividad eritropoyética. Los resultados se resumen en la Tabla I.

<i>Muteína</i>	<i>Concentración</i> <i>(µg/ml)</i>	<i>Nro. de</i> <i>Isoformas</i>	<i>Actividad</i> <i>eritropoyética (in vitro) (%)</i>
<i>rhEPO</i>	-	7	100
<i>Mut15_17</i>	2,7	8	AND
<i>Mut45_47</i>	12,6	12-13	0,17
<i>Mut49</i>	6,4	14	100
<i>Mut62_64</i>	17,2	10	0,17
<i>Mut65_67</i>	32,0	12	0,49
<i>Mut72_74</i>	23,3	14	0,42
<i>Mut76_78</i>	51,0	5-6	AND
<i>Mut98-100</i>	19,0	13	0,08
<i>Mut104</i>	15,9	16	AND
<i>Mut106-108</i>	16,5	12	AND
<i>Mut149</i>	24,3	10	0,07
<i>Mut151_153</i>	3,7	9	AND

AND: actividad no detectable; rhEPO: eritropoyetina humanarecombinante; Mut: muteína.

Tabla I: Caracterización de las muteínas de hEPO. Cuantificación de la concentración en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA sándwich, evaluación del número de isoformas medido por isoelectroenfoque y determinación de actividad biológica *in vitro* expresada en forma porcentual con respecto a la molécula no modificada.

La presente invención provee muteínas de hEPO conteniendo sitios susceptibles de N-glicosilación en posiciones que no anulan su actividad biológica citoprotectora pero sí anulan su actividad hematopoyética. Las mismas fueron expresadas en

sobrenadantes de cultivo de células CHO.K1 y posteriormente caracterizadas. Todas ellas mostraron un grado superior de glicosilación, cumpliendo con el objetivo de incluir un sitio adicional para N-glicosilación que permite aumentar su vida media en plasma. Asimismo, se confirmó que las modificaciones realizadas sobre la molécula tuvieron efecto sobre la actividad biológica hematopoyética, anulándola en la mayoría de las muteínas o disminuyéndola drásticamente en las restantes.

4. Purificación de las muteínas derivadas de hEPO mediante cromatografía de inmunoafinidad

A continuación, se presenta un procedimiento de purificación de las muteínas de la presente invención. Para un mejor entendimiento de este procedimiento se presenta a modo de ejemplo de aplicación las siguientes muteínas: Mut 45_47, Mut 104, Mut 151_153, mediante un esquema de purificación por inmunoafinidad (IA). Inicialmente, se simuló un proceso equivalente al que ocurre en una matriz de IA, con el objetivo de establecer la condición más favorable para eluir cada una de las muteínas hiperglicosiladas de hEPO capturadas por un anticuerpo monoclonal anti-rhEPO desarrollado a tal fin en nuestro laboratorio (Protocolo A). En virtud de lo anterior, se realizaron ensayos de ELISA sándwich para cuantificar la proporción de los derivados de hEPO que permanecieron unidos al mAb 2B2, luego que el complejo antígeno-anticuerpo fue sometido a cada condición de elución. Asimismo, se evaluó el efecto de cada solución eluyente sobre el anticuerpo, para analizar si éstas afectarían su capacidad de unión a las muteínas de hEPO en vistas de futuros procedimientos de reutilización de las matrices de IA (Protocolo B).

Se evaluó la capacidad eluyente de las siguientes soluciones:

1. Glicina 0,1 M pH 2
2. Glicina 0,15 M pH 2,5
3. Ácido acético 0,2 M, NaCl 0,15 M pH 2,5
4. Glicina 0,15 M pH 3
5. Ac. cítrico 0,1 M pH 3
6. Ácido acético 0,2 M, NaCl 0,15 M pH 3
7. Glicina 0,15 M pH 3,5
8. Acetato de sodio 0,1 M pH 4
9. Acetato de sodio 0,1 M / Dioxano 10% (v/v) pH 4
10. Acetato de sodio 0,1 M pH 5
11. Fosfato de sodio 0,1 M pH 6
12. Isopropanol 40 % (v/v) en solución salina de fosfato (PBS) pH 7
13. PBS pH 7
14. Etanol 40 % (v/v) en PBS pH 7
15. Dioxano 10 % (v/v) en PBS pH 7
16. Etilenglicol 40 % (v/v) en PBS pH 7
17. Tris/HCl 0,1M pH 8
18. Glicina 0,1M pH 9
19. Glicina 0,1M pH 10
20. Glicina 0,1 M pH 11
21. Fosfato de sodio 0,1 M pH 11
22. Fosfato de sodio 0,1 M pH 11,7

Los valores de absorbancia obtenidos para el complejo antígeno-anticuerpo tratado con PBS se consideraron como control, asumiendo un 100% de formación del complejo antígeno-anticuerpo; es decir, sin desorción de rhEPO o de sus muteínas. Para el protocolo B, los valores de absorbancia obtenidos para el anticuerpo tratado con PBS (previo a la formación del

complejo Ag-Ac), fueron considerados como control de la conservación de la capacidad de unión del anticuerpo a las moléculas en estudio. De esta manera, los resultados obtenidos para el resto de las soluciones ensayadas se expresaron en forma relativa a los controles evaluados con PBS (Figura 5). En todos los casos se observó que la condición establecida por glicina 0,1 M pH 2 tuvo la mayor capacidad de desorción del antígeno frente a las demás soluciones. Sin embargo, disminuyó considerablemente la capacidad de formación del mencionado complejo luego del tratamiento previo con la misma. Por lo tanto, no es conveniente el empleo de tal eluyente en la CIA puesto que afectaría la reutilización de la matriz cromatográfica.

Por otro lado, este ensayo permitió seleccionar dos soluciones eluyentes como candidatas a ser utilizados en la CIA: glicina 0,15 M pH 2,5 y ácido acético 0,2 M, NaCl 0,15 M pH 3. Ambas soluciones fueron capaces de disociar los complejos Ag-Ac, desorbiendo la proteína de interés (Tabla II) y, además, no afectaron la capacidad del anticuerpo para unir el antígeno luego del tratamiento previo con las mismas.

<i>Solución</i>	<i>Elución (%)</i>		
	<i>Mut</i>	<i>Mut</i>	<i>Mut</i>
	<i>45_47</i>	<i>104</i>	<i>151_153</i>
(2)	86	84	80
(6)	80	81	70

(2) Glicina 0,15 M pH 2,5

(6) Ác. Acético 0,2 M NaCl 0,15 M pH 3

Tabla II. Elución de las muteínas de hEP0 considerando las soluciones eluyentes seleccionadas.

El mAb 2B2 utilizado en las resinas de IA, fue purificado previamente por cromatografía de afinidad a proteína A y dializado contra solución de carbonato. Seguidamente, se acopló a la resina CNBr-*Activated Sepharose*4B. El grado de acoplamiento se calculó por medida de la concentración de inmunoglobulinas en la solución antes y después de la reacción de inmovilización, resultando del 96%. De este modo, la capacidad teórica resultó de 481 µg de rhEPO por ml de gel.

En la Figura 6 se muestra, a modo de ejemplo, el perfil cromatográfico correspondiente a la purificación de la muteína Mut 104, empleando la solución eluyente glicina 0,15 M pH 2,5. En cada procedimiento cromatográfico se evaluó la presencia de la variante de hEPO correspondiente en las distintas fracciones (*flowthrough*, lavados, elución) mediante ELISA sándwich, de manera de calcular los parámetros que permiten analizar la *performance* del proceso.

Los resultados obtenidos para las purificaciones se muestran en la Tabla III. En condiciones dinámicas, se observaron algunas diferencias en cuanto a la eficiencia en la recuperación de la proteína de interés respecto a las condiciones estáticas evaluadas en placas. La elución con la solución de pH 2,5 permitió obtener mejores recuperaciones para las muteínas Mut 104 y Mut 151_153 con respecto a la solución de pH 3 (54% vs 19% y 55% vs 21%, respectivamente), mientras que para la variante Mut 45_47, se obtuvo mayor recuperación eluyendo con la solución de pH 3 (49% vs 34%).

Muestr a	Solución eluyente / Fracción		rhEP0 (µg/ml)	PT (µg/m l)	AE	FP	Recuperaci ón (%)
Mut 45_47	Sol. I (pH 3)	Siembr a	18	433	0,04	1	100
		Elució n	8,9	17,7	0,5	12, 1	49
	Sol. II (pH 2,5)	Siembr a	17,3	611,8	0,03	1	100
		Elució n	5,9	5,7	1,04	37	34
Mut 104	Sol. I (pH 3)	Siembr a	23	315	0,07	1	100
		Elució n	14,4	21	0,69	10	19
	Sol. II (pH 2,5)	Siembr a	20	245	0,08	1	100
		Elució n	13,2	3,6	3,71	46	54
Mut 151_15 3	Sol. I (pH 3)	Siembr a	3,2	510,4	0,01	1	100
		Elució n	3,5	6,4	0,56	89, 1	21
	Sol. II (pH 2,5)	Siembr a	1,7	491,5	0,004	1	100
		Elució n	3,9	14	0,31	89, 7	55

Sol. I: ácido acético 0,2 M, NaCl 0,15 M pH 3,0 y Sol. II: glicina 0,15 M pH 2,5

Tabla III: Parámetros de la purificación mediante CIA de las muteínas de hEP0.

Si bien la CIA no demostró elevada recuperación de la proteína de interés, fue el método más adecuado para la purificación de las muteínas de hEPO, dado que permitió purificar las mismas entre 37 y 90 veces con respecto a la muestra de partida, con un elevado grado de pureza y en un único paso cromatográfico.

La evaluación de la pureza de los eluatos correspondientes a cada muteína de hEPO se realizó mediante densitometría de bandas (Figura 8).

Previamente a la corrida electroforética, las muestras fueron concentradas entre 75 y 80 veces, empleando cartuchos de diafiltración de 10 kDa de límite de corte. La pureza obtenida fue superior al 89% para todas las muteínas (Tabla IV) constituyendo valores característicos para un procedimiento de purificación por IA.

	Muteínas		
	Mut	Mut	Mut
	45_47	104	151_153
Pureza (%)	92	96	89

Tabla IV. Grado de pureza de los eluatos obtenidos a partir de cada CIA

Mediante la CIA se obtuvo un elevado grado de pureza de las muteínas de hEP0, lo cual se consideró adecuado para utilizar las mismas en los siguientes ensayos. De este modo, se estableció a la CIA como método apropiado, sencillo y práctico para la purificación de las muteínas de hEP0 de la presente invención.

5. Caracterización fisicoquímica de las muteínas de hEP0

5.1. Determinación de las masas moleculares aparentes de las distintas muteínas de hEP0.

La Figura 9, corresponde a un *western blot* de las muteínas purificadas mediante CIA. El mismo se utilizó para calcular las masas moleculares de tales muteínas empleando marcadores de masa molecular conocida.

La determinación de las masas moleculares aparentes de las muteínas hiperglicosiladas de hEP0 se llevó a cabo interpolando las distancias de migración del frente anterior y posterior de la banda correspondiente a cada variante en la curva de variación de la distancia migrada por cada marcador en función del log de su masa molecular. A continuación, se resumen las masas moleculares aparentes calculadas para cada variante:

*Mut 45_47:	34-66 kDa
*Mut 104:	29-66 kDa
*Mut 151_153:	35-45 kDa
*rhEP0:	31-43 kDa

Esta determinación confirmó el éxito de la incorporación de un sitio adicional de N-glicosilación a la molécula de hEPO, debido a que en promedio las muteínas exhibieron masas moleculares superiores a la correspondiente a hEPO sin modificar.

5.2. Determinación del perfil de isoformas mediante IEF

Con el fin de evaluar el grado de heterogeneidad de las muteínas de hEPO debido a la glicosilación y en particular, al contenido de residuos de ácido siálico, las muestras fueron evaluadas mediante IEF determinando las isoformas de diferente pI que componen cada variante hiperglicosilada de hEPO.

En la Figura 10 se visualiza la detección de 13 isoformas que componen la variante Mut 45_47, 14 isoformas para la variante Mut 104 y 6 isoformas para la rhEPO estándar. Cabe mencionar que el estándar de rhEPO es la hormona producida como bioterapéutico destinado a favorecer la eritropoyesis, en el cual predominan las isoformas más ácidas de la molécula de hEPO y que son obtenidas luego de un proceso de purificación desarrollado en 4 pasos cromatográficos. Asimismo, se puede visualizar que las muteínas Mut 45_47 y Mut 104, contienen entre 5 y 7 isoformas más ácidas que las isoformas de rhEPO, lo que refleja un mayor contenido de ácido siálico en esas moléculas.

Los datos obtenidos en la determinación de las masas moleculares aparentes conjuntamente con los del IEF confirman que las muteínas generadas presentan un grado superior de glicosilación respecto de la rhEPO,

5.3. Análisis del perfil de isoformas mediante electroforesis capilar de zona (ECZ) de las muteínas de hEP0 purificadas por CIA

La determinación de las isoformas de cada variante de hEP0 que se toma a modo de ejemplo de aplicación, se determinó, además, mediante ECZ. Se procesaron las muestras obtenidas a partir de las purificaciones por CIA de las muteínas de hEP0 diafiltradas con agua y concentradas hasta 1 mg/ml, aproximadamente.

La ECZ proporciona información cuantitativa sobre las diferentes isoformas observadas. De esta manera, utilizando los datos de la ECZ se asignó una isoforma a cada pico observado para cada variante de hEP0. Para las muteínas Mut 45_47 y Mut 104 desde 1 a 11, y para el estándar de rhEP0 desde 1 a 7, siendo la isoforma 1 la que más migró a lo largo del capilar (Figura 11). Seguidamente, se calcularon los porcentajes correspondientes a cada isoforma mediante la integración del área bajo la curva de cada pico.

Al comparar las movilidades electroforéticas de las isoformas de cada variante con respecto a la rhEP0, se pudo comprobar que las isoformas de esta última coinciden con las isoformas 1 a 7 de la Mut 45_47 y con las isoformas 3 a 9 de la Mut 104, lo que refleja que la Mut 45_47 presenta 4 isoformas más ácidas con respecto a la rhEP0, mientras que la Mut 104, presenta 2 isoformas menos ácidas y 2 isoformas más ácidas respecto de rhEP0.

Al evaluar las proporciones de cada isoforma, se evidenció que la rhEP0 presenta mayor proporción de las isoformas 3, 4 y 5, mientras que la Mut 45_47 muestra mayor proporción de las

isoformas 6, 7, 8 y 9, y la Mut 104, mayor proporción de isoformas 4, 5, 6 y 7. De esta manera se confirma, una vez más, la heterogeneidad de cada variante de hEPO con respecto al grado de glicosilación de rhEPO debido al mayor contenido de isoformas más ácidas y mayor proporción de ellas.

Al observar el electroferograma correspondiente a cada variante de hEPO, se puede visualizar la presencia de dos picos adicionales (dos isoformas más), en ambos casos, uno delante del pico 1 y otro posterior al pico 11, que no pudieron ser resueltos con precisión. Esto se debe a la baja proporción de tales isoformas en la muestra, siendo inferior al límite de detección del sistema, lo cual explica la diferencia en el número de isoformas detectadas por los métodos de IEF y ECZ.

5.4.a Caracterización de la actividad biológica eritropoyética in vitro de las muteínas

Se efectuó la caracterización biológica de las muteínas de hEPO desarrolladas y purificadas. Para ello, se realizaron ensayos de proliferación *in vitro* utilizando cultivos celulares de la línea UT-7 para evaluar la actividad biológica eritropoyética de las muteínas que se han tomado como ejemplos de aplicación para ilustrar la realización de la presente invención (A-F), dado que la supervivencia y proliferación de estos linajes celulares depende de la existencia de hEPO en el medio de crecimiento. A diferencia del ensayo que emplea la línea celular TF-1, el ensayo que emplea la línea celular UT-7 se caracteriza por una respuesta de mayor sensibilidad, por lo que fue seleccionada para esta etapa del trabajo.

Se analizaron los sobrenadantes de cultivo de todas las muteínas expresadas en sobrenadante de cultivo de sus respectivas líneas productoras y de las tres muteínas tomadas como ejemplo, que fueran además, purificadas por CIA. La proliferación desarrollada por cada una de estas moléculas fue comparada con la proliferación desarrollada por un estándar de rhEPO de concentración y actividad biológica conocida.

Las muteínas de hEPO que se han tomado como ejemplos de aplicación, con excepción de la Mut 49, exhibieron baja o nula capacidad para estimular la proliferación celular al ser ensayadas en las mismas concentraciones que el estándar de rhEPO (Figura 12 -a-). Con el objeto de calcular una actividad eritropoyética específica (AEE) evaluada *in vitro*, se trabajó con concentraciones superiores de las muteínas, es decir aquéllas presentes en sobrenadantes de cultivo puros. De este modo las Mut 104 y Mut 151_153 demostraron pérdida completa de la actividad biológica eritropoyética mientras que las Mut 45_47, Mut 62_64 y Mut 98_100 retuvieron muy baja actividad eritropoyética (AEE_{mut 45_47} = 0,2 UI/ μ g, AEE_{mut 62_64} = 0,2 UI/ μ g y AEE_{mut 98_100} = 0,1 UI/ μ g en comparación con una AEE = 120 UI/ μ g para rhEPO). Contrariamente, se consideró que la Mut 49 preservó tal actividad (AEE = 216 UI/ μ g). Si bien se observó un incremento en la AEE de la Mut 49, el mismo puede deberse a la zona de la curva que se empleó para determinar tal parámetro ya que la pendiente de la zona de respuesta lineal de la curva de la Mut 49 difirió notablemente con la correspondiente al estándar. De este modo, la modificación realizada para la obtención de tal muteína fue considerada no eficiente para inhibir su actividad eritropoyética.

Asimismo, se analizó la actividad biológica cito/neuroprotectora *in vitro* de las muteínas de rhEPO purificadas a modo de ejemplo de aplicación de la presente invención. Para estudiar la actividad cito/neuroprotectora, se evaluó la capacidad de rhEPO y de sus muteínas, para proteger a las células neuronales SH-SY5Y del efecto apoptótico/citotóxico generado por la estaurosporina (STP). De esta manera, el ensayo de cito/neuroprotección consistió en proteger a las células neuronales mediante el agregado de rhEPO o de sus muteínas 12 horas previas a la inducción del daño celular causado por STP. Transcurrido el tiempo de inducción del daño celular, se evaluó la viabilidad de los cultivos determinando las células metabólicamente activas.

En este ensayo, tanto la rhEPO como la Mut 104 purificada que se presenta como ejemplo de aplicación de la invención, fueron utilizadas en las mismas concentraciones (Fig.13).

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente empleando test ANOVA, seguido del test de Dunnet, de manera de comparar cada una de las muestras con respecto al CSTP. El porcentaje de citotoxicidad obtenido para el CSTP fue considerado el 100% de citotoxicidad, y en consecuencia, los valores de citotoxicidad determinados para cada una de las muestras se calcularon en relación al CSTP.

Como se visualiza en la Fig. 13, la rhEPO fue capaz de reducir la citotoxicidad inducida por STP en un 45% ($p < 0,05$), mientras que la Mut 104, mostró una importante disminución de la citotoxicidad, causada por STP, reduciéndola en un 65% con un grado de significación del 99% ($p < 0,01$).

5.4.b Caracterización de la actividad biológica eritropoyética *in vivo* de las muteínas.

Las muteínas utilizadas como ejemplo de aplicación poseen nula o escasa actividad biológica *in vitro*. A su vez, la extensa glicosilación le confiere propiedades farmacocinéticas necesarias para incrementar el tiempo que permanece en sangre. Estas características les permitirían a las moléculas multiplicar la escasa capacidad de interacción con el receptor y demostrar actividad eritropoyética.

Para evaluar tal actividad *in vivo* se procedió a inyectar ratones normocitémicos con rhEPO como estándar o con cada una de las tres muteínas utilizadas en los ejemplos anteriores o con PBS como control negativo. En todos los casos correspondientes a la inoculación de proteínas se utilizó una masa proteica equivalente a 80 UI de rhEPO. Se extrajo sangre 96 h posteriores a la inoculación y se procedió a determinar mediante citometría de flujo el contenido porcentual de reticulocitos marcados con naranja de tiazol.

En la figura 12-b- se visualiza una respuesta significativamente diferente ($p < 0,001$) de cada muteína y el control negativo con respecto a rhEPO. Asimismo, no se observaron diferencias significativas al comparar la respuesta de reticulocitos generados por cada muteína con respecto al control negativo. Ambos tipos de análisis confirman la esperada pérdida de actividad eritropoyética de las muteínas como consecuencia de la modificación realizada a las mismas mediante N-glicoingeniería por hiperglicosilación.

5.5. Participación de mteínas hiperglicosiladas de hEPO en la plasticidad neuronal estructural

5.5.1. Desarrollo (diferenciación) neuronal y plasticidad estructural

La plasticidad neuronal estructural engloba aquellos procesos por los cuales el desarrollo y/o diferenciación neuronal se encuentran estimulados o favorecidos. En este sentido, agentes o compuestos químicos que promuevan la formación de neuritas y/o el crecimiento axonal, el desarrollo de filopodios/espinas dendríticas y/o incrementen el número de sinapsis serán considerados como compuestos neurotróficos. Los cultivos primarios de neuronas y las líneas de células neuronales han sido ampliamente utilizados para el estudio de dichos procesos *in vitro*.

Las etapas del desarrollo neuronal en cultivos primarios de neuronas de hipocampo se encuentran esquematizadas en la Figura 14. Estas etapas han sido bien caracterizadas en el trabajo de Dotti y colaboradores (1998) [31] donde se describe que las neuronas luego de ser sembradas desarrollan lamelas con las que se adhieren al sustrato (0 DIV, *días de cultivo in vitro*). Luego, durante los primeros dos días (1-2 DIV) se desarrollan extensiones conocidas como neuritas inmaduras como prolongaciones de la membrana plasmática. A los 2-3 DIV una de estas neuritas se estira más allá del resto y se diferencia para formar el axón, que posee en su extremo final una estructura triangular conocida como cono de crecimiento axonal. Luego las neuritas se bifurcan formando las neuritas secundarias (3-4 DIV). Sobre estas neuritas se desarrollan proyecciones citoplasmáticas delgadas que contienen filamentos

de actina entrecruzados conocidas como filopodios (4-5 DIV). Los filopodios pueden luego dar lugar a las espinas dendríticas que son los sitios preferenciales donde ocurren las sinapsis (7-21 DIV).

En esta parte del estudio se evaluó la acción neurotrófica de distintas muteínas hiperglicosiladas de hEP0 de la invención en las distintas etapas del desarrollo neuronal.

5.5.2. Formación de Neuritas

Para determinar si las muteínas de la presente invención producían un efecto neuritogénico (aumento del número y largo de neuritas por neurona) se utilizó la línea neuronal N2a (neuroblastoma de ratón). Las células (50.000) fueron sembradas sobre vidrios en placas de cultivo que poseen 24 pocillos y mantenidas en medio completo DMEM, suplementado con 20% (V/V) de suero fetal bovino (SFB) que inhibe la diferenciación neuronal y gentamicina como antibiótico. Luego el medio de cultivo se reemplazó por uno carente de SFB complementado con distintas concentraciones (50 y 300 ng/ml) de rhEP0, o las muteínas durante 3 h para inducir la neuritogénesis, [32]. Pasado el tiempo, las células fueron fijadas con 4% paraformaldehído (PFA) al 4% de sacarosa en buffer fosfato salino (PBS) a 4°C por 10 minutos y permeabilizadas con 0,1% (V/V) Tritón X-100 en PBS por 2 minutos. Las células fijadas fueron luego bloqueadas con 3% (P/V) de seroalbúmina bovina (BSA) en PBS durante 1-2 h con anticuerpo monoclonal IgG de ratón anti alfa-tubulina en 1% (P/V) BSA (1:1000, Sigma) para marcar neuritas durante 16 horas a 4°C. Al día siguiente, luego de 3 lavados con PBS se incubó con faloidina conjugada con rodamina para marcar filamentos de actina (1:1000,

Invitrogen) y con anticuerpos de cabra anti-ratón conjugado a Alexa 488 (1:1000, Invitrogen) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de tres lavados con PBS frío por 5 min los vidrios fueron montados con *Fluorsave* (Calbiochem).

Para cuantificar la neuritogénesis las imágenes fueron adquiridas con un microscopio Nikon TE2000 equipado con iluminación epifluorescente (Nikon). La cuantificación se realizó contando el número de neuritas y el promedio del largo de las mismas (extensión de neuritas) y la longitud de la neurita más larga (crecimiento axonal) en al menos 30 neuronas por condición utilizando el plugin NeuroJ del programa Image J (NIH). Las imágenes representativas fueron luego procesadas con el programa Adobe Photoshop y el análisis estadístico utilizando el Software GraphPadPrism 5.

La Figura 15-a- muestra imágenes representativas de cada uno de los grupos estudiados. Sobre la derecha se detalla el análisis estadístico de cada una de las mediciones. Las muteínas de la presente invención presentan un efecto neurogénico significativo dosis-dependiente que se manifiesta por un aumento del número de neuritas por neurona, la extensión de neuritas y el crecimiento axonal. Dichos efectos son comparables, valores similares, a los obtenidos para la rhEPO. En otras palabras, las muteínas de la presente invención mostraron un efecto neurotrófico similar a lo observado para rhEPO en la línea celular N2a.

5.5.3. Densidad de filopodios

Los filopodios y las espinas dendríticas son protrusiones de membrana enriquecidas en filamentos de actina las cuales

emergen desde la neurita/dendrita y actúan como compartimentos post-sinápticos que son muy abundantes en las sinapsis excitatorias del sistema nervioso central. La morfología de las espinas es variable y se clasifican en base a su estructura diferencial. Se acepta que las espinas dendríticas pueden cambiar su forma/estructura durante el desarrollo neuronal favoreciendo la plasticidad neuronal [33]. En este sentido, ciertas enfermedades neurodegenerativas han sido relacionadas con cambios en la forma y el número de las espinas dendríticas (tanto aumento como disminución). En el síndrome de Down, por ejemplo, se determinó que la cantidad de espinas se encuentra severamente disminuida [34]. Contrariamente, en síndromes del espectro autista se observó un aumento de las mismas [35].

Por ello se determinó la capacidad de inducir la plasticidad neuronal promoviendo la formación de filopodios de las muteínas muteínas hiperglicosiladas de la presente invención. Se utilizaron cultivos primarios de neuronas de hipocampo expuestos a distintas concentraciones (50 y 300 ng/ml) de rhEPO, o de las muteínas Mut 104, Mut45-47 y Mut 151-153 durante 4 días (4DIV).

Los cultivos neuronales fueron preparados a partir de hipocampos de embriones de rata (E19) como se ha descrito previamente [36]. Brevemente, el tejido fue tratado con de tripsina-EDTA (0,25% (P/V)) a 37°C durante 15 minutos. Una solución de células completamente disgregadas fue preparada en medio Neurobasal (NB, Invitrogen) suplementado con 2 mM de glutamina, 100 unidades/ml de penicilina (PEN), 100 µg/ml de estreptomicina (Strp) y 10% (V/V) de suero de caballo. Entre 20.000-30.000 células fueron sembradas en vidrios en placas de cultivo de 24 pocillos previamente tratados con 0,1 mg/ml de

poli-L-lisina bromhidrato (Sigma) y 20 mg/ml de laminina (Invitrogen). Luego de 2 h el medio fue cambiado a medio definido (NB con 1 g/l ovoalbúmina; N2 y B27 que son suplementos libres de suero de Invitrogen) y adicionado con distintas concentraciones (50 y 300 ng/ml) de rhEPO, o muteínas de la presente invención mantenidas durante 4DIV. Las células fueron fijadas con 4% PFA 4% de sacarosa en PBS a 4°C por 10 minutos. Luego las células fueron permeabilizadas con 0,1% (V/V) Tritón X-100 en PBS por 2 minutos. Las células fijadas fueron luego bloqueadas con 3% (P/V) de seroalbúmina bovina (BSA) en PBS durante 1-2 h con anticuerpo monoclonal IgG de ratón anti alfa-tubulina en 1% (P/V) BSA (1:1000, Sigma) para marcar neuritas durante 16 horas a 4°C. Al día siguiente, luego de 3 lavados con PBS se incubó con faloidina conjugada con rodamina para marcar filamentos de actina (1:1000, Invitrogen) y con el anticuerpo secundario anti-ratón hecho en cabra conjugado a Alexa 488 (1:1000, Invitrogen) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de tres lavados en PBS frío por 5 min los vidrios fueron montados con Fluorsave (Calbiochem).

Para cuantificar la formación de filopodios las imágenes fueron adquiridas con un microscopio Nikon E600 equipado con iluminación epifluorescente (Nikon). La cuantificación se realizó contando la cantidad de filopodios (protusiones ricas en actina que sobresalen de la membrana de la neurita) presentes en 20 μ m de neurita a una distancia menor a 50 μ m del soma neuronal (3 neuritas/neurona en al menos 30 neuronas). Las imágenes representativas fueron luego procesadas con el programa Adobe Photoshop y el análisis estadístico utilizando el Software GraphPadPrism 5.

La figura 16 (panel de la izquierda) muestra imágenes representativas de la densidad de filopodios mientras que el panel de la derecha detalla el análisis estadístico para cada uno de los grupos. Se observa que las muteínas de la presente invención inducen significativamente, dosis dependiente, la formación de filopodios al compararlas con las neuronas controles (PBS). Sorprendentemente, dichos efectos son aún superiores a los observados para las neuronas tratadas con rhEPO. En resumen, las muteínas de la presente invención mostraron un efecto neurotrófico en cultivos primarios de neuronas de hipocampo superior a lo observado para rhEPO.

5.5.3. Sinapsis

Las sinapsis se definen como relaciones de contigüidad especializada (unión) de membranas entre dos neuronas. Esta unión (conocida como hendidura sináptica) facilita la conducción del impulso eléctrico y el pasaje de sustancias entre una (pre-sináptica) y otra (post-sináptica). Se han desarrollado distintas técnicas para cuantificar el número de sinapsis. De esta manera se acepta que la co-ocurrencia de acúmulos de proteínas provenientes exclusivamente de un compartimento pre-sináptico con acúmulos de proteínas provenientes exclusivamente de un compartimento post-sináptico se define como sinapsis.

Siguiendo con el estudio del efecto neurotrófico de las muteínas de la presente invención se propuso evaluar la capacidad de las mismas en inducir sinapsis neuronal.

Para ello se utilizó un ensayo de inmunodetección en cultivo primario de neuronas de 15 DIV en el cual se detecta la

formación de sinapsis por la superposición de un marcador pre- y un marcador post-sináptico.

Brevemente, las neuronas (15.000/pocillo) fueron tratadas con distintas concentraciones (50 y 300 ng/ml) de muteínas de hEPO o con rhEPO o con PBS durante 15 DIV. Luego fueron fijadas con una solución 90% (V/V) metanol y 10% (V/V) MES (100 mM MES pH 6,9, 1 mM EGTA, 1mM MgCl₂) a 4°C durante 10 min. Luego fueron lavadas 3 veces con PBS filtrado con Tween 20 (0,1% (V/V)) por 5 min. Para bloquear se utilizó primero una solución de SFB con Tritón X-100 (SFB 10% (V/V), Tritón X-100 0,1% (V/V) en PBS) durante 1 h a temperatura ambiente y luego se incubaron con una solución de BSA 3% (P/V) también en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Ambas soluciones de bloqueo fueron previamente centrifugadas por 10 min a velocidad máxima. Luego fueron incubadas 12-16 h a 4°C con el anticuerpo primario anti NMDA-R1 hecho en ratón (marcador post-sináptico de Synaptic Systems) y el anticuerpo anti-sinaptofisina hecho en conejo (marcador pre-sináptico de Synaptic Systems). Ambos anticuerpos fueron preparados en una solución PBS-BSA 1% (P/V) y centrifugados durante 10 min a velocidad máxima. Luego de lavar 3 veces con PBS se bloquearon nuevamente con BSA 3% (P/V) centrifugada por 10 min y con la solución SFB 10% (V/V), Tritón X-100 0,1% (V/V)-PBS por 1 h a temperatura ambiente. Luego fueron incubados con los anticuerpos secundarios anti-ratón conjugado a Alexa 647 y anti-conejo conjugado a Alexa 568 preparados en BSA 1% (P/V) y centrifugados 10 min a velocidad máxima (ambos de Molecular Probes). Luego fueron montados con Fluorsave.

Las fotos fueron adquiridas con un microscopio confocal Olympus FV1000 asociado a un microscopio invertido Olympus

IX81. Las imágenes fueron adquiridas en modo secuencial con el programa FluoView (versión 3.3, Olympus) con un objetivo 60X de AN 1,42 y una resolución de 0,066 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ cumpliendo el criterio de Nyquist.

La formación de sinapsis se midió como puntos de colocación en 25 μm de dendrita entre el marcador pre-sináptico y el marcador post-sináptico en aproximadamente 10 a 20 neuronas por condición utilizándose 3 segmentos por neurona. Estos puntos de colocación fueron determinados utilizando el Puncta analyzer un plugin del Image J (versión 1.28u) [37].

La figura 17 muestra una foto representativa para cada una de las condiciones ensayadas y su correspondiente cuantificación. Al igual que en el caso de la neuritogénesis y la inducción de filopodios observamos que las muteínas inducen significativamente la formación de nuevas sinapsis en cultivo de neuronas. Este efecto es similar a lo observado para rhEPO.

Por todo lo observado anteriormente, existen evidencias experimentales contundentes que dan cuenta que las nuevas muteínas hiperglicosiladas de hEPO de la presente invención tienen un efecto facilitador de la plasticidad neuronal en las distintas etapas del desarrollo/diferenciación neuronal (desde la formación de las neuritas hasta la formación de sinapsis). Más aún, dichos efectos son comparables a los observados para EPO siendo en algunos casos en particular (formación de filopodios) incluso mayores. Estos efectos técnicos sorprendentes y novedosos y las características técnicas innovadoras de la presente invención hacen que las muteínas de la presente invención sean compuestos ideales para ser usados en tratamientos donde la plasticidad neuronal se encuentra

disminuida o se tenga una predisposición genética a tal disminución.

5.6.b. Estudio de la actividad biológica neuroprotectora de las muteínas de rhEPO en cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata.

La evaluación del efecto antiapoptótico de las muteínas de hEPO sobre cultivos primario de neuronas de hipocampo permite estudiar el efecto que dichos compuestos tienen a nivel de células cuyo metabolismo no se encuentra alterado como ocurre en las líneas celulares establecidas. Por tal motivo, constituye un modelo interesante ya que se aproxima de una forma más real a lo que ocurriría *in vivo* en el cerebro.

La actividad neuroprotectora de hEPO y de las eritropoyetinas modificadas de la presente invención fue evaluada como la capacidad que presentan dichas moléculas para proteger células neuronales del estímulo apoptótico inducido mediante el tratamiento con estaurosporina.

Para evaluar tal actividad *in vitro* se procedió a la obtención de cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratas Sprague-Dawley. Cultivos de 11 DIV fueron pretratados durante 24 h con 400 ng/ml de muteínas de hEPO de la presente invención o con 400 ng/ml de la rhEPO habitualmente empleada para el tratamiento destinado a la recuperación de la hematopoyesis. Transcurrido dicho tiempo, las células fueron expuestas a 30 nM de STP durante 24 h en presencia de las moléculas y, finalmente, fueron fijadas y coloreadas con el fluorocromo Hoescht y con Phalloidin-FITC.

En la figura 18 se observa que el tratamiento con las diferentes moléculas redujo significativamente (**p<0,01; ***p<0,001) la apoptosis con respecto al control de muerte celular (células sólo tratadas con STP), alcanzando valores de apoptosis similares al control celular en ausencia de STP. Asimismo, la mayoría de las moléculas de la presente invención mostraron un efecto superior al de rhEPO para proteger los cultivos primarios de neuronas de hipocampo del efecto de la STP.

Los resultados aquí obtenidos se corresponden con los alcanzados en el estudio de la actividad neuroprotectora de las muteínas sobre cultivos neuronales SH-SY5Y. De esta manera, la incorporación de un sitio adicional de glicosilación para obtener las moléculas de la presente invención, permitió bloquear su actividad biológica hematopoyética sin modificar la relacionada con la neuroprotección.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] J.W. Fisher. Exp Biol Med (Maywood) 228 (2003) 1-14.
- [2] C. Lacombe, P. Mayeux. Nephrol Dial Transplant 14 Suppl 2 (1999) 22-28.
- [3] U. Hammerling, R. Kroon, T. Wilhelmsen, L. Sjodin, J. Pharm Biomed Anal 14 (1996) 1455-1469.
- [4] H. Sasaki, B. Bothner, A. Dell, M. Fukuda. J Biol Chem 262 (1987) 12059-12076.
- [5] E. Tsuda, M. Goto, A. Murakami, K. Akai, M. Ueda, G. Kawanishi, N. Takahashi, R. Sasaki, H. Chiba, H. Ishihara, et al. Biochemistry 27 (1988) 5646-5654.
- [6] J.C. Egrie, J.K. Browne. Br J Cancer 84 Suppl 1 (2001) 3-10.

- [7] A.J. Sytkowski, L. Feldman, D.J. Zurbuch, *Biochem Biophys Res Commun* 176 (1991) 698-704.
- [8] E. Delorme, T. Lorenzini, J. Giffin, F. Martin, F. Jacobsen, T. Boone, S. Elliott. *Biochemistry* 31 (1992) 9871-9876.
- [9] T. Toyoda, T. Arakawa, H. Yamaguchi. *J Biochem* 131 (2002) 511-515.
- [10] Nangaku, M. *Kidney International* (2013) 84, 427-429.
- [11] T Ng, G Marx, T Littlewood, I Macdougall.. *Postgrad Med J* (2003) 79: 367-376
- [12] N. Debeljak, A.J. Sytkowski, Erythropoietin: new approaches to improved molecular designs and therapeutic alternatives. *Curr Pharm Des* 14 (2008) 1302-1310.
- [13] Noguchi, C.T., Asavaritikrai, P., Teng, R., and Jia, Y. (2007). Role of erythropoietin in the brain. *Crit Rev Oncol Hematol* 64, 159-171.
- [14] P.a. Konstantinopoulos, M.V. Karamouzis, A.G. Papavassiliou. *Biochim. Biophys. Acta* 1776 (2007) 1-9.
- [15] Sirén, A.L. y Ehrenreich, H. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* (2001) 251(4): 179-184.
- [16] Neurodegenerative disorders, Public health – European commission.http://ec.europa.eu/health/major_chronic_diseases/diseases/brain_neurological/index_en.htm
- [17] Policy Brief: The Global Impact of Dementia 2013-2050- The Global voice on Dementia. Alzheimer's disease International. <http://www.alz.co.uk/research/G8-policy-brief>.
- [18] NIH meeting advances Alzheimer's research agenda. Fogarty International Center. Advancing Science for Global Health. <http://www.fic.nih.gov/news/globalhealthmatters/march-april-2015/pages/nih-alzheimers-research-summit.aspx>
- [19] Toledo Atucha, J. *Alzheimer. Real Invest Demenc.* (2011), 47: 16-23.

- [20] Mawadda Alnaeeli, LiWang, Barbora Piknova, Heather Rogers, Xiaoxia Li, and Constance Tom Noguchi. *Anatomy Research International*. Volume 2012, Article ID 953264, 15 pages
- [21] Masuda, S. y col. *J. Biol. Chem.* (1993) 268(15): 11208-11216.
- [22] Wolf y col. *Thromb Haemost* (1997), 77:1020-1024.
- [23] P.J. Stohlawetz, L. Dzirlo, N. Hergovich, E. Lackner, C. Mensik, H.G. Eichler, E. Kabrna, K. Geissler, B. Jilma. *Blood* 95 (2000) 2983-2989.
- [24] Cases A y col. *Kidney International* (1992), 42:668-672.
- [25] Beguin Y., *Haematologica* (1999), 84:541-547.
- [26] M. Leist, P. Ghezzi, G. Grasso, R. Bianchi, P. Villa, M. Fratelli, C. Savino, M. Bianchi, J. Nielsen, J. Gerwien, P. Kallunki, A.K. Larsen, L. Helboe, S. Christensen, L.O. Pedersen, M. Nielsen, L. Torup, T. Sager, A. Sfacteria, S. Erbayraktar, Z. Erbayraktar, N. Gokmen, O. Yilmaz, C. Cerami-Hand, Q.W. Xie, T. Coleman, A. Cerami, M. Brines. *Science* 305 (2004) 239-242.
- [27] T. Mennini, M. De Paola, P. Bigini, C. Mastrotto, E. Fumagalli, S. Barbera, M. Mengozzi, B. Viviani, E. Corsini, M. Marinovich, L. Torup, J. Van Beek, M. Leist, M. Brines, A. Cerami, P. Ghezzi. *Mol. Med.* 12 (2006) 153-160.
- [28] Siren, A.L. y col. *Neurotherapeutics* (2009), 6(1): 108-127.
- [29] Erbayraktar, S. y col. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2003), USA 100: 6741-6746.
- [30] M. Mattio, N. Ceaglio, M. Oggero, N. Perotti, I. Amadeo, G. Orozco, G. Forno, R. Kratje, M. Etcheverrigaray. *Biotechnol Prog* 27 (2011) 1018-1028.
- [31] Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. 1988. *J Neurosci* (1988) 8:1454-1468

- [32] Das KP, Freudenrich TM, Mundy WR. *Neurotoxicol Teratol* (2004) 26:397–406
- [33] Rochefort NL, Konnerth A. *EMBO Rep.* (2012) Aug;13(8):699-708. doi: 10.1038/embor.2012.102.
- [34] Suetsugu M, Mehraein P. *Acta Neuropathol.* (1980)50(3):207-10.
- [35] Hutsler JJ1, Zhang H. *Brain Res.* (2010) Jan 14;1309:83-94. doi: 10.1016/j.brainres.2009.09.120.
- [36] Alfonso J., Fernandez M. E., Cooper B., Flugge G. and Frasch A. C. *Proc. Natl Acad. Sci.*(2005) USA 102, 17196–17201.
- [37] Ippolito, D.M., Eroglu, C., *Journal of Visualized Experiments.* (2010) Exp. 45:2270. doi: 10.3791/2270.

REIVINDICACIONES

1. Una eritropoyetina humana modificada con actividad eritropoyética menor al 0,5 % en relación a una eritropoyetina nativa, que mantiene su capacidad neuroprotectora y neuroplástica, caracterizada porque comprende al menos una mutación de un sitio de unión a un receptor homodimérico o heterodimérico mediante la incorporación de sitios consenso de glicosilación.
2. La eritropoyetina humana modificada de la reivindicación 1 donde dichos sitios de unión al receptor son seleccionados del conjunto de aminoácidos comprendidos por las posiciones: 45-47, 15-17, 104, 98-100, 106-108, 149, 151-153, 76-78, 72-74, 62-64, 65-67 y sus combinaciones.
3. La eritropoyetina humana modificada de la reivindicación 1 caracterizada porque dicha mutación es seleccionada del conjunto comprendido por:
 - a. Lys45Asn y Asn47Thr;
 - b. Tyr15Asn y Leu17Thr;
 - c. Ser104Asn;
 - d. Ala98Asn y Ser100Thr;
 - e. Thr106Asn y Leu108Thr;
 - f. Leu149Thr;
 - g. Gly151Asn y Leu153Thr;
 - h. Arg76Asn y Gln78Thr;
 - i. Glu72Asn y Val74Thr;
 - j. Glu62Asn y Trp64Thr;y
 - k. Gln65Asn y Leu67Thr.

4. La eritropoyetina humana modificada de la reivindicación 1 caracterizada porque comprende una actividad eritropoyética de hasta el 0,2% en relación a una eritropoyetina humana.
5. La eritropoyetina humana modificada de la reivindicación 1 caracterizada porque comprende nula actividad eritropoyética.
6. La eritropoyetina humana modificada de la reivindicación 1 caracterizada porque es codificada por una secuencia de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del conjunto comprendido por: SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13, SEQ ID N°15, SEQ ID N°17, SEQ ID N°19, SEQ ID N°21 y SEQ ID N°23.
7. La eritropoyetina humana modificada de la reivindicación 1 caracterizada porque comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del conjunto comprendido por: SEQ ID N°2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°8, SEQ ID N°10, SEQ ID N°12, SEQ ID N°14, SEQ ID N°16, SEQ ID N°18, SEQ ID N°20, SEQ ID N°22 y SEQ ID N°24.
8. Un ácido nucleico que comprende al menos la secuencia de nucleótidos seleccionada del conjunto comprendido por: SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13, SEQ ID N°15, SEQ ID N°17, SEQ ID N°19, SEQ ID N°21 y SEQ ID N°23.
9. Un vector de transformación, caracterizado porque comprende la secuencia de nucleótidos seleccionada del

conjunto comprendido por: SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13, SEQ ID N°15, SEQ ID N°17, SEQ ID N°19, SEQ ID N°21 y SEQ ID N°23.

10. Un vector de expresión, caracterizado porque comprende la secuencia de nucleótidos seleccionada del conjunto comprendido por: SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13, SEQ ID N°15, SEQ ID N°17, SEQ ID N°19, SEQ ID N°21 y SEQ ID N°23.

11. Un vector lentiviral, caracterizado porque comprende la secuencia de nucleótidos seleccionada del conjunto comprendido por: SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13, SEQ ID N°15, SEQ ID N°17, SEQ ID N°19, SEQ ID N°21 y SEQ ID N°23.

12. Una célula genéticamente modificada que comprende una molécula de ácido nucleico seleccionada del conjunto comprendido por: SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13, SEQ ID N°15, SEQ ID N°17, SEQ ID N°19, SEQ ID N°21 y SEQ ID N°23.

13. La célula genéticamente modificada de la reivindicación 12 caracterizada porque comprende una línea celular animal o vegetal o cualquier huésped celular que permita adición de N-glicanos.

14. La célula genéticamente modificada de la reivindicación 12 caracterizada porque comprende una línea celular animal.

15. La célula genéticamente modificada de la reivindicación 12 caracterizada porque es seleccionada del conjunto comprendido por CHO.K1, HEK293, NS0, BHK-21 y HeLa.
16. Una composición farmacéutica caracterizado porque comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la eritropoyetina humana modificada de la reivindicación 1.
17. Una composición farmacéutica caracterizado porque comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la eritropoyetina humana modificada de la reivindicación 1 para el tratamiento de patologías seleccionadas del conjunto comprendido por Alzheimer, Parkinson, esclerosis amiotrófica lateral (ELA), enfermedades de las neuronas motoras, enfermedad de Huntington, atrofas espinocerebelosas, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, enfermedades incapacitantes como la depresión o la esquizofrenia, enfermedades del desarrollo como el síndrome de Down, daño del tejido nervioso por los accidentes cerebrovasculares (ACV) y las traumatismos cráneo-encefálicos.
18. El uso de la eritropoyetina humana modificada de la reivindicación 1 para el tratamiento de patologías seleccionadas del conjunto comprendido por Alzheimer, Parkinson, esclerosis amiotrófica lateral (ELA), enfermedades de las neuronas motoras, enfermedad de Huntington, atrofas espinocerebelosas, la enfermedad de Creutzfeld-Jakob, enfermedades incapacitantes como la depresión o la esquizofrenia, enfermedades del desarrollo como el síndrome de Down, daño del tejido nervioso por

los accidentes cerebrovasculares (ACV) y las traumatismos cráneo-encefálicos.

19. Un proceso de obtención de la eritropoyetina humana modificada de la reivindicación 1, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

- a. disponer de secuencias de ácidos nucleicos que codifican dicha eritropoyetina humana modificada;
- b. construir, al menos, un vector de cotransfección de células empaquetadoras;
- c. cotransfectar dichas células empaquetadoras productoras de partículas lentivirales que contienen dicha secuencia de ácido nucleico que codifica para dicha eritropoyetina humana modificada;
- d. cosechar dichas partículas lentivirales producidas por las células empaquetadoras del paso c-;
- e. transducir células capaces de expresar y plegar la eritropoyetina humana modificada con dichas partículas lentivirales de dicho paso d-;
- f. seleccionar las células del paso e- que comprendan la secuencia de ácido nucleico que codifica para dicha eritropoyetina humana modificada;
- g. cultivar las células del paso f- para que expresen dicha eritropoyetina humana modificada y;
- h. aislar y purificar dicha eritropoyetina humana modificada.

20. El proceso de la reivindicación 19, donde en dicho paso a-, dichas secuencias de ácido nucleico son seleccionadas del conjunto comprendido por SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID

Nº13, SEQ ID Nº15, SEQ ID Nº17, SEQ ID Nº19, SEQ ID Nº21 y SEQ ID Nº23.

21. El proceso de la reivindicación 19, donde dicho paso b- comprende un vector que permite la entrada de la partícula lentiviral en la célula; un vector que codifica para: una proteína de matriz, una cápside, una proteasa, una transcriptasa inversa y una integrasa; un vector de transferencia que contiene la secuencia de eritropoyetina humana modificada; y un vector que induce la exportación nuclear de dicho vector de transferencia.
22. El proceso de la reivindicación 19, donde en dicho paso e-, dichas células son seleccionadas del conjunto comprendido por CHO.K1, HEK293, NS0, BHK-21 y HeLa.
23. El proceso de la reivindicación 19, donde dicho paso h-, es una purificación por inmutaafinidad que comprende un anticuerpo anti-rhEPO, y un eluyente.
24. El proceso de la reivindicación 23, donde dicho eluyente es seleccionado del conjunto comprendido por glicina, ácido acético - NaCl, sales de acetato, ácido cítrico, sales de fosfato, etanol, isopropanol, dioxano, etilenglicol, tris/HCl, y sus mezclas.
25. El proceso de la reivindicación 23, donde dicho eluyente es seleccionado del conjunto comprendido por glicina, ácido acético- NaCl.
26. El proceso de la reivindicación 23, donde dicho eluyente es seleccionado del conjunto comprendido por

glicina 0,1 M pH=2; glicina 0,15 M pH=2,5 y ácido acético
0,2 M, NaCl 0,15 M pH=3.

RESUMEN

Una eritropoyetina humana modificada con un tiempo de vida media en plasma aumentado, con actividad eritropoyética menor al 0,5 % en relación a una eritropoyetina nativa, que mantiene su capacidad neuroprotectora y neuroplástica, que comprende la mutación de al menos uno de los sitios de unión al receptor homodimérico o heterodimérico mediante la incorporación de sitios consenso de N-glicosilación.

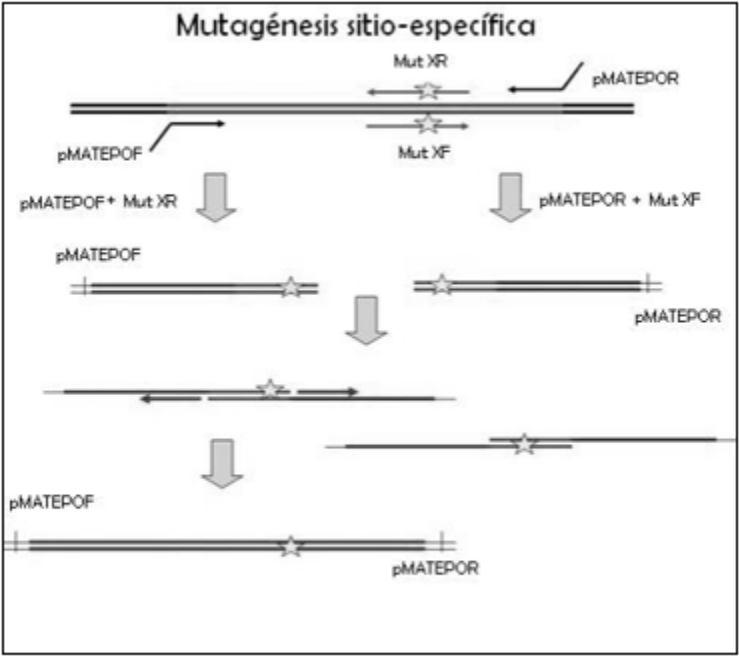


Figura 1

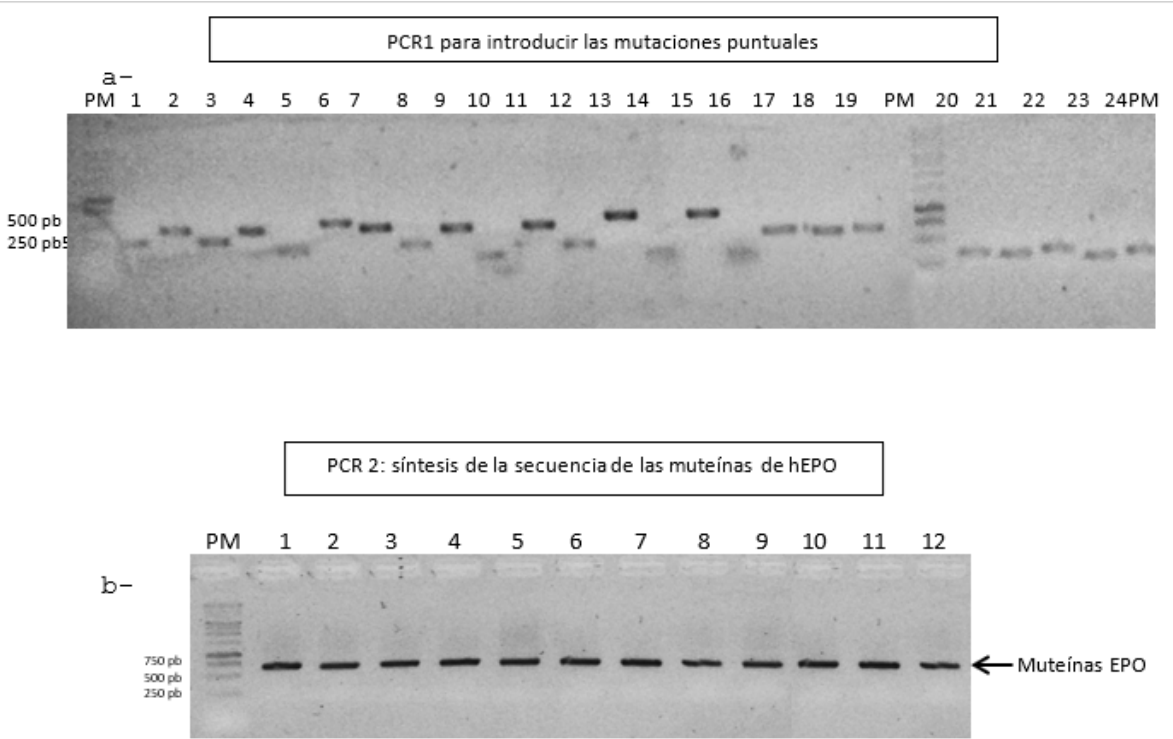


Figura 2

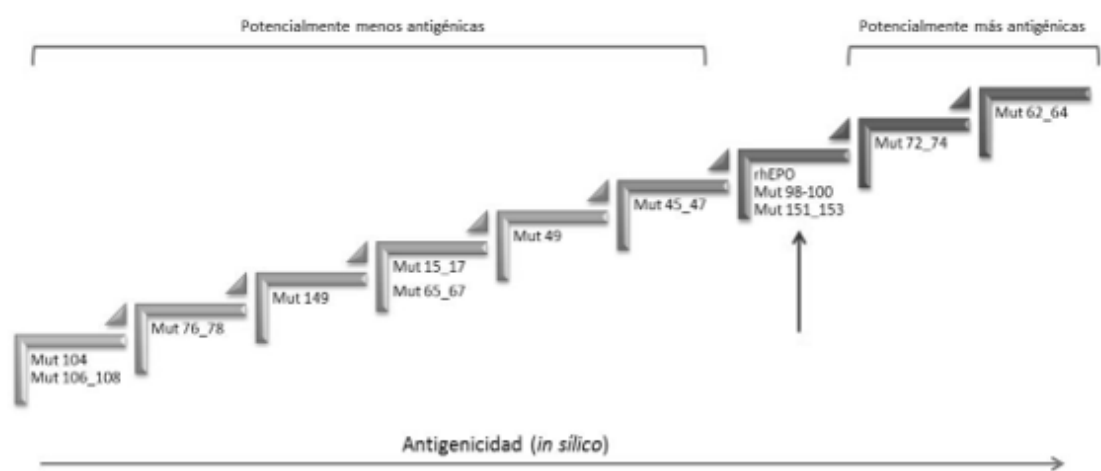


Figura 3

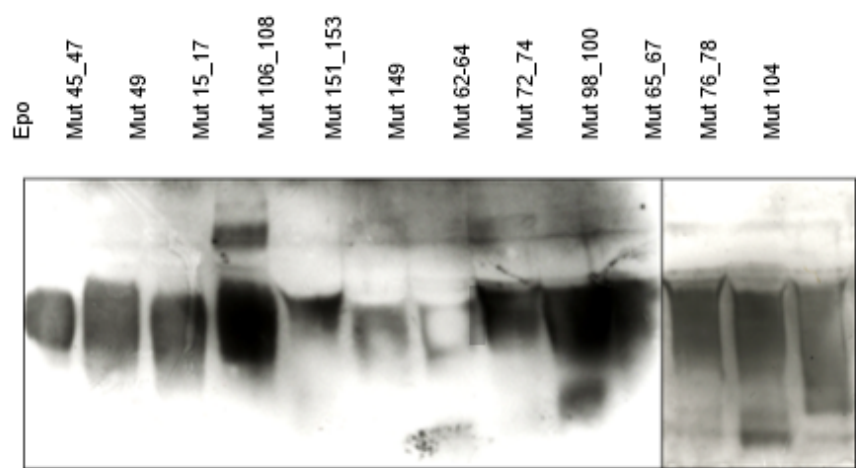


Figura 4

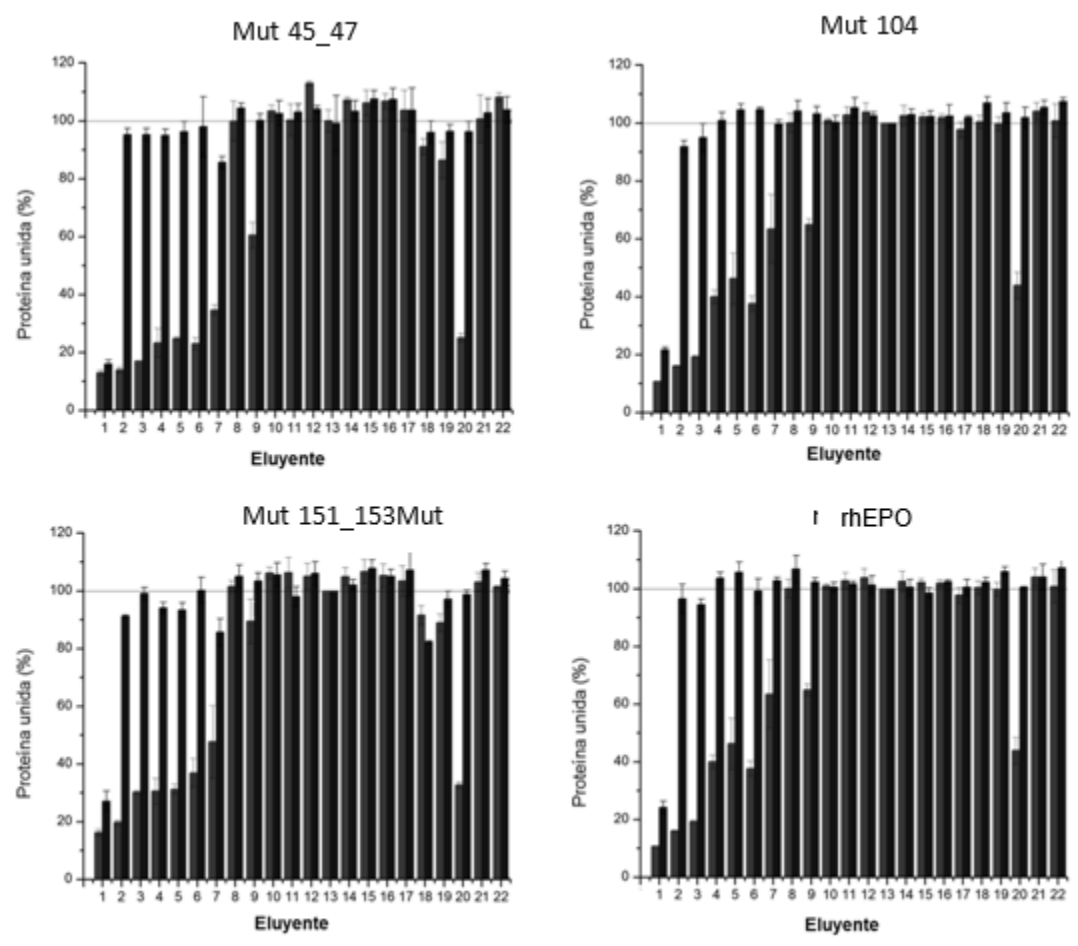


Figura 5.

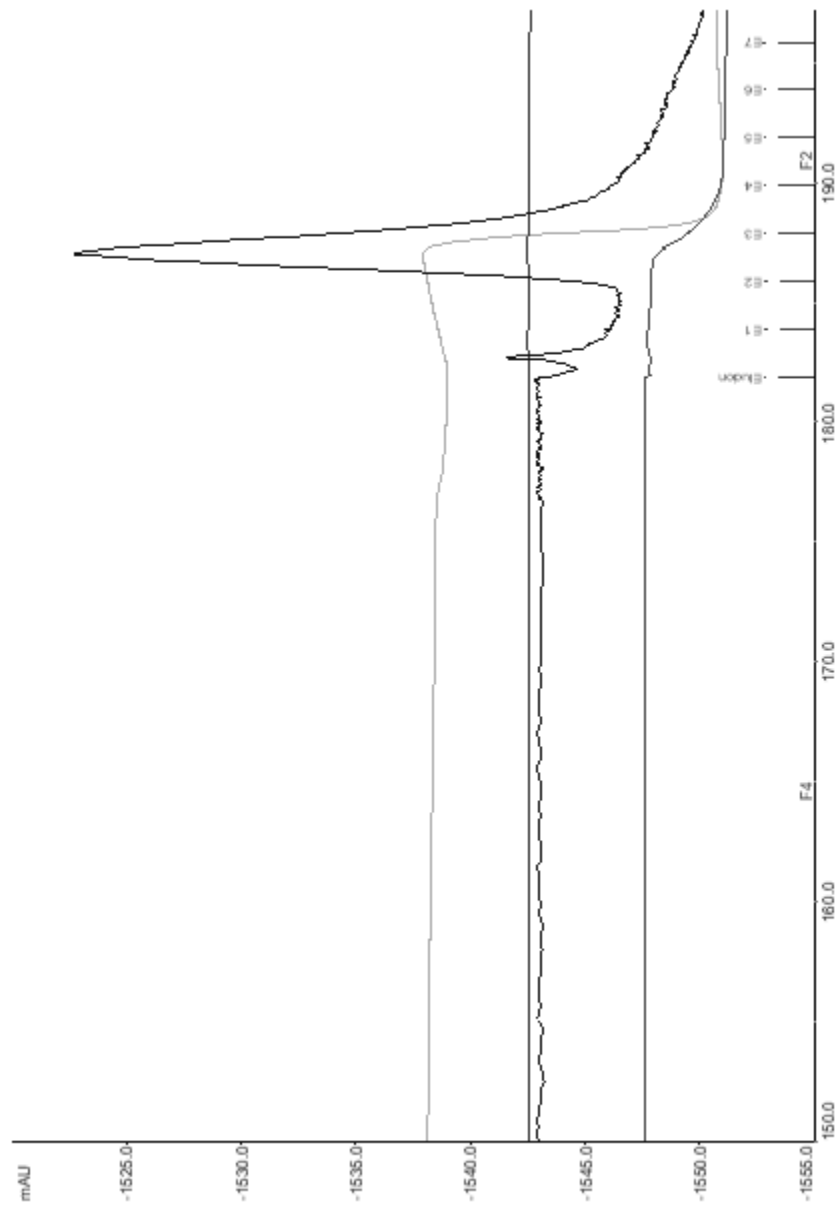


Figura 6.

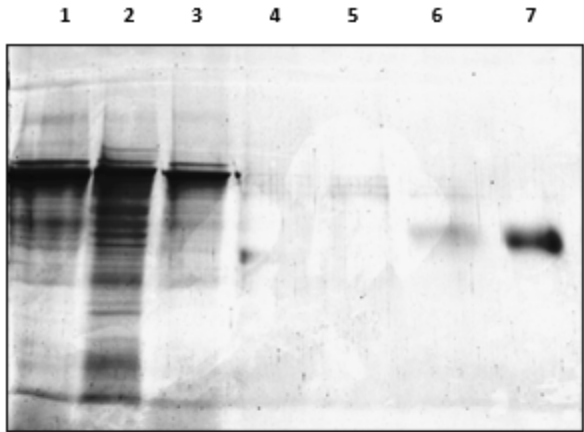


Figura 7

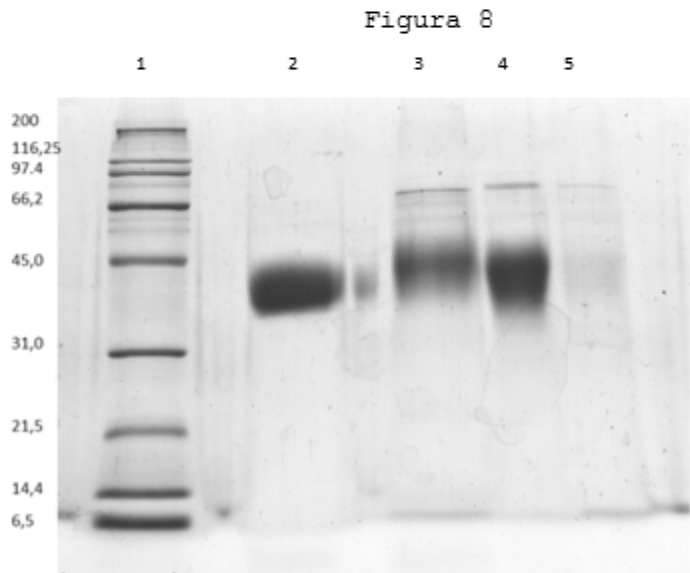


Figura 8

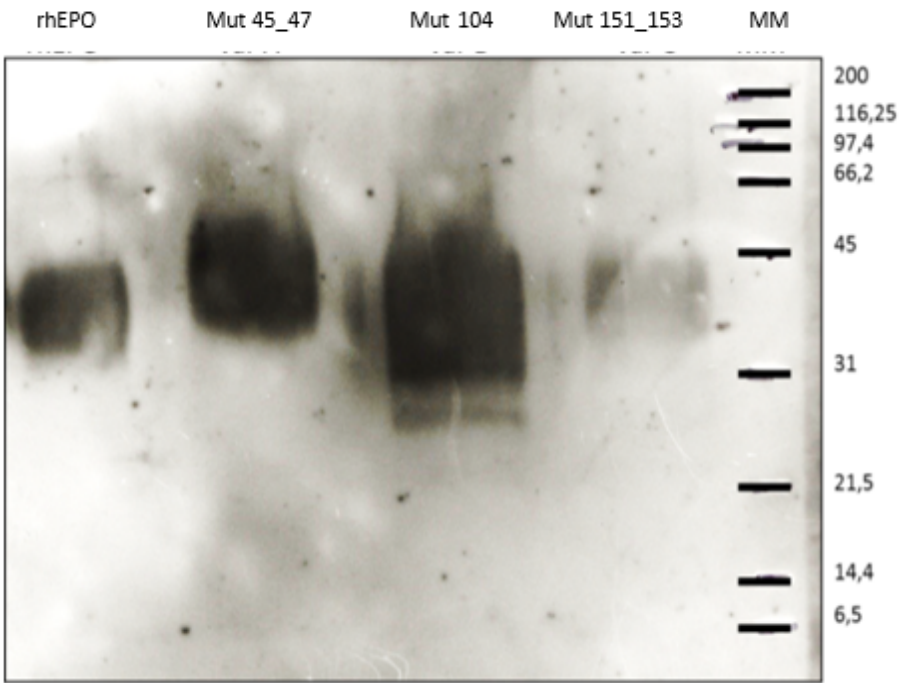


Figura 9

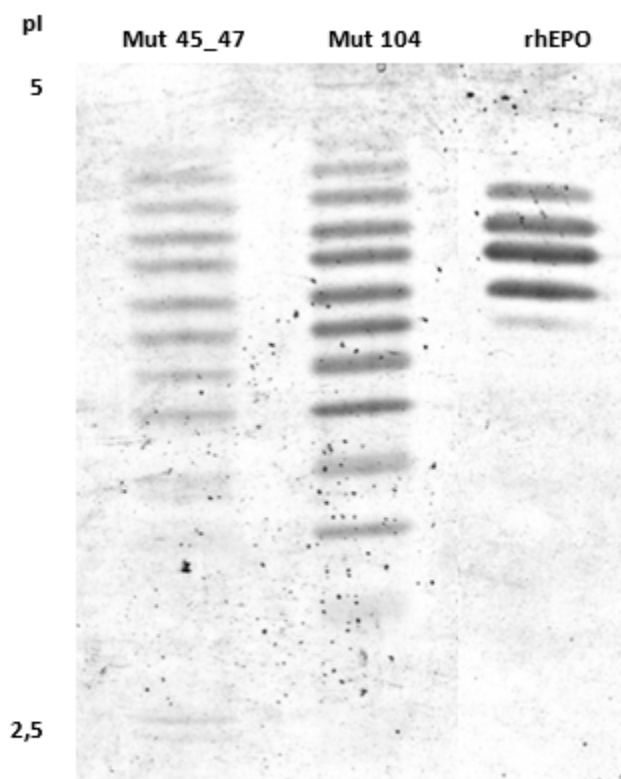


Figura 10

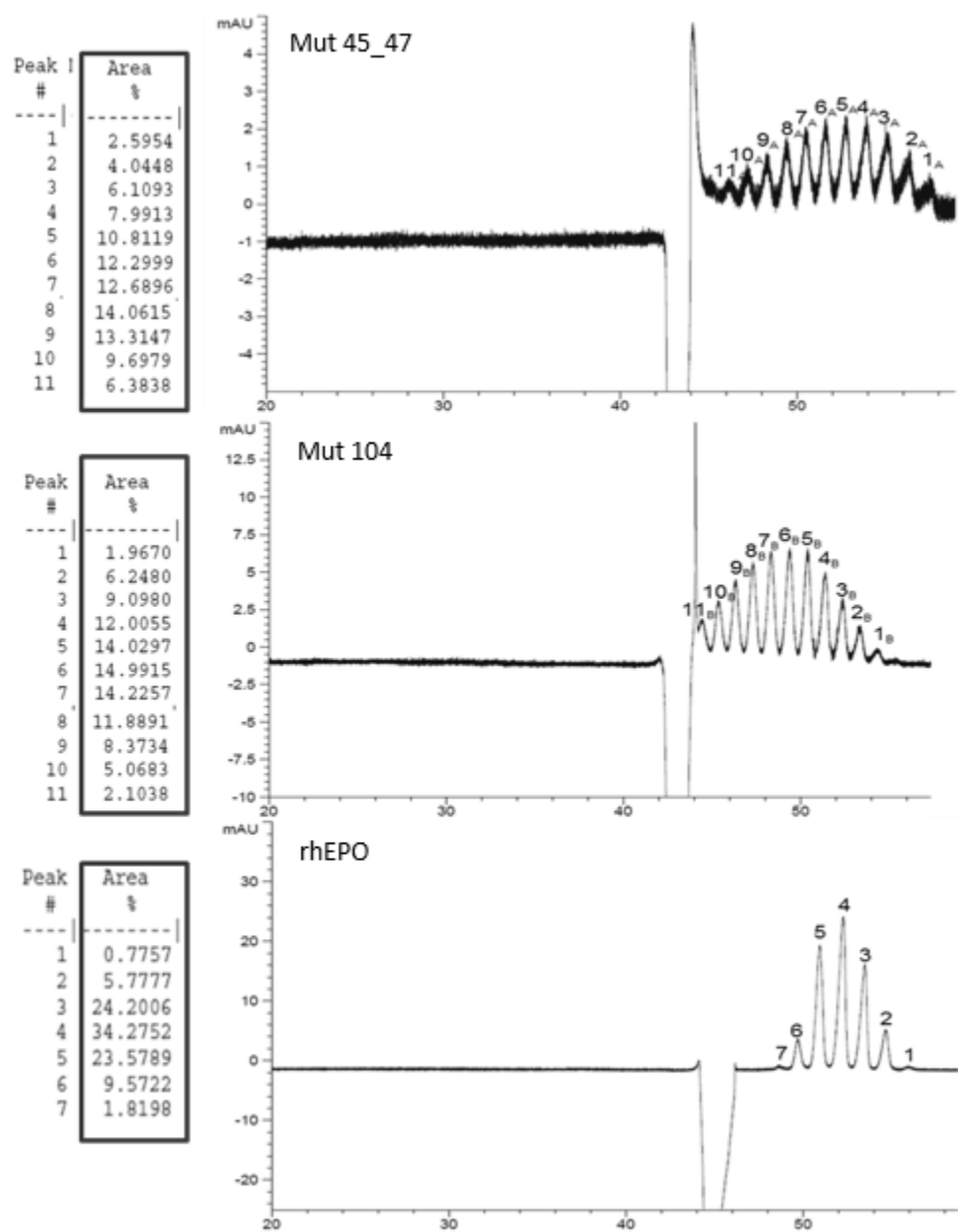


Figura 11

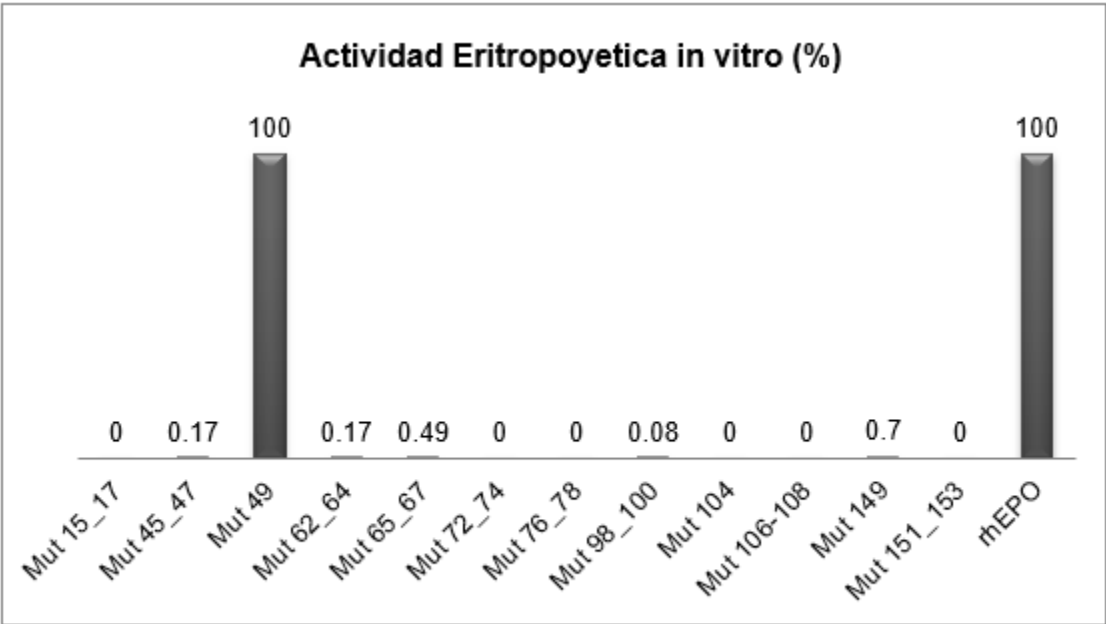


Figura 12 -a-

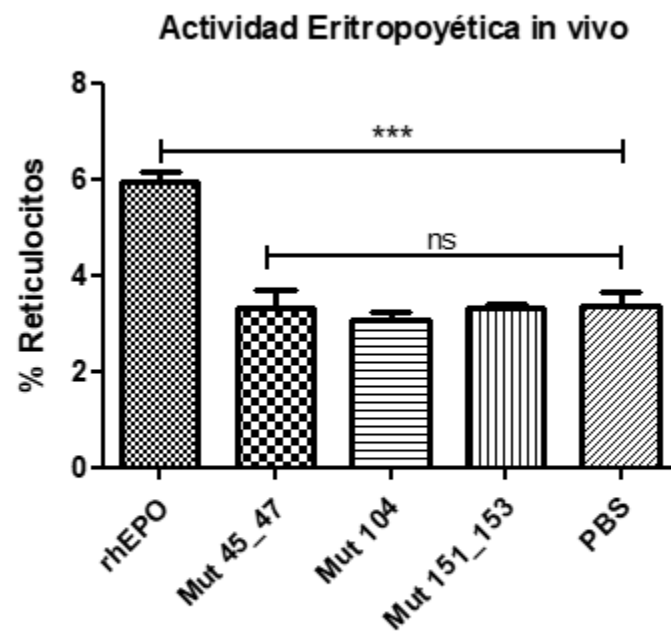


Figura 12 -b-

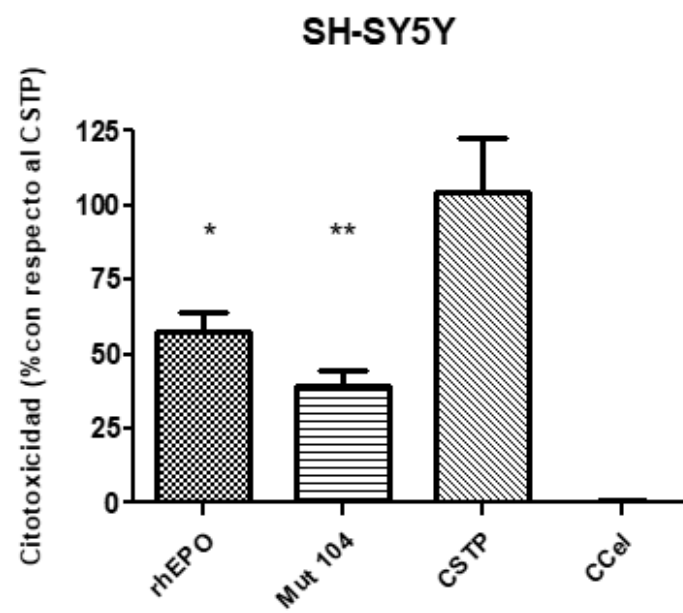


Figura 13



Figura 14

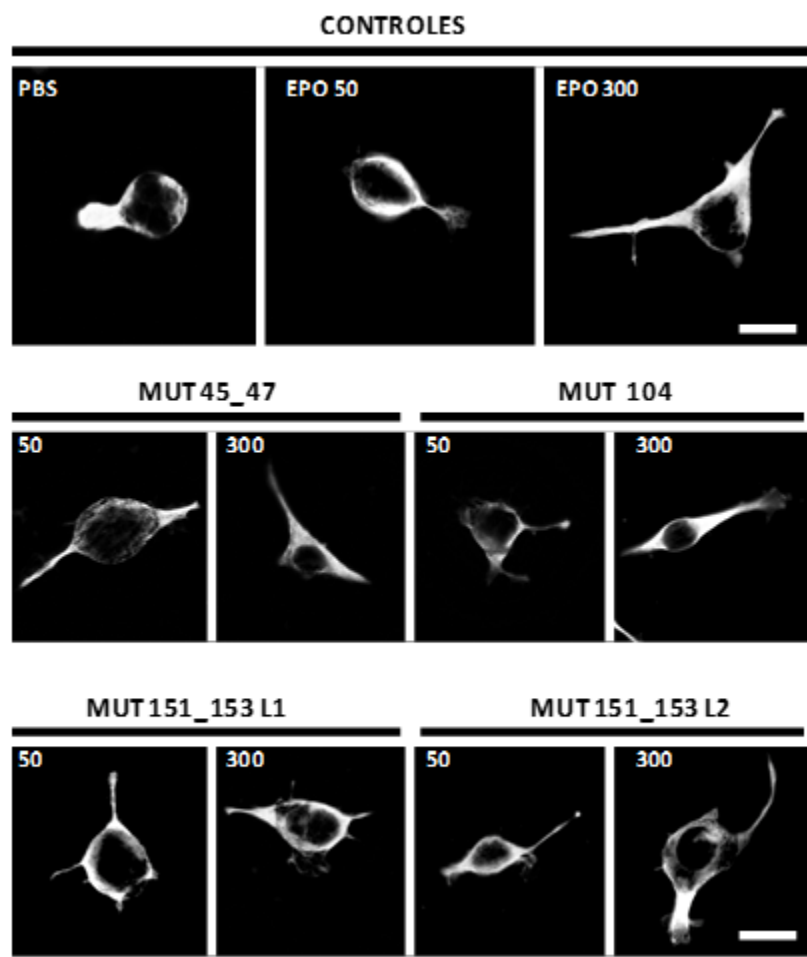


Fig. 15 (a)

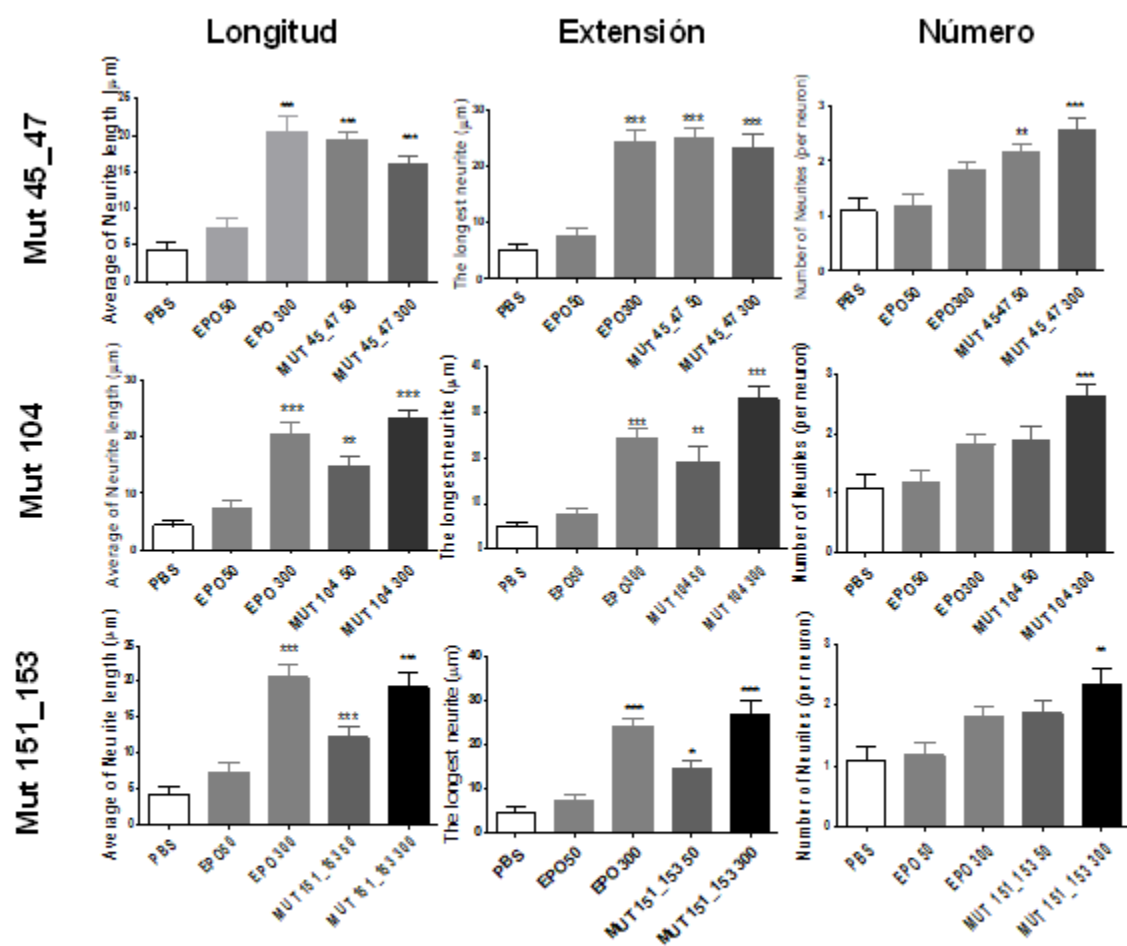


Fig. 15 (b)

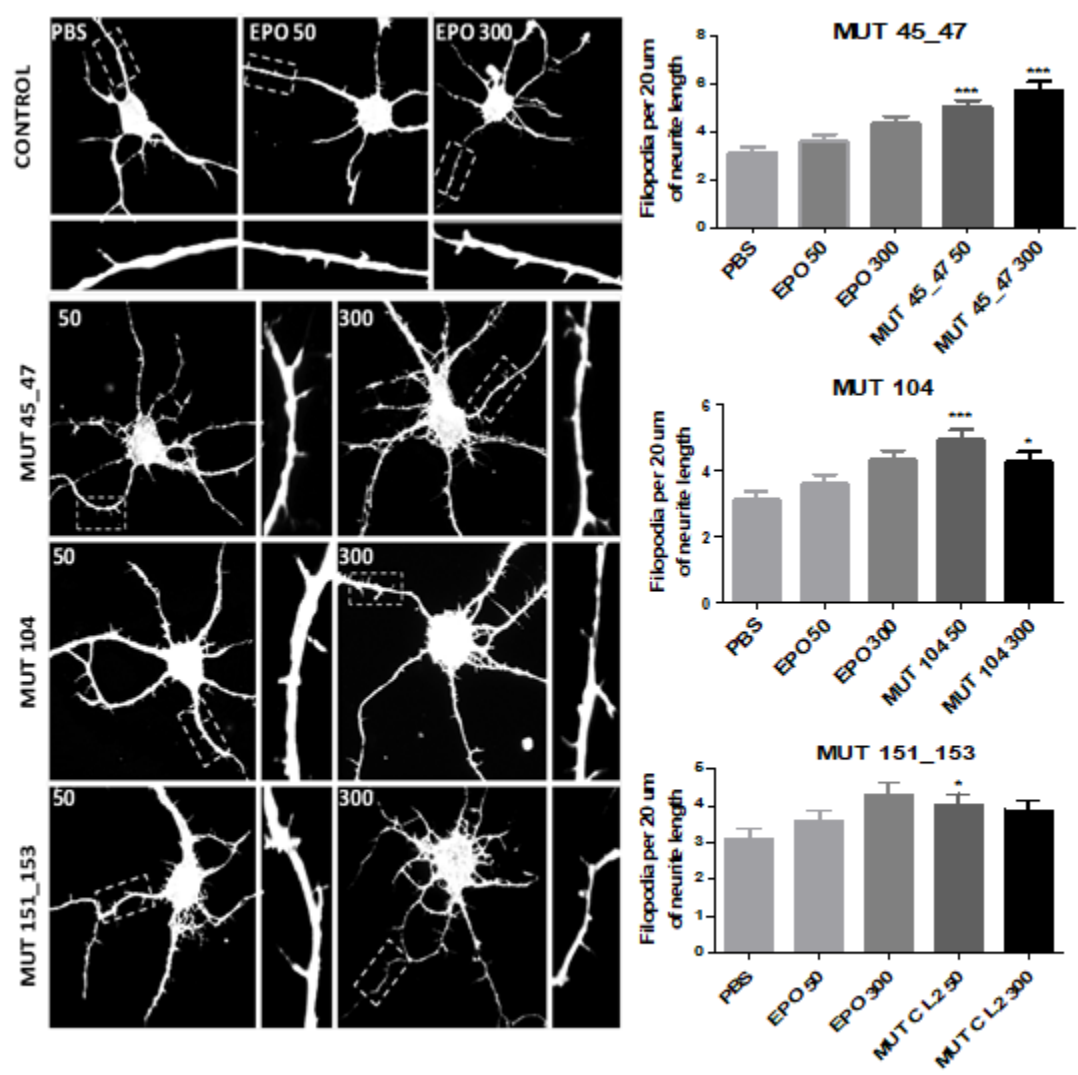


Figura 16

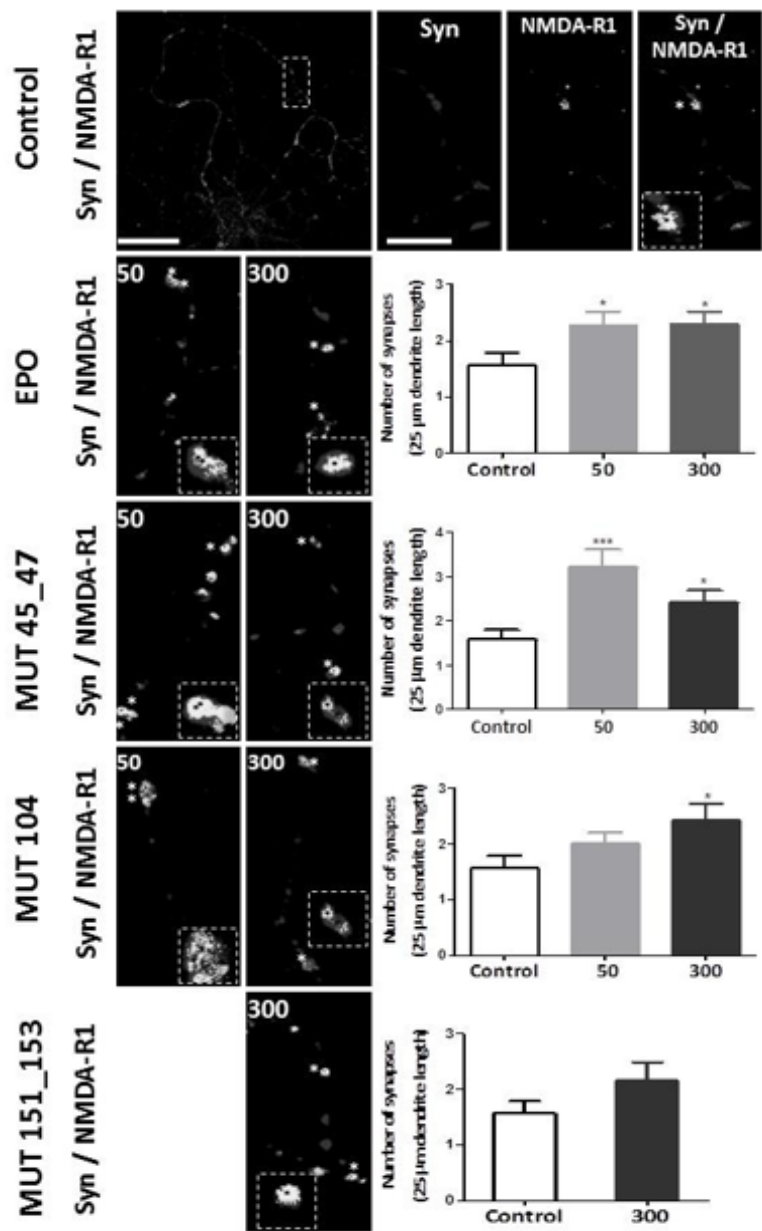


Figura 17

Actividad neuroprotectora in vitro

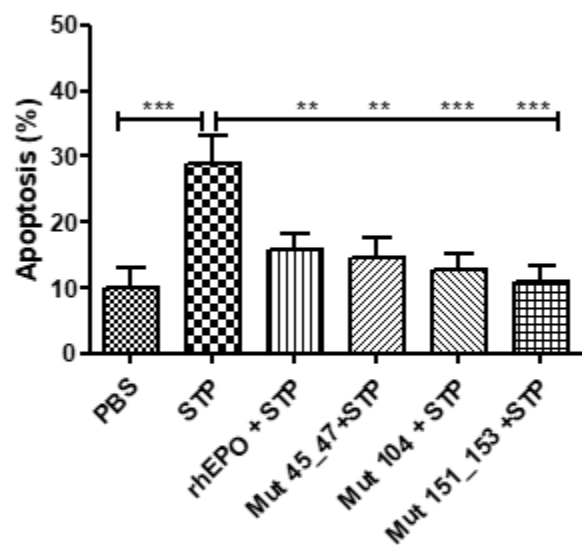


Figura 18