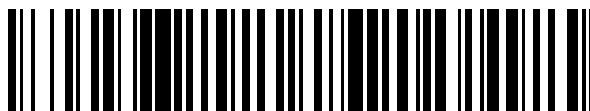


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 082**

51 Int. Cl.:

A61K 38/30 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2003 E 03737378 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 1480669**

54 Título: **Uso de la variante de corte y empalme MGF del factor de crecimiento I similar a la insulina para la prevención del daño miocárdico**

30 Prioridad:

07.02.2002 GB 0202906

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

29.11.2013

73 Titular/es:

UNIVERSITY COLLEGE LONDON (50.0%)

Gower Street

London WC1E 9BT, GB y

THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS (50.0%)

72 Inventor/es:

GOLDSPINK, GEOFFREY y

GOLDSPINK, PAUL

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 432 082 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de la variante de corte y empalme MGF del factor de crecimiento I similar a la insulina para la prevención del daño miocárdico.

Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere al uso de polipéptidos derivados de la secuencia de la variante de corte y empalme MGF de IGF-I y polinucleótidos que codifican para tales polipéptidos en la prevención del daño miocárdico tras un ataque al corazón.

Antecedentes de la invención

Cardiopatía isquémica

- 10 Se produce isquemia cuando una arteria que suministra sangre oxigenada a un músculo u otro órgano se obstruye. Esto disminuye la capacidad del órgano afectado para funcionar y puede implicar muerte celular en la zona cuyo suministro de sangre se reduce.

- 15 La cardiopatía isquémica es una causa principal de muerte. Incluso en aquellos pacientes que sobreviven a un ataque al corazón, las perspectivas de un estilo de vida activo se reducen gravemente debido a la pérdida de músculo cardíaco. El músculo cardíaco, como el músculo esquelético y el sistema nervioso central, es un tejido posmitótico. Puesto que prácticamente no hay reemplazo de células a lo largo de toda la vida, tiene que haber un mecanismo de reparación local continuo eficaz. El daño por radicales libres y físico local se produce incluso en tejidos sanos y tiene que repararse; de lo contrario la célula experimenta muerte celular que da como resultado un déficit funcional permanente.

- 20 En el corazón, la isquemia puede resultar de una obstrucción de las arterias coronarias. Esto conduce a que los cardiomiocitos en determinadas zonas se vean privados de sangre y por tanto de oxígeno. Entonces comienzan a morir. Esto significa un aumento de la tensión mecánica sobre los miocardiocitos supervivientes en la zona que ha resultado dañada, lo que también conduce a muerte celular. Por tanto, se produce muerte celular como resultado tanto de la privación de oxígeno como de la tensión mecánica excesiva. La región de muerte celular, o necrosis, se conoce como infarto.

La variante de corte y empalme MGF de IGF-I

- 30 Los polipéptidos de IGF-I de mamífero tienen varias isoformas, que surgen como resultado del corte y empalme alternativo del ARNm. A grandes rasgos, hay dos tipos de isoformas, isoformas de tipo hepático y las de tipo no hepático. Las isoformas de tipo hepático pueden expresarse en el hígado o en otro sitio aunque, si se expresan en otro sitio, son equivalentes a las expresadas en el hígado. Tienen una acción sistémica y son las isoformas principales en mamíferos. Las isoformas de tipo no hepático son menos comunes y se cree que algunas tienen una acción autocrina/paracrina. La isoforma de MGF de la invención es de este último tipo. La terminología para las variantes de corte y empalme de IGF-I se basa en las isoformas hepáticas (Chew *et al.*, 1995) y no ha evolucionado completamente para tener en cuenta las producidas por tejidos no hepáticos. Estas últimas se controlan en algún grado por un promotor diferente (promotor 1) con respecto a las isoformas de IGF-I hepáticas, que responden a hormonas y están bajo el control del promotor 2.

- 40 En músculo esquelético humano, se ha clonado el ADNc de tres variantes de corte y empalme de IGF-I. Con referencia a la figura 1, los exones 1 y 2 son exones líder alternativos con sitios de inicio de la transcripción distintos que se cortan y empalman de manera diferencial con respecto al exón 3 común. Los exones 3 y 4 codifican para el péptido de IGF-I maduro (dominios B, C, A y D) así como los primeros 16 aminoácidos del dominio E. Los exones 5 y 6 codifican cada uno para una parte alternativa de un péptido de extensión distinto, el dominio E. A éste le siguen los codones de terminación del IGF-I precursor, regiones no traducidas en 3' y sitios señal de adición de poli(A).

- 45 En músculo esquelético, el ARNm de una de las tres variantes de corte y empalme de IGF-I de músculo sólo podía detectarse en músculo sometido a ejercicio y/o dañado (estirado y/o eléctricamente estimulado), y su expresión está relacionada con el nivel de actividad muscular. Se le denominó factor de crecimiento mecánico (MGF). El ARNm de MGF no se detecta en músculo esquelético distrófico ni siquiera cuando se somete a estiramiento.

- 50 MGF (figura 1; Yang *et al.*, 1996; McKoy *et al.*, 1999) tiene los exones 4, 5 y 6 mientras que el IGF-I de tipo hepático expresado en músculo tiene los exones 4 y 6. Las otras dos variantes de corte y empalme encontradas en músculo humano tienen secuencias similares al tipo sistémico hepático de IGF-I. Notablemente, MGF humano tiene un inserto de 49 pares de bases (dominio E) que cambia su marco de lectura en el extremo carboxilo.

Se ha identificado ya MGF para el tratamiento de trastornos del músculo esquelético, notablemente distrofia muscular (documento WO97/33997; patente estadounidense n.º 6.221.842; Yang *et al.*, 1996; McKoy *et al.*, 1999), para el tratamiento de trastornos neurológicos (documento WO01/136483) y para la reparación de nervios (documento WO01/85781).

5 Sumario de la invención

El papel de L.IGF-I y MGF en músculo cardiaco

La farmacología de la regulación local de la expresión génica, incluyendo las rutas de señalización mediante las que las células responden a estímulos mecánicos, representa una nueva e importante área de estudio. Están implicados factores mecánicos (tanto extrínsecos como intrínsecos) en el cambio de la expresión génica y la regulación de los procesos de transcripción y traducción dentro de los miocitos cardiacos. Alteraciones en los estímulos mecánicos pueden ocasionar un aumento del crecimiento de músculo cardiaco (hipertrofia cardiaca), que es inicialmente una respuesta adaptativa al aumento del gasto cardiaco. Sin embargo, en determinadas condiciones, puede tener lugar una transición a hipertrofia patológica en la que hay un aumento en la masa miocárdica pero una disminución en el rendimiento cardiaco. Las células de los ventrículos vuelven de nuevo a expresar isoformas embrionarias de los genes contráctiles, lo que da como resultado una utilización de energía más rápida. Para agravar adicionalmente el problema, otras formas de lesión miocárdica que pueden producirse dan como resultado a menudo muerte celular de los miocitos (apoptosis) dando como resultado la pérdida de miocitos que funcionan. Los miocitos sanos restantes aumentan generalmente de tamaño con el fin de mantener el gasto cardiaco. Esto conduce de nuevo a un estado hipertrófico y puede desarrollarse también hasta el punto en el que se convierte en un estado patológico.

Hay pruebas de la importancia de IGF-I sistémico, de tipo hepático (L.IGF-I) como regulador del crecimiento del miocardio y un protector frente a la muerte celular del miocardio. Se ha notificado una mejora significativa en la función cardiaca tras la administración de hormona de crecimiento (GH) en modelos animales de cardiomiopatía y en ensayos clínicos (Thuesen *et al.*, 1998; Fazio *et al.*, 1996). La hormona de crecimiento induce la expresión de los factores de crecimiento similares a la insulina sistémicos mediante su acción sobre el hígado. Buerke *et al.* (1995) notificaron que la administración de L.IGF-I recombinante tras isquemia del miocardio transitoria en ratas reducía la muerte celular y la membrana celular se reducía tal como se indica por el lavado de CK. Usando el anticuerpo frente a IGF-I general, Matthews *et al.* (1999) mostraron que L.IGF-I estaba regulado por incremento en la región del infarto. Se ha mostrado también que la administración de hormona de crecimiento e IGF-I de tipo hepático recombinante en ensayos clínicos tiene efectos beneficiosos sobre el gasto cardiaco en casos cardiacos terminales (Gluckman, documento WO92/11865). Sin embargo, todo este trabajo implicaba explícitamente IGF-I recombinante del tipo hepático o sistémico, o no podía reconocer la existencia de múltiples isoformas de IGF-I. Ninguno de ellos identificó la isoforma de MGF.

Hasta la fecha, están mucho menos desarrolladas pruebas referentes a MGF en músculo cardiaco, en contraposición a L.IGF-I. Usando RT-PCR, Skarli *et al.* (1998) encontraron que se expresaba MGF en músculo cardiaco de conejo 24 horas tras el pinzamiento breve de la aorta mientras que sólo estaba presente L.IGF-I en el corazón en reposo y concluyeron que el transcrito de MGF se traducía y se producía por el músculo cardiaco en respuesta a señales mecánicas. Junto con la distrofia muscular y otros trastornos del músculo esquelético, el documento WO97/3397 (patente estadounidense n.º 6.221.842) también menciona la posibilidad de prevención de trastornos cardiacos, enfermedades en las que la promoción de la síntesis de proteínas del músculo cardiaco es un tratamiento beneficioso, cardiomiopatías, insuficiencia cardiaca aguda o ataque agudo incluyendo miocarditis o infarto de miocardio, y mejora del gasto cardiaco aumentando el volumen del corazón; pero no proporciona hallazgos experimentales que vinculen a MGF con el músculo cardiaco, en contraposición al esquelético.

En el presente documento, se muestra que MGF se expresa fuertemente en la zona infartada tras la isquemia en corazón de rata y oveja. En contraposición a la situación para L.IGF-I, se muestra también que la expresión de MGF coincide con la fase de recuperación inmediata tras sobrecarga mecánica e isquemia transitoria. Por tanto, la expresión de MGF es más rápida que la expresión de L-IGF-I. Se ha mostrado también que se induce la expresión de MGF en miocitos cardiacos que experimentan apoptosis, que la transfección estable de la línea celular de tipo cardiaco H9C2 con MGF previene la apoptosis y se han obtenido pruebas de que MGF induce un fenotipo hipertrófico en miocitos *in vitro*.

Adicionalmente, se ha mostrado que la expresión prolongada de MGF en miocitos cardiacos está asociada con la supresión de proteínas de filamentos gruesos de miofilamentos pero no proteínas de filamentos finos. Esto actúa diferenciando el miocito. Se concluye que la expresión de MGF da como resultado la remodelación de la región infartada, es decir, que diferenciando el miocito, MGF facilita el proceso de reparación.

Se encuentra que el dominio E (parte del exón 4) es importante en el músculo cardiaco para la reparación del tejido local, aunque no parece que implique la activación de células madre ya que no se cree que el músculo cardiaco tenga células madre. Por tanto, los datos sugieren que el inserto de dominio E en MGF no sólo cambia el marco de lectura del extremo C-terminal del péptido con respecto al de L.IGF-I sino que también el dominio E puede tener una

función separada en la reparación de cardiomiocitos celulares.

Los hallazgos en el presente documento muestran que se activa MGF en respuesta a daño del tejido cardiaco y tiene una función de reparación en el corazón sobrecargado y/o isquémico. A su vez, esto muestra que, además de las utilidades previamente indicadas, puede usarse para proteger frente al daño miocárdico por apoptosis en respuesta a isquemia/sobrecarga. En este sentido, hay dos aspectos en el proceso de reparación cardiaca, concretamente la prevención de la apoptosis y la hipertrofia de los cardiomiocitos supervivientes en las regiones dañadas, que compensan la pérdida de células de músculo cardiaco.

La administración rápida de un polipéptido de MGF tras un ataque al corazón es particularmente deseable, y también puede efectuarse tratamiento a más largo plazo, especialmente administrando un polinucleótido que codifica para un polipéptido de MGF para mantener de niveles de MGF en el músculo cardiaco tras la administración inicial del polipéptido.

Por consiguiente, la invención proporciona:

un polipéptido de factor de crecimiento mecánico (MGF) o un polinucleótido que codifica para un polipéptido de MGF para su uso en la prevención o limitación del daño miocárdico en respuesta a un ataque al corazón, previniendo o limitando la apoptosis en el miocardio;

un producto que comprende un polipéptido de MGF y un polinucleótido que codifica para un polipéptido de MGF para su uso simultáneo, separado o secuencial en la prevención del daño miocárdico en respuesta a un ataque al corazón; y

el uso de un polipéptido de factor de crecimiento mecánico (MGF) o polinucleótido que codifica para un polipéptido de MGF en la fabricación de un medicamento para la prevención o limitación del daño miocárdico en respuesta a un ataque al corazón, previniendo o limitando la apoptosis en el miocardio.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Corte y empalme alternativo del gen de IGF-I

Esta figura muestra la secuencia de exones de las variantes de corte y empalme de IGF-I expresadas en músculo esquelético humano. Dos de éstas tienen secuencias similares a los IGF-I sistémicos producidos por el hígado. El transcrito humano de MGF tiene un inserto de 49 bases (52 bases en rata y conejo) en el dominio E que altera el marco de lectura y por tanto el extremo C-terminal del péptido difiere del de las otras variantes de corte y empalme.

También se muestra la expresión del IGF-I sistémico (A) y MGF (B) en el corazón de oveja isquémico. En el caso de MGF, la expresión es más rápida y se observa cuando el intervalo entre la inducción del infarto y la recogida de las muestras cardiacas es relativamente muy corto como en E3 en B.

Figura 2: Inducción de la expresión de MGF en corazones sometidos a cerclaje aórtico

Se sometieron a cerclaje aórtico grupos de ratones (3) durante 7 días tras los que se sometió a ensayo la expresión de MGF usando RT-PCR en tiempo real cuantitativa en ARN total extraído del corazón. A. Resultados de la reacción de RT-PCR ejecutada sobre geles de agarosa para MGF e IGF. B. Cuantificación de la expresión génica tras RT-PCR en tiempo real, o MGF, IGF, ANF y Bax.

Figura 3: Inducción de los genes marcadores hipertroáficos con sobreexpresión de MGF

En los cultivos de miocitos cardiacos primarios transfectados con el plásmido de MGF (NT-GFP), hubo un aumento significativo en la expresión de tanto ANF como bMHC en comparación con otras condiciones. Estos datos muestran que la expresión de MGF es suficiente para inducir un fenotipo hipertrofico *in vitro*.

Figura 4: Inducción de la expresión de MGF en respuesta a MPA en miocitos cardiacos

Se cultivaron cultivos primarios de miocitos cardiacos en medios libres de suero durante 24 horas antes de la adición de PMA (200 nM). Tras 30 min., se extrajo el ARN total y se sometió a ensayo la expresión génica de MGF usando RT-PCR en tiempo real. A. La expresión de MGF aumenta significativamente tras el tratamiento con PMA, mientras que la expresión de IGF no cambia. B. Una repetición del experimento inicial pero en el tercer grupo se añadió PMA a los cultivos sin cambiar los medios. La expresión de MGF aumenta en una gran magnitud cuando se añade PMA con medios nuevos.

Figura 5: Expresión de MGF en miocitos cardiacos en condiciones apoptóticas

5 Se cultivaron miocitos cardiacos en medios libres de suero durante 24 horas antes de la adición de sorbitol 0,3 M. Se extrajo el ARN total tras 4 horas y 24 horas de tratamientos. A. Se realizó el análisis de la expresión génica usando RT-PCR en tiempo real para MGF, IGF, el marcador anti-apoptosis Bcl2 y el marcador de apoptosis Bax. B. Se extrajo ADN de las mismas células y se sometió a electroforesis para determinar el grado de fragmentación. Puede observarse fragmentación del ADN (flecha), en las células tratadas con sorbitol durante 24 h, indicando que había tenido lugar apoptosis en esos miocitos.

Figura 6: Inducción de apoptosis en línea celular cardiaca transfectada con MGF y L.IGF

10 Se transfectaron de manera estable células con ADNc que codifica para MGF y L.IGF-I y se seleccionaron mediante resistencia a antibiótico usando técnicas convencionales. Una vez se identificaron los clones, se aislaron estos y se expandieron como líneas separadas de células. Se sembraron en placa células control, que no se habían transfectado, más clones de MGF y L.IGF-I estables y se trataron durante 24 horas con sorbitol 0,3 M. Tras el tratamiento, se extrajo ADN y se sometió a electroforesis (agarosa al 1%) para determinar si se había producido fragmentación del ADN. Los carriles 1 y 5 son marcadores de ADN (100 pb y 1 kB respectivamente). Carril 2, células H9C2 control tras 24 horas con sorbitol. Carril 3, células H9C2 transfectadas con MGF tras 24 horas con sorbitol. Carril 4, células H9C2 transfectadas con IGF tras 24 horas con sorbitol. Puede observarse claramente que tiene lugar fragmentación del ADN en las células control que están experimentando apoptosis, mientras que células que sobreexpresan los genes de MGF o L.IGF-I no experimentan apoptosis.

Figura 7: Secuencia de aminoácidos y ADNc de MGF humano, mostrando su estructura de exones.

20 Figura 8: Secuencia de aminoácidos y ADNc de MGF de rata, mostrando su estructura de exones.

Figura 9: Secuencia de aminoácidos y ADNc de MGF de conejo, mostrando su estructura de exones.

Figura 10: Secuencia de aminoácidos y ADNc de L.IGF-I humano, mostrando su estructura de exones.

Figura 11: Secuencia de aminoácidos y ADNc de L-IGFI de rata, mostrando su estructura de exones.

Figura 12: Secuencia de aminoácidos y ADNc de LIGF-I de conejo, mostrando su estructura de exones.

25 Figura 13: Alineación de secuencias, ilustrando la estructura de exones de L-IGF-I y MGF humano, de rata y de conejo, y destacando las similitudes y diferencias.

Figura 14: Miocitos cardiacos infectados con virus de IGF y MGF durante 24 h

A. Localización de MGF en el núcleo. B. Presencia de L-IGF en el núcleo pero también a través del citoplasma.

Figura 15: Miocitos cardiacos infectados con virus con IGF y MGF y contrateñidos con DAPI

30 Parte superior izquierda. Virus con IGF-GFP. Parte superior derecha. Igual con tinción con DAPI. Parte inferior izquierda. Virus con MGF-GFP. Parte inferior derecha. Igual con tinción con DAPI.

Figura 16: Miocitos cardiacos infectados durante 48 h con el virus que expresa GFP control y MGF

35 Se contrateñieron las células con faloidina y DAPI para visualizar los miofilamentos. A. Miocito control más tinción con DAPI. B. Miocito infectado con virus con GFP. C. Miocito infectado con virus con MGF más tinción con DAPI. D. Miocito infectado con virus con MGF.

Figura 17: Análisis de la expresión de filamentos gruesos y finos con RT-PCR tras 48 h de infección viral con MGF en miocitos cardiacos

Los tres paneles superiores: proteínas de filamentos gruesos. Los tres paneles inferiores: proteínas de filamentos finos.

40 Figura 18: Análisis cuantitativo de la expresión de α MHC en miocitos cardiacos tras 48 h de infección viral con MGF.

Figura 19: Porcentaje medio de área de fibra muscular dañada-en regeneración en relación con la sección de músculo completo en dos modelos de daño

A. Porcentaje de área dañada/regenerada en relación con la masa muscular. B. Porcentaje de área teñida con MyHC embrionario. Línea con puntos en forma de rombo: bupivacaína; línea con puntos cuadrados: estiramiento/estimulación.

Figura 20: Niveles de ARNm de las isoformas de MGF e IGF-IEa en dos modelos de daño muscular

- 5 A. Niveles de ARNm de MGF en picogramos por microgramo de ARN total. B. Niveles de ARNm de IGF-IEa en picogramos por microgramo de ARN total. Línea con puntos en forma de rombo: bupivacaína; línea con puntos cuadrados: estiramiento/estimulación.

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos y polinucleótidos de MGF

10 Polipéptidos

Antecedentes

MGF significa factor de crecimiento mecánico (véase McKoy *et al.*, 1999). Tal como se comentó anteriormente, MGF es una variante cortada y empalmada de manera alternativa de IGF-I. IGF-1 de tipo hepático (L.IGF-I) comprende los aminoácidos codificados por los exones 4 y 6 mientras que MGF comprende los aminoácidos codificados por los exones 4, 5 y 6. MGF tiene también un marco de lectura alterado en su extremo carboxilo terminal como resultado de un inserto de 49 (ser humano) o 52 (rata, conejo) pb en el exón 5, y es más pequeño porque no está glicosilado. Chew *et al.* (1995) y Yang *et al.* (1996) no usaron el término MGF, sino en su lugar IGF-I Ec, para definir la variante de corte y empalme 4-5-6. La isoforma muscular que tiene el dominio Ec se conoce ahora como MGF (véase McKoy *et al.*, 1999; documento WO01/136483; documento WO01/85781).

20 *Propiedades estructurales de polipéptidos de MGF de la invención*

En el presente documento, se entiende que un polipéptido de MGF es cualquier polipéptido de IGF-I que tenga la estructura de exones 4-5-6 o que se derive de un polipéptido de IGF-I con la estructura de exones 4-5-6 y una o más de las propiedades funcionales de MGF descritas en el presente documento o ya identificadas por los inventores, por ejemplo como en el documento WO97/33997 y/o el documento WO01/136483 y/o el documento WO01/85781. La estructura de exones de MGF en ser humano, rata y conejo se ilustra en las figuras 7, 8 y 9 (SEQ ID NO. 1/2, 3/4 y 5/6). Para comparación, se facilita la estructura de exones de L.IGF-I de ser humano, rata y conejo en las figuras 10, 11 y 12 (SEQ ID NO. 9/10, 11/12 y 13/14), y se hace una comparación entre MGF y L.IGF-I en la figura 13.

Preferiblemente, los polipéptidos de MGF de la invención tendrán el marco de lectura que, en MGF nativo, se genera mediante el inserto de 49/52 pb mencionado anteriormente. Preferiblemente, los polipéptidos de MGF de la invención no estarán glicosilados. Sin embargo, pueden glicosilarse o glicosilarse parcialmente en algunas realizaciones. Por glicosilación parcial quiere decirse hasta el 10, el 20, el 30, el 50, el 70, el 80, el 90, el 95 o el 99% de tanta glicosilación como L.IGF-I, por ejemplo conteniendo algunos, pero no todos, de los sitios de glicosilación de L.IGF-I. El patrón de glicosilación puede ser igual que el de L.IGF-I en cuanto al tipo y colocación de los azúcares o puede ser diferente.

Preferiblemente, los polipéptidos de MGF de la invención comprenden secuencias codificadas por los exones 3, 4, 5 y 6 o secuencias equivalentes. Opcionalmente, pueden incluir los exones 1 y/o 2, o secuencias equivalentes también. Sin embargo, también pueden ser más cortas, comprendiendo por ejemplo sólo las secuencias codificadas por los exones 5 y 6 o por los exones 4, 5 y 6.

Los polipéptidos de MGF de la invención pueden encontrar sus orígenes en cualquier especie que tenga IGF-I cortado y empalmado en 4-5-6. Por tanto, un polipéptido de MGF de la invención puede tener la secuencia de MGF humano o representar una forma truncada de MGF humano. Tales polipéptidos de MGF humanos se prefieren generalmente. También pueden usarse polipéptidos de MGF que tienen la secuencia de MGF animal, por ejemplo MGF de rata, conejo, ratón, vaca, oveja, cabra, pollo, perro, gato. Preferiblemente, el origen de especie del polipéptido de MGF usado coincidirá con la especie del sujeto que va a tratarse. En particular, se prefiere usar polipéptidos de MGF humanos para tratar pacientes humanos.

Se facilitan a continuación las secuencias de los exones 3, 4, 5 y 6 de MGF humano (IGF-I-Ec) (SEQ ID NO. 1/2, figura 7), MGF de rata (SEQ ID NO. 3/4, figura 8) y MGF de conejo (IGF-I Eb) (SEQ ID NO. 5/6, figura 9), junto con sus secuencias de ADNc correspondientes. Las SEQ ID NO. 1, 3 y 5 son los ADNc; las SEQ ID NO. 2, 4 y 6 son los polipéptidos. Para comparación, se facilitan también las secuencias de los exones 3, 4 y 6 de IGF-I de tipo hepático (L.IGF-I) humano (SEQ ID NO. 9/10, figura 10), de rata (SEQ ID NO. 11/12, figura 11) y de conejo (SEQ ID NO. 13/14, figura 12) (véase la figura 13 en particular para comparación). Pueden usarse polipéptidos que tienen las

secuencias de SEQ ID NO. 2, 4 y 6 en realizaciones preferidas de la invención.

Propiedades funcionales de los polipéptidos de MGF de la invención

En el presente documento, los polipéptidos de MGF pueden tener las propiedades funcionales identificadas por los inventores en el documento WO97/33997. En particular, pueden tener la capacidad para inducir crecimiento de tejido de músculo esquelético. De manera similar, tal como se comenta en el presente documento, pueden tener la capacidad para regular por incremento la síntesis de proteínas necesarias para la reparación del músculo esquelético y/o para activar células satélite (madre) en músculo esquelético. Alternativa o adicionalmente, los polipéptidos de MGF de la invención pueden tener las propiedades neurológicas anteriormente identificadas por los inventores en el documento WO01/136483. Por tanto, pueden tener la capacidad para efectuar el rescate de motoneuronas. En particular, pueden ser capaces de reducir la pérdida de motoneuronas tras avulsión nerviosa en hasta el 20, el 30, el 40, el 50, el 60, el 70, el 80, el 90, el 95, el 99 o el 100% en un sujeto tratado en comparación con una situación equivalente en un sujeto no tratado. Se prefiere la reducción de la pérdida de motoneuronas en el 70% o más, o el 80% o más (es decir, hasta el 30% o menos o el 20% o menos). El grado de rescate puede calcularse usando cualquier técnica adecuada, por ejemplo una técnica conocida tal como estereología. Como prueba específica, pueden usarse las técnicas usadas en el documento WO01/136483, que se basan en la medición del rescate de motoneuronas en respuesta a avulsión del nervio facial en ratas.

Más preferiblemente, un polipéptido de MGF de la invención tendrá la capacidad para prevenir o limitar el daño miocárdico tras isquemia o sobrecarga mecánica previniendo la muerte celular, o apoptosis, de las células musculares del miocardio. Preferiblemente, un polipéptido de MGF de la invención tendrá la capacidad para prevenir completamente la apoptosis en la zona del músculo cardiaco a la que se aplica. Sin embargo, la apoptosis también puede prevenirse sólo parcialmente, es decir, limitarse. Se limita el daño si se logra cualquier reducción del daño en comparación con el que habría tenido lugar sin un tratamiento de la invención, por ejemplo si el daño se reduce en el 1% o más, el 5% o más, el 10% o más, el 20% o más, el 30% o más, el 50% o más, el 70% o más, el 80% o más, el 90% o más, el 95% o más, el 98% o más o el 99% o más, tal como se mide mediante el número o la proporción de células que mueren, o mediante el tamaño de la zona de músculo que pierde la función, o por la capacidad global del corazón para bombear sangre.

En particular, la reducción del daño puede estimarse *in vivo* determinando el gasto cardiaco, la fracción de eyección, etc. usando métodos mínimamente invasivos. Pueden someterse a ensayo también marcadores tales como creatina cinasa y troponina T en el suero. Estos son los parámetros usados en situaciones clínicas para determinar el grado de daño en el músculo cardiaco tras una lesión.

La capacidad para prevenir la apoptosis puede medirse mediante cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, con referencia al ejemplo 4 y las figuras 3 y 6, puede medirse mediante la capacidad para prevenir la apoptosis en una célula de músculo cardiaco o línea celular de tipo cardiaco, tal como se indica mediante la fragmentación del ADN. Esto puede someterse a ensayo, en particular, en una línea celular de tipo cardiaco tal como H9C2 transfectada de manera estable con un vector que expresa el polipéptido de MGF. La capacidad para prevenir la apoptosis, tal como se indica mediante la fragmentación del ADN, puede someterse a ensayo tratando las células con sorbitol u otro agente que ponga las células bajo estrés osmótico durante hasta, por ejemplo 1, 2, 4, 6, 12, 24 ó 48 horas, preferiblemente de 12 a 24 horas, más preferiblemente 24 horas, e investigando si puede observarse el patrón de fragmentación asociado con la apoptosis. Un polipéptido de MGF de la invención expresado de este modo normalmente reducirá, preferiblemente eliminará, la fragmentación del ADN en estas condiciones, en comparación con condiciones sin transfección o de transfección simulada (vector pero no secuencia codificante de MGF) tras 6, 12 ó 24 horas de tratamiento con sorbitol.

La ausencia de expresión, o baja expresión, de genes que actúan como marcadores para la apoptosis también puede actuar como una indicación de la prevención de la apoptosis. Un marcador adecuado es el gen Bax. De manera similar, el aumento de la expresión de marcadores anti-apoptóticos en células transfectadas con MGF en condiciones apoptóticas puede considerarse como un signo de que el polipéptido de la invención está previniendo la apoptosis. Un gen marcador anti-apoptótico adecuado es Bcl2.

La capacidad para prevenir la apoptosis también puede medirse mediante referencia a la capacidad de un polipéptido de MGF para prevenir una reducción en el número de células en células de miocitos *in vitro*. Por ejemplo, pueden transfectarse las células con un vector que codifica para el polipéptido de MGF, de manera que se sobreexpresa. Entonces, pueden compararse los recuentos celulares de cultivos control y transfectados con MGF a lo largo del tiempo en condiciones apoptóticas. Preferiblemente, las células morirán menos rápidamente en los cultivos transfectados con MGF, dejando una mayor proporción de los números de células originales en estos cultivos tras, por ejemplo 24, 48 ó 72 horas. Por ejemplo, hasta el 5% o más, el 10% o más, el 20% o más o el 50% o más de las células pueden permanecer en los cultivos transfectados con MGF tras 24, 48 ó 72 horas que en los cultivos control.

Otra propiedad preferida de los polipéptidos de MGF de la invención es la capacidad para inducir un fenotipo

hipertrófico en células de músculo cardiaco. En particular, esto puede someterse a prueba evaluando la capacidad para inducir un fenotipo hipertrófico en cultivos de miocitos cardiacos primarios *in vitro*. Por ejemplo, tales cultivos pueden transfectarse con un vector, por ejemplo un plásmido, que codifica para el polipéptido de MGF de manera que el polipéptido de la invención se sobreexpresa, y se determina la capacidad para inducir el fenotipo hipertrófico.

5 Un método preferido para determinar esto es someter a prueba para detectar un aumento en la expresión de ANF (factor natriurético auricular) y/o bMHC (cadena pesada de beta miosina). ANF es un gen marcador embrionario que se regula por incremento en condiciones hipertróficas. bMHC es una proteína contráctil importante en músculo.

10 Se prefieren polipéptidos de MGF que tienen la secuencia de MGF que se producen de manera natural. Sin embargo, también pueden usarse MGF variantes que tienen las mismas propiedades y estructura de exones de 4-5-6 básica.

Secuencia de polinucleótidos de la invención

Los polipéptidos de la invención pueden codificarse por polinucleótidos descritos a continuación.

En particular, un polipéptido de la invención puede comprender:

(a) la secuencia de MGF humano (SEQ ID NO:2), MGF de rata (SEQ ID NO:4) o MGF de conejo (SEQ ID NO:6);

15 (b) una secuencia que tiene el 80% o más de identidad de aminoácidos con una secuencia de (a); o

(c) una secuencia que comprende los aminoácidos codificados por los exones 5 y 6, los exones 4, 5 y 6 o los exones 3, 4, 5 y 6 de ADN de MGF humano, de rata o de conejo de SEQ ID NO: 1, 3 ó 5.

Variantes alélicas

20 Una variante alélica será una variante que se produce de manera natural y que funcionará de una manera sustancialmente similar a la proteína de SEQ ID NO. 2, 4 ó 6 tal como se definió anteriormente. De manera similar, un homólogo de especie de la proteína será la proteína equivalente que se produce de manera natural en otra especie. Un homólogo de este tipo puede producirse en cualquier especie, preferiblemente una especie de mamífero, por ejemplo una especie bovina, equina, ovina, felina o canina; tal como vaca, caballo, oveja o cabra, gato o perro; o en una especie de roedor distinta de rata (SEQ ID NO. 4) o conejo (SEQ ID NO. 6), o en una especie de primate distinta de ser humano (SEQ ID NO. 2). MGF que no son de mamífero, por ejemplo MGF aviares o de peces, por ejemplo MGF de pollo, son también MGF de la invención. Dentro de una especie cualquiera, un homólogo puede existir como varias variantes alélicas, y éstas se considerarán todas homólogos de la proteína de SEQ ID NO. 2, 4 ó 6.

30 Pueden obtenerse variantes alélicas y homólogos de especie mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo estudiando con sonda una fuente de células adecuada con una sonda derivada de SEQ ID NO. 1, 3 ó 5. Pueden manipularse los clones obtenidos mediante técnicas convencionales para generar un polipéptido de la invención que puede producirse mediante técnicas recombinantes o sintéticas conocidas *per se*.

Homólogos

35 Un polipéptido de la invención es preferiblemente al menos el 70% homólogo a la proteína de SEQ ID NO. 2, 4 ó 6, más preferiblemente al menos el 80 o el 90% y más preferiblemente todavía al menos el 95, el 97 o el 99% homólogo a la misma a lo largo de una región de al menos 20, preferiblemente al menos 30, por ejemplo al menos 40, 60 ó 100 o más aminoácidos contiguos. Se conocen bien en la técnica métodos de medición de la homología de proteína y los expertos en la técnica entenderán que en el presente contexto la homología se calcula basándose en la identidad de aminoácidos (denominada algunas veces "homología dura").

40 Los grados de homología pueden medirse mediante métodos bien conocidos, tal como se comenta en el presente documento para secuencias de polinucleótidos.

La secuencia de los polipéptidos de SEQ ID NO. 2, 4 y 6 y de las variantes alélicas y los homólogos de especie pueden modificarse para proporcionar polipéptidos adicionales de la invención.

Sustituciones

45 Pueden hacerse sustituciones de aminoácidos, por ejemplo desde 1, 2 ó 3 hasta 10, 20 ó 30 sustituciones. Por ejemplo, pueden sustituirse un total de hasta 1, 2, 5, 10 ó 20 aminoácidos a lo largo de una longitud de 50, 100 ó 200 aminoácidos en los polipéptidos. Por ejemplo, hasta 20 aminoácidos sustituidos a lo largo de cualquier longitud

de 50 aminoácidos. El polipéptido modificado conserva generalmente una o más de las propiedades funcionales de MGF, tal como se define en el presente documento. Pueden hacerse sustituciones conservativas, por ejemplo según la siguiente tabla. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente en la misma línea la tercera columna pueden sustituirse entre sí.

ALIFÁTICO	No polar	G A P
		I L V
	Polar-no cargado	C S T M
		N Q
	Polar-cargado	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

5

Fragmentos

Los polipéptidos de la invención también incluyen fragmentos de los polipéptidos de longitud completa mencionados anteriormente y variantes de los mismos, incluyendo fragmentos de la secuencia expuesta en SEQ ID NO. 2, 4 y 6.

10 Los fragmentos adecuados tendrán generalmente al menos aproximadamente 20, por ejemplo al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100 aminoácidos de tamaño. Los fragmentos de polipéptido de los polipéptidos de SEQ ID NO. 2, 4 y 6 y variantes alélicas y de especie de los mismos pueden contener una o más (por ejemplo 2, 3, 5, de 5 a 10 o más) sustituciones, deleciones o inserciones, incluyendo sustituciones conservativas. Cada sustitución, inserción o deleción puede ser de cualquier longitud, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, de 5 a 10 o de 10 a 20 aminoácidos de longitud.

15 En particular, los fragmentos de la invención pueden comprender los aminoácidos codificados por los exones 5 y 6 ó 4, 5 y 6 de ADN humano, de rata o de conejo de SEQ ID NO. 1, 3 ó 5. El primer aminoácido del exón 4, Asn, está codificado parcialmente por el exón 3 (1 nucleótido) y parcialmente por el exón 4 (2 nucleótidos). Se prefiere que dicho primer aminoácido esté presente, en un fragmento de la invención.

Secuencias quiméricas

20 Pueden usarse polipéptidos de MGF codificados por secuencias de polinucleótido quiméricas de la invención (véase a continuación).

Aislamiento, purificación y modificación

25 Los polipéptidos de la invención pueden estar en una forma sustancialmente aislada. Se entenderá que el polipéptido puede mezclarse con portadores o diluyentes que no interfieren con el fin previsto del polipéptido y todavía considerarse como sustancialmente aislado. Un polipéptido de la invención también puede estar en una forma sustancialmente purificada, en cuyo caso comprenderá generalmente el polipéptido en una preparación en la que más del 70%, por ejemplo más del 80, el 90, el 95, el 98 o el 99% del polipéptido en la preparación es un polipéptido de la invención.

30 Los polipéptidos de la invención pueden proporcionarse en una forma tal que están fuera de su entorno celular natural. Por tanto, pueden estar sustancialmente aislados o purificados, tal como se comentó anteriormente, o en una célula en la que no se producen en la naturaleza, por ejemplo una célula de otra especie vegetal, animales, levaduras o bacterias.

Los polipéptidos de la invención pueden modificarse por ejemplo mediante la adición de residuos de histidina o una etiqueta de T7 para ayudar a su identificación o purificación o mediante la adición de una secuencia señal para promover su secreción a partir de una célula.

35 Un polipéptido de la invención puede marcarse con un marcador de revelado. El marcador de revelado puede ser cualquier marcador adecuado que permita que el polipéptido se detecte. Los marcadores adecuados incluyen

radioisótopos, por ejemplo ¹²⁵I, ³⁵S, enzimas, antibióticos, polinucleótidos y ligadores tales como biotina.

5 Los polipéptidos de la invención pueden modificarse químicamente, por ejemplo modificarse postraduccionalmente. Por ejemplo, pueden comprender residuos de aminoácido modificados. También pueden estar glicosilados (véase anteriormente), aunque MGF no está glicosilado de manera natural. Se entenderá que tales polipéptidos modificados son polipéptidos de la invención.

Los efectos de las modificaciones en la secuencia de MGF pueden someterse a prueba mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, las propiedades de unión y/o la estabilidad de MGF variantes puede someterse a prueba comparándolas *in vitro* o *in vivo* con las de MGF no modificado.

Polinucleótidos

10 Los polinucleótidos de la invención codifican para polipéptidos de la invención.

Los polinucleótidos preferidos de la invención comprenden una secuencia codificante que codifica para un polipéptido que tiene una o más de las propiedades funcionales de MGF, tal como se define en el presente documento, secuencia codificante que se selecciona de:

(a) la secuencia codificante de una cualquiera de SEQ ID NO. 1, 3 ó 5;

15 (b) la secuencia codificante de los exones 5 y 6, 4, 5 y 6 o los exones 3, 4, 5 y 6 de una cualquiera de SEQ ID NO. 1, 3 ó 5

(c) una secuencia que puede hibridarse selectivamente con una secuencia de (a) o (b), o con una secuencia complementaria a una secuencia de (a) o (b);

(d) una secuencia que tiene el 70% o más de homología con una secuencia de (a) o (b);

20 (e) una secuencia que es un fragmento de la secuencia de una cualquiera de (a) a (d); y

(f) una secuencia que difiere de la de una cualquiera de (a) a (d) pero que, debido a la degeneración del código genético, codifica para el mismo polipéptido.

25 Por tanto, la invención proporciona polinucleótidos que comprenden la secuencia codificante mostrada en una cualquiera de SEQ ID NO. 1, 3 ó 5 y variantes de la misma con secuencias relacionadas. Los polinucleótidos de la invención pueden usarse para preparar vectores de la invención.

SEQ ID NO. 1, 3 y 5

Los polinucleótidos preferidos de la invención comprenden las secuencias codificantes mostradas en SEQ ID NO. 1, 3 y 5.

Secuencias hibridables

30 Un polinucleótido de la invención puede hibridarse selectivamente con la secuencia codificante de SEQ ID NO. 1, 3 ó 5 a un nivel significativamente por encima del fondo. Puede producirse hibridación de fondo, por ejemplo, debido a otros ADNc presentes en una biblioteca de ADNc. El nivel de señal generada por la interacción entre un polinucleótido de la invención y la secuencia codificante de SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9 ó 11 es normalmente al menos 10 veces, preferiblemente al menos 100 veces, tan intensa como las interacciones entre otros polinucleótidos y la secuencia codificante de SEQ ID NO. 1, 3 ó 5. La intensidad de la interacción puede medirse, por ejemplo mediante radiomarcaje de la sonda, por ejemplo con ³²P. Se logra normalmente una hibridación selectiva usando condiciones de media a alta rigurosidad (por ejemplo cloruro de sodio 0,03 M y citrato de sodio 0,03 M a desde aproximadamente 50°C hasta aproximadamente 60°C, por ejemplo de 45 a 50, de 50 a 55 o de 55 a 60°C, por ejemplo a 50 ó 60°C.

40 Sin embargo, tal hibridación puede llevarse a cabo en cualesquiera condiciones adecuadas conocidas en la técnica (véase Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*). Por ejemplo, si se requiere alta rigurosidad, las condiciones adecuadas incluyen 0,2 x SSC a aproximadamente 60°C, por ejemplo de 40 a 50°C, de 50 a 60°C o de 60 a 70°C, por ejemplo a 50 ó 60°C. Si se requiere rigurosidad inferior, las condiciones adecuadas incluyen 2 x SSC a aproximadamente 60°C, por ejemplo de 40 a 50°C, de 50 a 60°C o de 60 a 70°C, por ejemplo a 50 ó 60°C.

45 La rigurosidad se produce normalmente en un intervalo de desde aproximadamente Tm-5°C (5°C por debajo de la temperatura de fusión (Tm) de las dos secuencias que se hibridan entre sí en un dúplex) hasta de aproximadamente

20°C a 25°C por debajo de la T_m. Por tanto, según la invención, una secuencia hibridable puede ser una que se hibrida con SEQ ID NO. 1, 3 ó 5 a una temperatura de desde T_m hasta T_m-25°C, por ejemplo de T_m a T_m-5°C, de T_m-5 a T_m-10°C, de T_m-10 a T_m-20°C o de T_m-20 a T_m-25°C.

Secuencias homólogas

- 5 Una secuencia de polinucleótido de la invención comprenderá una secuencia codificante al menos el 70%, preferiblemente al menos el 80 o el 90% y más preferiblemente al menos el 95, el 98 o el 99% homóloga a la secuencia codificante de SEQ ID NO. 1, 3 ó 5.

Tal homología se aplicará preferiblemente a lo largo de una región de al menos 20, preferiblemente al menos 50, por ejemplo de 100 a 500 o más nucleótidos contiguos.

- 10 Se conocen bien en la técnica métodos de medición de la homología de ácidos nucleicos y polipéptidos. Estos métodos pueden aplicarse a la medición de la homología tanto para polipéptidos como para ácidos nucleicos de la invención. Por ejemplo, el UWGCG Package proporciona el programa BEST-FIT que puede usarse para calcular la homología (Devereux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Research* 12, p. 387-395).

- 15 De manera similar, pueden usarse los algoritmos PILEUP y BLAST para alinear secuencias (por ejemplo tal como se describe en Altschul, S.F., 1993, *J. Mol. Evol.* 30:290-300; Altschul, S.F. *et al.*, 1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410).

Son posibles muchos parámetros diferentes para tales programas. Según la invención, pueden usarse los parámetros por defecto.

- 20 En más detalle, el algoritmo BLAST es adecuado para determinar la similitud de secuencias y se describe en Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410. El software para realizar los análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar en primer lugar un par de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que o bien coinciden o bien satisfacen alguna puntuación umbral T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en la secuencia de la base de datos. T se denomina umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul *et al.*, citado anteriormente). Estos aciertos de palabra vecina inicial actúan como semilla para iniciar búsquedas para encontrar HSP que las contienen. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia durante tanto como pueda aumentarse la puntuación de alineación acumulativa. Las extensiones para los aciertos de palabras en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineación acumulativa cae en la cantidad X desde su valor logrado máximo; la puntuación acumulativa llega a cero o inferior, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-10919), alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4 y una comparación de ambas hebras

- 35 El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; véase por ejemplo Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Sci. USA* 90: 5873-5787. Una medición de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que puede producirse una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a un ADNc o gen fusionado si la probabilidad de suma más pequeña en la comparación del ácido nucleico de prueba con un ácido nucleico fusionado es inferior a aproximadamente 1, preferiblemente inferior a aproximadamente 0,1, más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,01 y lo más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,001.

Fragmentos

- 45 También se incluyen dentro del alcance de la invención secuencias que son fragmentos de las secuencias de (a) a (d) anteriores pero que codifican para polipéptidos de MGF que tienen las propiedades comentadas en el presente documento.

En particular, los fragmentos pueden comprender los exones 5 y 6 ó 4, 5 y 6 o los exones 3, 4, 5 y 6 de ADN de MGF humano, de rata o de conejo de SEQ ID NO. 1, 3 ó 5.

- 50 El primer aminoácido del exón 4, Asn, está codificado parcialmente por el exón 3 y parcialmente por el exón 4. Se prefiere que estén presentes las bases codificantes necesarias a partir del exón 3 para codificar para dicho primer aminoácido, Asn.

Secuencias degeneradas

También se incluyen dentro del alcance de la invención secuencias que difieren de las de (a) a (e) pero que, debido a la degeneración del código genético, codifican para los mismos polipéptidos protectores. Por ejemplo, la invención proporciona variantes degeneradas de la secuencia de SEQ ID NO. 1, 3 y 5 que también codifican para el polipéptido de SEQ ID NO. 2, 4 y 6.

5 *Secuencias complementarias*

Además, la invención proporciona polinucleótidos que tienen secuencias complementarias a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente.

Secuencias quiméricas

10 También pueden usarse secuencias quiméricas que comprenden exones de más de una especie. Por ejemplo, uno o más de los exones 3 a 6 pueden derivarse de ser humano y uno o más de rata y/o conejo.

Propiedades adicionales

15 Las secuencias nucleicas de la invención pueden ser de cualquier longitud siempre que codifiquen para un polipéptido de la invención. Una secuencia de ácido nucleico según la invención puede ser un fragmento contiguo de la secuencia de SEQ ID NO. 1, 3 ó 5 o una secuencia que está relacionada con la misma de uno cualquiera de los modos descritos anteriormente. Alternativamente, los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender secuencias de ADN que no son contiguas en la secuencia de SEQ ID NO. 1, 3 ó 5. Estas secuencias pueden ser fragmentos de la secuencia de SEQ ID NO. 1, 3 ó 5 o secuencias de ácido nucleico que están relacionadas con tales fragmentos de cualquiera de los modos descritos anteriormente. Las secuencias de ácido nucleico de la invención comprenderán preferiblemente al menos 50 bases o pares de bases, por ejemplo de 50 a 100, de 100 a 200, de 500 a 1000 o de 1000 a 2000 bases o pares de bases.

20 Puede usarse cualquier combinación de los grados de homología y tamaños mínimos mencionados anteriormente para definir los polinucleótidos de la invención, prefiriéndose las combinaciones más rigurosas (por ejemplo homología superior a lo largo de longitudes mayores y/o hibridación en condiciones más rigurosas). Por tanto, por ejemplo un polinucleótido que es al menos el 90% homólogo a lo largo de 100 nucleótidos forma un aspecto de la invención, como también un polinucleótido que es al menos el 95% homólogo a lo largo de 100 ó 200 nucleótidos.

25 Los polinucleótidos de la invención pueden comprender ADN o ARN. También pueden ser polinucleótidos que incluyen dentro de los mismos nucleótidos sintéticos o modificados. Se conocen en la técnica varios tipos diferentes de modificación en polinucleótidos. Las modificaciones, por ejemplo, pueden potenciar la resistencia a nucleasas y/o potenciar la capacidad para entrar en células. Por ejemplo, pueden usarse oligonucleótidos de fosforotioato. Otros análogos de desoxinucleótidos incluyen metilfosfonatos, fosforoamidatos, fosforoditioatos, N3'P5'-fosforamidatos y fosforotioatos de oligorribonucleótidos y sus análogos de 2'-O-alkilo y metilfosfonatos de 2'-O-metilribonucleótido. Una posible modificación adicional es la adición de cadenas de polilisina o acridina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula.

35 Alternativamente, pueden usarse oligonucleótidos de cadena principal mixta (MBO). Los MBO contienen segmentos de oligodesoxinucleótidos de fosfotioato y segmentos colocados apropiadamente de oligodesoxi u oligorribonucleótidos modificados. Los MBO tienen segmentos de enlaces fosforotioato y otros segmentos de otros oligonucleótidos modificados, tales como metilfosfonato, que es no iónico y muy resistente a nucleasas o 2'-O-alkiloligorribonucleótidos. Para los fines de la presente invención, debe entenderse que los polinucleótidos descritos en el presente documento pueden modificarse mediante cualquier método disponible en la técnica. Tales modificaciones pueden llevarse a cabo con el fin de potenciar el tiempo de vida o actividad *in vivo* de los polinucleótidos de la invención. Los polinucleótidos de la invención pueden usarse para producir un cebador, por ejemplo un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, por ejemplo marcada con un marcador de revelado por medios convencionales usando marcadores radiactivos o no radiactivos, o los polinucleótidos pueden clonarse en vectores. Tales cebadores, sondas y otros fragmentos tendrán preferiblemente al menos 10, preferiblemente al menos 15 ó 20, por ejemplo al menos 25, 30 ó 40 nucleótidos de longitud. Estos serán útiles en la identificación de homólogos de especie y variantes alélicas tal como se comentó anteriormente.

40 Pueden producirse polinucleótidos tales como cebadores y polinucleótidos de ADN según la invención de manera recombinante, sintética o mediante cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. Pueden clonarse también mediante técnicas convencionales. Los polinucleótidos se proporcionan normalmente en forma aislada y/o purificada.

50 En general, se producirán cebadores por medios sintéticos, que implican una fabricación por etapas de la secuencia de ácido nucleico un nucleótido cada vez. Las técnicas para lograr esto usando técnicas automatizadas están

fácilmente disponibles en la técnica.

Clones genómicos correspondientes a los ADNc de SEQ ID NO. 1, 3 y 5 que contienen por ejemplo intrones y regiones promotoras son también aspectos de la invención y pueden producirse también usando medios recombinantes, por ejemplo usando técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

5 El patrón de exones 4-5-6 de MGF es característico de los polinucleótidos de la invención. Puede usarse cualquier método adecuado para garantizar que se refleja este patrón en la secuencia codificante, y por tanto en el polipéptido codificado. Por ejemplo, pueden usarse secuencias de ADNc que carecen de intrones y señales de corte y empalme y que incluyen las secuencias codificantes de los exones 4, 5 y 6. Alternativamente, puede usarse ADN genómico si se corta y empalma correctamente en la situación en cuestión.

10 Aunque en general las técnicas mencionadas en el presente documento se conocen bien en la técnica, puede hacerse referencia en particular a Sambrook *et al.* (1959), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.

Pueden obtenerse de varios modos polinucleótidos que no son el 100% homólogos a las secuencias de la presente invención pero que se encuentran dentro del alcance de la invención, tal como se describió anteriormente, por ejemplo estudiando con sonda ADNc o bibliotecas genómicas de otras especies vegetales con sondas derivadas de SEQ ID NO. 1, 3 ó 5. Pueden prepararse sondas degeneradas por medios conocidos en la técnica para tener en cuenta la posibilidad de variación degenerada entre las secuencias de ADN de SEQ ID NO. 1, 3 ó 5 y las secuencias que están estudiándose con sonda en condiciones de media a alta rigurosidad (por ejemplo cloruro de sodio 0,03 M y citrato de sodio 0,03 M a desde aproximadamente 50°C hasta aproximadamente 60°C), u otras condiciones adecuadas (por ejemplo tal como se describió anteriormente).

20 También pueden obtenerse variantes alélicas y homólogos de especie usando PCR degenerada que usará cebadores diseñados para seleccionar como diana secuencias dentro de las variantes y los homólogos que codifican para secuencias de aminoácidos probablemente conservadas. Las secuencias probablemente conservadas pueden predecirse a partir de la alineación de secuencias de aminoácidos de la invención (SEQ ID NO. 2, 4 ó 6) entre sí y/o con las de cualquier secuencia homóloga conocida en la técnica. Los cebadores contendrán una o más posiciones degeneradas y se usarán en condiciones de rigurosidad inferior a las usadas para secuencias de clonación con cebadores de secuencia única contra secuencias conocidas.

30 Alternativamente, tales polinucleótidos pueden obtenerse mediante mutagénesis dirigida al sitio de secuencias de SEQ ID NO. 1, 3 ó 5 o variantes alélicas de las mismas. Esto puede ser útil cuando se requieren por ejemplo cambios de codones silenciosos en las secuencias para optimizar las preferencias de codones para una célula huésped particular en la que están expresándose las secuencias de polinucleótidos. Pueden desearse otras secuencias con el fin de introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, o para alterar las propiedades o la función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

La invención proporciona además polinucleótidos bicatenarios que comprenden un polinucleótido de la invención y su complemento.

35 Los polinucleótidos, las sondas o los cebadores de la invención pueden portar un marcador de revelado. Los marcadores adecuados incluyen radioisótopos tales como ³²P o ³⁵S, marcadores enzimáticos u otros marcadores proteicos tales como biotina. Tales marcadores pueden añadirse a polinucleótidos, sondas o cebadores de la invención y pueden detectarse usando técnicas conocidas *per se*.

Tratamientos de la invención

40 *Isquemia y sobrecarga mecánica*

Un objeto de la invención es prevenir o limitar el daño miocárdico en respuesta a un ataque al corazón previniendo o limitando la apoptosis en el miocardio usando un polipéptido o polinucleótido de MGF de la invención, o ambos. Un ataque al corazón puede implicar isquemia o sobrecarga mecánica. Se produce isquemia cuando una arteria que suministra sangre oxigenada a un músculo u otro órgano se obstruye. Esto disminuye la capacidad del órgano afectado para funcionar y puede implicar muerte celular en la zona cuyo suministro de sangre se reduce. En el corazón, la isquemia puede resultar de una obstrucción de las arterias coronarias. Esto conduce a que los cardiomiocitos en determinadas zonas se vean privados de sangre y por tanto de oxígeno. Entonces comienzan a morir. Esto significa un aumento de la tensión mecánica sobre los cardiomiocitos supervivientes en la zona que resulta físicamente dañada, a menos que experimenten hipertrofia y adaptación. Por tanto, se produce muerte celular como resultado tanto de la privación de oxígeno como de la tensión mecánica excesiva. La región de muerte celular, o necrosis, se conoce como infarto. Sobrecarga significa estiramiento de la parte lesionada del miocardio por el retorno venoso así como el aumento de la fuerza contráctil requerida por la disminución del número de cardiomiocitos. Si las células del músculo cardíaco padecen un sobreestiramiento, esto da como resultado que los

filamentos de actina y miosina se alarguen hasta el punto en el que ya no se solapan más y los sarcómeros (las unidades generadoras de fuerza) se rompen.

Administración de los polipéptidos de MGF a sujetos

El polipéptido de MGF se administra en respuesta a un ataque al corazón.

5 Los polipéptidos de MGF pueden administrarse a sujetos que necesitan tal tratamiento mediante cualquier método adecuado. Generalmente, los polipéptidos de MGF se administrarán por vía intravenosa ya que éste es un método de administración seguro y fiable. En circunstancias clínicas apropiadas (por ejemplo en unidades cardíacas especializadas), también puede ser posible la administración directa al corazón, por ejemplo usando un denominado sistema de inyección "sin aguja" (por ejemplo proporcionado por Powderject) para administrar el polipéptido al corazón.

10 De manera deseable, el polipéptido de MGF se administrará tan rápidamente como sea posible tras el ataque al corazón, por ejemplo tan pronto como se haya diagnosticado un ataque al corazón resultante de la isquemia. Preferiblemente, se administrará en el plazo de 5, 10, 15, 30 ó 60 minutos, o en el plazo de 2 ó 5 horas. También puede efectuarse tratamiento a largo plazo mediante la readministración del polipéptido, aunque se prefiere la administración de un polinucleótido que codifica para MGF para ese fin (véase a continuación).

15 Los tratamientos de la invención serán particularmente eficaces para ayudar a los padecen un ataque al corazón a que logren una buena recuperación; y a volver a un estilo de vida normal, activo.

Producción de polipéptidos de MGF

20 Los polipéptidos de MGF pueden producirse de cualquier manera adecuada. En algunas realizaciones, pueden extraerse de tejidos animales. Sin embargo, se prefiere que se produzcan de manera recombinante. Esto puede hacerse usando técnicas conocidas.

Uso de polinucleótidos de MGF además de polipéptidos de MGF

25 En situaciones en las que se desea administración tanto a corto plazo como a largo plazo, puede administrarse un polinucleótido que codifica para un polipéptido de MGF de la invención así como el polipéptido de MGF. Puede administrarse el polinucleótido que codifica para MGF simultáneamente con el polipéptido o por separado. Puede administrarse en la misma formulación farmacéutica o en una diferente y mediante la misma vía de administración o una diferente. MGF tiene una semivida corta y la expresión *in vivo* de MGF facilita la localización y evita la necesidad de inyección repetida para efectuar la terapia a largo plazo. Se prefiere la administración intramuscular para polinucleótidos de la invención, especialmente plásmidos y otros ácidos nucleicos desnudos.

30 *Vectores para la administración de polinucleótidos*

Los polinucleótidos de la invención pueden administrarse de cualquier manera conocida. En particular, se administrarán generalmente mediante un vector. Puede usarse cualquier vector adecuado.

35 El polinucleótido puede administrarse en una forma "desnuda" (por ejemplo en un vector de plásmido), opcionalmente asociado con un agente que ayuda en su penetración, tal como se comenta a continuación. Alternativamente, el vector puede ser uno que encapsula el ácido nucleico, por ejemplo un virus. El vector puede ser, por ejemplo, un vector de plásmido o cósmido, u otro tipo de vector.

40 El vector puede ser un vector viral, tal como un vector que comprende un virus que puede infectar las células del sujeto receptor. Por tanto, el vector puede ser, o puede derivarse de cualquier virus adecuado, por ejemplo un vector de alfavirus, adenovirus, virus adenoasociado, baculovirus, virus vaccinia, virus del herpes, virus del herpes simple, retrovirus (por ejemplo lentivirus) o baculovirus. Un vector de virus estará desactivado, en el sentido de que normalmente no podrá replicarse o provocar efectos patológicos del mismo modo que en virus intactos. Normalmente estará atenuado, por ejemplo será de replicación defectuosa.

45 Especialmente cuando se administra en una forma "desnuda", por ejemplo como un plásmido, el polinucleótido puede estar asociado con un agente para ayudar en la penetración en las células. Los ejemplos incluyen agentes catiónicos (por ejemplo lípidos catiónicos), polilisina, lípidos y agentes de precipitación (por ejemplo una sal de calcio). Tales agentes ayudan generalmente al paso del polinucleótido a través de la membrana celular. El polinucleótido puede estar en forma de liposomas o partículas, por ejemplo en asociación con cualquiera de los agentes de penetración mencionados anteriormente. El polinucleótido puede estar en asociación con un agente que provoca que el polinucleótido adopte una forma más compacta, tal como una histona. El polinucleótido puede estar en asociación con espermidina.

50

De manera similar, pueden usarse liposomas para ayudar a transportar polinucleótidos de la invención al interior de células.

5 El polinucleótido puede estar asociado con un portador que puede usarse para administrar el polinucleótido al interior de la célula, o incluso al núcleo, usando técnicas biolísticas. Un portador de este tipo puede ser una partícula de metal, tal como una partícula de oro o tungsteno.

El polinucleótido puede expresarse normalmente en una célula del receptor. Por tanto, el polinucleótido también comprende normalmente secuencias de control que están operativamente unidas a la secuencia que codifica para MGF de la invención, pudiendo expresar dichas secuencias de control la secuencia codificante en las células del receptor, por ejemplo tras la integración del polinucleótido en el genoma de la célula.

10 Las secuencias de control comprenden normalmente un promotor (generalmente en 5' con respecto a la secuencia codificante) y/o una secuencia terminadora y/o de iniciación de la transcripción (por ejemplo GCCACCATGG (SEQ ID NO. 7) o GCCCCCATGG (SEQ ID NO. 8)) y/o un codón de terminación de la traducción (por ejemplo TAA, TAG o TGA) y/o una señal de poliadenilación y/o una o más secuencias potenciadoras y/o un sitio de pausa de ARN. Las secuencias de control pueden potenciar la transcripción o traducción del polinucleótido. Las secuencias de control
15 pueden ser específicas de tejido de modo que el polinucleótido se expresa sólo en determinados tejidos, o pueden ser las secuencias de control de un gen expresado de manera constitutiva. Se prefieren particularmente promotores y potenciadores específicos de músculo. Las secuencias de control son normalmente las de cualquiera de los eucariotas mencionados en el presente documento o de un virus que infecta a un eucariota, por ejemplo de la especie del receptor, tal como un virus humano para un receptor humano. El polinucleótido puede comprender un
20 origen de replicación.

El promotor puede ser, por ejemplo (en particular para su expresión en células de mamífero), un promotor del gen de metalotioneína, promotor de antígeno T grande de SV40, promotor de CMV o adenoviral.

25 En lo que respecta a la expresión específica de tejido, se prefieren particularmente elementos de control específicos de músculo, tales como promotores y potenciadores específicos de músculo, especialmente cuando el ácido nucleico va a administrarse por vía intramuscular, por ejemplo en forma de plásmido. Tales elementos pueden derivarse de, por ejemplo, genes de miosina. Por ejemplo, pueden usarse promotores de la cadena pesada o la cadena ligera de la miosina, como también potenciadores de la cadena pesada o la cadena ligera de la miosina.

30 Se han identificado hasta la fecha varios promotores y potenciadores de miosina a partir de genes tanto de la cadena ligera de miosina como la cadena pesada de miosina. Preferiblemente, el promotor y/o potenciador de miosina usado es de origen vertebrado, más preferiblemente de origen aviar, de peces o de mamíferos.

Se prefiere un potenciador de cadena ligera de miosina. Se prefiere especialmente un potenciador de cadena ligera de miosina de rata 1/3 (Donoghue *et al.* (1988) Genes Dev. 2:1779-1790; Neville *et al.* (1996) Dev. Genetics 19:157-162). El potenciador está operativamente unido al promotor. El potenciador puede estar o bien en el sentido de 5' o bien en el sentido de 3' del promotor. El potenciador puede usarse en cualquier orientación.

35 Se prefiere un promotor de cadena pesada de miosina. Un promotor de cadena pesada de miosina particularmente preferido es un promotor de cadena pesada de β -miosina cardiaca de conejo truncada, en particular hasta e incluyendo 789 pares de bases en el sentido de 5' del sitio de inicio de la transcripción. Otro promotor de cadena pesada de miosina conocido es el promotor FG2 de carpa, en particular hasta e incluyendo 901 pares de bases en el sentido de 5' del sitio de inicio de la transcripción (Gauvry *et al.* (1996) Eur. J. Biochem. 236:887-894). Se facilitan
40 detalles adicionales de promotores de cadena pesada de miosina derivados de genes de cadena pesada de miosina de rata, conejo, ser humano, porcino y pollo en Gauvry *et al.* (1996) y referencias en el mismo. Todos estos promotores pueden usarse en la presente invención.

Sin embargo, puede usarse cualquier elemento regulador adecuado, y los mencionados anteriormente son simplemente a modo de ejemplo.

45 En este contexto, y si resulta apropiado para el estado global del paciente, la introducción de MGF de la invención puede vincularse con actividad física. Puesto que los músculos responden al ejercicio y la miosina es la proteína más abundante en el músculo, los elementos reguladores promotores/potenciadores de miosina quieren decir que la expresión del ADNc se regulará por incremento con el aumento de la actividad muscular.

50 Vectores de plásmido y vectores de plásmido desactivados son realizaciones preferidas. Se prefieren particularmente vectores de plásmido, especialmente para administración intramuscular dirigida a conseguir la expresión local en el músculo.

El vector puede diseñarse para su integración estable en el genoma de las células del receptor. Alternativamente,

5 puede diseñarse para que sea no integrativo. En la introducción estable, el polinucleótido se integra en el genoma de la célula (es decir, se dispone contiguo con el genoma). Por tanto, el polinucleótido puede comprender también una secuencia que potencia la integración del polinucleótido tal como los sitios loxP del sistema de recombinación Cre del bacteriófago P1, los sitios FRT del sistema de recombinación FLP de levaduras o las secuencias de repeticiones terminales de virus adenoasociado (VAA). La integración puede potenciarse mediante otros factores que están presentes, tal como Cre derivado del bacteriófago P1, recombinasa FLP derivada de levaduras, proteínas Rep de VAA, recombinasas Cre o FLP o proteínas Rec bacterianas. En una realización, el polinucleótido de la invención puede expresar un factor de este tipo.

10 El polinucleótido puede ser uno que se integra aleatoriamente (tal como de una manera no específica de secuencia) en cualquier posición en el genoma o uno que se integra preferentemente en sitios particulares del genoma. Generalmente, estarán presentes en el genoma tras la integración la secuencia codificante completa del polinucleótido y las secuencias de control.

Formulaciones y composiciones farmacéuticas

15 Los polipéptidos y polinucleótidos de la invención se administran preferiblemente en forma de una formulación farmacéutica que comprende un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Puede usarse cualquier formulación farmacéutica adecuada.

20 Por ejemplo, las formulaciones adecuadas pueden incluir disoluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, antibióticos bactericidas y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con los fluidos corporales del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis. Por ejemplo, ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en un estado congelado o secado por congelación (liofilizado) que requiere sólo la adición del portador líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso.

25 Debe entenderse que además de los componentes particularmente mencionados anteriormente, la formulación de la invención puede incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión. Se prefieren disoluciones acuosas y no acuosas libres de pirógenos, estériles.

Dosificaciones

30 Las proteínas, los polinucleótidos y los vectores de la invención pueden administrarse en cualquier dosificación adecuada, y usando cualquier régimen de dosificación adecuado. Los expertos en la técnica apreciarán que la cantidad de dosificación y el régimen pueden adaptarse para garantizar el tratamiento óptimo del estado particular que va a tratarse, dependiendo de numerosos factores. Algunos de tales factores pueden ser la edad, el sexo y el estado clínico del sujeto que va a tratarse.

35 La dosificación usada para la administración de ácidos nucleicos mediante vectores dependerá de muchos factores, incluyendo la eficacia con la que los vectores administran los ácidos nucleicos a células, y la eficacia con la que los ácidos nucleicos se expresan en las células.

Para la administración de los ácidos nucleicos desnudos (por ejemplo plásmidos u otros vectores no virales desnudos), dosis típicas son de desde 0,1 hasta 5000 µg, por ejemplo de 10 a 1000 µg, tal como de 10 a 100 µg, de 100 a 500 µg y de 500 a 2000 µg por dosis.

40 Como guía, pueden administrarse vectores virales en dosis de desde 10^4 hasta 10^{14} ufc o ufp/ml, por ejemplo de 10^4 a 10^6 , de 10^6 a 10^8 , de 10^8 a 10^{10} , de 10^{10} a 10^{12} o de 10^{12} a 10^{14} ufc o ufp/ml. Se prefieren dosis en la región de 10^5 a 10^9 ufc o ufp/ml. El término ufp (unidad formadora de placa) se aplica a determinados virus, incluyendo adenovirus, y corresponde a la infectividad de una disolución de virus, y se determina mediante infección de un cultivo celular apropiado y medición, generalmente tras 48 horas, del número de placas de células infectadas. El término ufc (unidad formadora de colonia) se aplica a otros virus, incluyendo retrovirus, y se determina por medios conocidos en la técnica generalmente tras 14 días de incubación con un marcador seleccionable. Las técnicas para determinar el título de ufc o ufp de una disolución viral se conocen bien en la técnica. Para retrovirus, se prefieren particularmente dosificaciones en la región de 10^5 a 10^6 ufc/ml.

Para retrovirus pseudotipados, se prefieren particularmente dosificaciones en la región de 10^7 ufc/ml. Para adenovirus, se prefieren particularmente dosificaciones en la región de 10^9 ufp/ml.

50 Para la administración de polipéptidos de MGF de la invención, las dosis adecuadas incluyen dosis de desde 1 hasta 1000 µg, desde 10 hasta 100 µg, desde 100 hasta 500 µg y desde 500 hasta 1000 µg. Los programas de dosificación también variarán según, por ejemplo, la vía de administración, la especie del receptor y el estado del

receptor. Sin embargo, se administrará rápidamente el polipéptido de MGF tras la sobrecarga de incidente isquémico, o mecánica, tal como se comentó anteriormente. Opcionalmente, pueden extenderse dosis adicionales a lo largo de periodos de, por ejemplo, días, semanas o meses. Sin embargo, tal como se comentó anteriormente, la administración por medio de polinucleótidos que se expresan *in vivo* es ventajosa para el tratamiento a largo plazo porque minimiza la necesidad de inyecciones en el sujeto.

Ejemplos

Para investigar la regulación de MGF en músculo cardiaco, se han usado varios modelos *in vivo* e *in vitro*. Para confirmar la función de MGF, se ha sobreexpresado el gen de MGF en células de músculo cardiaco en una serie de “experimentos de ganancia de función”.

10 **Ejemplo 1:** Inducción de la expresión de MGF *in vivo* durante la sobrecarga e isquemia funcionales

Usando PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) como en Yang *et al.* (1996) y con los mismos cebadores oligonucleotídicos específicos, se ha mostrado que MGF se expresa fuertemente alrededor de la zona infartada tras la isquemia en el corazón de rata y oveja (figura 1B).

En una situación isquémica, los cardiomiocitos supervivientes próximos a la región del infarto se sobrecargan funcionalmente de modo que es difícil disociar las dos causas de muerte celular, es decir, la privación de oxígeno en el suministro de sangre y el posterior aumento de tensión mecánica sobre los miocitos restantes tras haberse destruido algunos por la privación de oxígeno. Colocando una pequeña ligadura alrededor de la aorta (cerclaje aórtico; Ding *et al.* (2000)), hay un aumento en la cantidad de trabajo que el corazón tiene que realizar para expulsar la sangre con el fin de mantener una tensión arterial constante. Esto se denomina aumento en la poscarga y se observa en pacientes que padecen hipertensión y obstrucción aórtica (acumulación de placas en las paredes de la aorta). Puesto que el corazón tiene que trabajar más, la respuesta de compensación del músculo es experimentar hipertrofia con el fin de satisfacer las demandas.

Se ha realizado tal cerclaje aórtico en ratones para determinar si la expresión de MGF aumenta en este modelo de hipertrofia cardiaca. En la figura 2, se muestran los resultados a partir de grupos de 3 ratones sometidos a cerclaje durante 7 días en comparación con controles operados de manera simulada. La figura 2 muestra que la expresión de MGF se induce notablemente en cardiomiocitos sobrecargados funcionalmente. A la inversa, no se encontró que la expresión de IGF-I de tipo hepático aumentara tras el cerclaje.

ANF es un gen marcador embrionario que se regula por incremento en estados hipertróficos. Puede observarse que el cerclaje indujo expresión de ANF indicando hipertrofia cardiaca en este modelo. Además, la expresión génica de Bax se regula por incremento durante la apoptosis y en situaciones patológicas y esto no se produjo en los ratones sometidos a cerclaje aórtico a los 7 días. Estos datos muestran que la expresión de MGF aumenta por la sobrecarga funcional y que, en contraposición a la situación para IGF-I de tipo hepático, esta expresión coincide con la fase de recuperación inmediata tras la sobrecarga. Se detectaron cambios similares justo tras la isquemia transitoria en la rata y la oveja y se encontró que la expresión de MGF era alta cerca de la zona del infarto en la que los cardiomiocitos se ven sometidos a sobrecarga mecánica (véase a continuación).

Ejemplo 2: Sobreexpresión de MGF *in vitro* en miocitos cardiacos primarios

Para confirmar adicionalmente el papel de MGF en la compensación cardiaca, se aumentó la expresión de MGF en miocardiocitos primarios. Se logró esto transfectando un plásmido que contenía el ADNc de MGF en cultivos primarios de miocitos cardiacos preparados a partir de ratones neonatales (Goldspink *et al.* (1997)).

El ensayo inicial tras la transfección era para determinar si había un cambio en el número de células. Los miocitos son células diferenciadas de manera terminal que no experimentan división celular una vez que se asignan al linaje de miocitos. Un aumento en el número de células (hiperplasia) podría explicar los aumentos en la expresión génica que iban a someterse a ensayo y de ese modo sugerir que MGF puede no estar implicado en la hipertrofia cardiaca. A diferencia de la situación en músculo esquelético, no había aumento en el número de células en ninguno de los estados tras la transfección. Por tanto, puede concluirse que el papel de MGF en el miocardio no es principalmente inducir la división celular.

Se extrajo ARN de las células tras la transfección (tras 72 horas) y se usó para someter a ensayo la expresión del marcador hipertrófico embrionario, ANF. Se muestran en la figura 2 los datos cuantitativos derivados de la RT-PCR en tiempo real para monitorizar el nivel de expresión de estos genes marcadores de crecimiento/reparación en los miocitos transfectados. El aumento de la expresión de MGF, sin un aumento correspondiente en la expresión de L-IGF-I, muestra que ésta es la isoforma de MGF que se induce en condiciones apoptóticas.

Ejemplo 3: Inducción de la expresión de MGF en respuesta a activación de la ruta de transducción de señales

Con el fin de investigar qué señal parece modular la expresión de MGF en miocitos cardiacos, se aplicaron varios fármacos a cultivos de cardiomiocitos. Estos a su vez activan moléculas de transducción de señales o bien directamente o bien indirectamente a través de moléculas acopladas a receptores. Un fármaco de este tipo es miristato-acetato de forbol (PMA), un éster de forbol que activa específicamente la familia de proteína cinasa C de las serina/treonina cinasas de señalización. Tal como se muestra en la figura 4, una breve exposición a PMA (200 nM) ocasiona un aumento significativo en la expresión del gen de MGF endógeno. Cuando se compara la cantidad de MGF con la cantidad de IGF de tipo hepático en las condiciones control, hay sustancialmente menos en los miocitos cardiacos. Sin embargo, el nivel de MGF aumenta significativamente en respuesta a PMA mientras que el nivel de IGF no cambia (figura 5A). Cuando se repitió el mismo experimento pero se añadió el PMA a cultivos de miocitos en los que no se había cambiado el medio durante 24 horas antes de la adición del PMA, el aumento en la expresión de MGF es incluso mayor que cuando se añade PMA junto con medio nuevo (figura 5B).

Estos datos muestran que PMA, un activador de proteína cinasa C, induce la expresión del gen de MGF endógeno en miocitos cardiacos. En la condición en la que el medio no se cambió, el entorno es uno de aumento del pH y disminución de nutrientes. En algunos sentidos, éste es un entorno similar a aquél en el que puede existir un miocito tras un acontecimiento isquémico, cuando se interrumpe el flujo de sangre a una región del corazón. En estas condiciones, puede observarse que la expresión de MGF aumenta incluso más. Esto sugiere que se activa MGF mediante la isquemia y que una de las moléculas de transducción de señales responsable es la proteína cinasa C. Se ha implicado a la activación de la familia de proteína cinasa C en la respuesta a varios estímulos hipertróficos y patológicos en el corazón. Se ha implicado también que estas moléculas de señalización desempeñan un papel en acontecimientos que ocasionan apoptosis (muerte celular) en miocitos cardiacos.

Estos experimentos muestran de nuevo que IGF-I y MGF son factores de crecimiento diferentes que tienen rutas de señalización diferentes, y sugieren que es la isoforma de MGF cuya expresión es decisiva tras la isquemia.

Ejemplo 4: Inducción de la expresión de MGF durante la apoptosis

Para determinar si se activa MGF en condiciones que ocasionan apoptosis, se cultivaron miocitos cardiacos en presencia de sorbitol. Esto pone a las células bajo estrés osmótico que provoca que se hinchen y finalmente mueran. Inicialmente, se cultivaron miocitos en medios definidos sin suero durante 24 horas antes de la adición de sorbitol. Tras la exposición a sorbitol, se extrajo el ARN y se sometió a ensayo la expresión génica con RT-PCR en tiempo real. Se muestran en la figura 5 los cambios en la expresión génica de MGF e IGF-I tras una corta exposición (4 horas) a sorbitol. Puede observarse inicialmente que la expresión de MGF aumenta mientras que IGF no cambia. Tras una exposición más larga a sorbitol (24 horas), la expresión de MGF es igual que el control mientras que IGF aumenta. Esto demuestra la diferente cinética de MGF en comparación con IGF-I, y apoya adicionalmente la idea de que es la expresión de MGF la que es decisiva tras la isquemia/sobrecarga mecánica. El aumento de la expresión génica de Bax indicaba también que las células estaban experimentando apoptosis, lo que se demostró adicionalmente mediante la aparición de fragmentación del ADN en los cultivos tratados con sorbitol tras 24 horas.

Para determinar adicionalmente el papel de MGF en la prevención de la apoptosis, se transfectó de manera estable una línea celular de tipo cardiaco (H9C2) (Kimes *et al.* (1976), y disponible comercialmente de la Colección americana de Cultivos Tipo PO Box 1549, Manassas, Virginia 20108, EE.UU.) con ADNc de IGF de tipo hepático y MGF usando un vector pcDNA3.1/NT-GFP (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California 92008, EE.UU.) y las técnicas de Southern *et al.* (1982). Se trataron entonces las líneas celulares transfectadas de manera estable más el control no transfectado con sorbitol durante 24 horas y se extrajo el ADN para analizar el grado de fragmentación del ADN, que es un indicador de apoptosis. Se muestra en la figura 6 el análisis del ADN tras 24 horas de tratamiento con sorbitol. Puede observarse claramente, que el ADN extraído de células control (no transfectadas) muestra el patrón característico de fragmentación asociado con apoptosis. Las células transfectadas de manera estable con el ADNc de IGF y MGF no muestran ningún signo de fragmentación del ADN, indicando que no han experimentado apoptosis. Esta característica protectora se ha descrito anteriormente para IGF en músculo cardiaco (Yamashita *et al.*, 2001), pero nunca se había descrito para MGF.

Estos datos muestran que la variante de corte y empalme del factor de crecimiento similar a la insulina, MGF, se activa en respuesta a daño de tejido cardiaco y que tiene una función de reparación. Por tanto, su administración tiene un efecto cardioprotector que será beneficioso para el corazón isquémico/sobrecargado.

Ejemplo 5: Pruebas de que los péptidos de MGF y L.IGF-I se acumulan de manera diferente dentro de los cardiomiocitos

Esto indica que el receptor de MGF está probablemente en el núcleo mientras que el receptor de IGF-IEa no es nuclear, y también que las acciones biológicas de las dos variantes de corte y empalme son diferentes.

Con el fin de expresar MGF en cultivos primarios de miocitos cardiacos, se usó una expresión génica mediada por adenovirus, los sistemas de vector adenoviral AdEasy (Stratagene), para expresar ADNc de L.IGF y MGF en

miocitos aislados. Las secuencias de MGF y L.IGF estaban en marco con la proteína fluorescente verde (GP5), que está en el sentido de 3' del promotor de CMV del vector pcDNA3.1/NT-GFP (Invitrogen). Se eliminó el casete completo y se ligó en el vector pShuttle con el fin de producir el virus. Este vector porta las regiones de homología para la recombinación homóloga con el vector pAdEasy, que se deriva del serotipo 5 de adenovirus humano. El virus se hace de replicación deficiente mediante delección de los genes de empaquetamiento y de inmunidad del huésped (E1 y E3). Se usó el constructo de vector/virus resultante para transfectar células de empaquetamiento 293 para producir una reserva viral primaria. Se usó la reserva primaria para amplificar el virus a través de una serie de infecciones en células 293 antes de purificar la reserva viral final mediante ultracentrifugación en CsCl. Se cuantificó el título viral final mediante un método espectrofotométrico, que proporcionó un título viral purificado del orden de 10^{11} - 10^{12} partículas/ml. Se usaron estas partículas para infectar miocitos primarios en el intervalo de 10^8 - 10^9 partículas/ml.

Se hicieron varias observaciones sorprendentes tras 24 h de infección viral en miocitos cardiacos primarios. Se muestra en la figura 1 la localización celular diferente del virus con MGF-GFP en comparación con el virus con IGF-GFP. Puesto que se produjo una proteína de fusión con la GFP, la visualización de las células infectadas con un microscopio fluorescente demostró una localización nuclear diferenciada del virus con MGF-GFP (figura 14A). Al contrario que esto, el virus con L.IGF-GFP, aunque también estaba presente en el núcleo, se expresaba adicionalmente por todo el citoplasma de la célula también (figura 14B).

Para confirmar que los núcleos de los miocitos estaban expresando el MGF, se contratiñeron las células con virus con dia (DAPI), que se une a la cromatina en el núcleo y puede observarse con fluorescencia. Se muestran en la figura 15 los resultados de la tinción. El patrón de tinción confirma la expresión de MGF en el núcleo.

Tras el periodo de infección inicial, se infectaron los miocitos durante periodos más largos para determinar los efectos de la sobreexpresión de MGF. Se sembraron en placa las células y se infectaron con el virus con MGF y un virus que expresaba GFP como control durante 48 h. Tras la infección, se fijaron las células en paraformaldehído y se contratiñeron con faloidina conjugada con Texas Red (Molecular Probes) para visualizar los miofilamentos y DAPI para visualizar el núcleo. Se muestran en la figura 16 los resultados de una infección de 48 horas. En los miocitos control sin infección, puede observarse la presencia de miofilamentos estriados con la tinción de faloidina (figura 16A). Asimismo, en miocitos infectados con un virus control que expresaba GFP, los miofilamentos permanecen intactos basándose en su aspecto estriado (figura 16B). Sin embargo, en los miocitos infectados con MGF, no había estriaciones en los miofilamentos cuando se tiñeron con la faloidina, sugiriendo que las proteínas de miofilamentos se han desensamblado (figuras 16C y D).

Para explorar adicionalmente el desensamblaje aparente de las proteínas de miofilamentos, se analizaron los niveles de expresión de ARNm de varias proteínas de miofilamentos usando RT-PCR. Se extrajo el ARN total de miocitos control y miocitos infectados durante 48 h con el virus con MGF. Se observó la expresión de varias proteínas de miofilamentos usando RT-PCR convencional. Se muestran en la figura 17 los resultados tras la electroforesis de las proteínas de filamentos gruesos (cadenas ligeras y cadena pesada de miosina) y las proteínas de filamentos finos (actina, tropomiosina y troponina T). Puede observarse claramente una regulación por disminución de las proteínas de filamentos gruesos en las células infectadas con MGF, mientras que las proteínas de filamentos finos no parecen verse afectadas. Se usaron cuatro cultivos separados como controles sin infección y cuatro cultivos de separación infectados con el virus con MGF.

Se realizó el análisis adicional de la supresión de la expresión de proteínas de filamentos gruesos usando RT-PCR cuantitativa. En la figura 18, la expresión de la cadena pesada de α -miosina (la isoforma predominante expresada en el corazón de roedores) disminuye en más de 100 veces en los miocitos infectados con MGF.

Estos datos muestran que la expresión de MGF se localiza en el núcleo de miocitos cardiacos mientras que la expresión de IGF es por toda la célula. La expresión prolongada de MGF en miocitos cardiacos está asociada con la supresión de las proteínas de filamentos gruesos de los miofilamentos pero no de las proteínas de filamentos finos. Esto da como resultado una pérdida de las estriaciones cruzadas de los miofilamentos dentro del miocito pero deja el citoesqueleto de actina intacto. Esta regulación por disminución selectiva de proteínas específicas del músculo actúa esencialmente desdiferenciando el miocito, lo que puede ser una etapa necesaria para entrar en el ciclo celular desde su estado diferenciado de manera terminal. Por tanto, puede observarse que la expresión de MGF da como resultado la remodelación de la región infartada, es decir, que según la invención, MGF será útil en la prevención o limitación del daño miocárdico en respuesta a isquemia o sobrecarga mecánica del corazón.

Ejemplo 6: Transcurso de tiempo del daño-regeneración y expresión de MGF e IGF-IEa tras daño muscular

Este ejemplo demuestra que MGF y L.IGF-I tienen una cinética de expresión diferente. Se indujo daño muscular por medios mecánicos y mediante un agente mitotóxico. Los resultados mostraron claramente que se produce MGF poco después del ataque mientras que se expresó L.IGF-IEa varios días más tarde.

Se indujo daño muscular por medios mecánicos, concretamente estiramiento y estimulación, e inyección del agente mitótico bupivacaína.

En la figura 19, se evalúa el porcentaje medio del área de fibras musculares con daño-en regeneración en relación con la sección de músculo completo en ambos modelos dañados.

- 5 Hay una disminución continua en el área dañada-en regeneración después de 4 días tras la inyección de bupivacaína y 5 días después del estiramiento y estimulación en los que estaba presente daño máximo en ambos (figura 19A). Se observó el mismo patrón tiñendo la cadena pesada de miosina embrionaria el área de regeneración en ambos modelos (figura 19B). Se usó análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías para determinar diferencias significativas entre las medias. N = 4 para el modelo de bupivacaína y N = 6 para el modelo de estiramiento/estimulación para cada punto de tiempo. Se compararon músculos experimentales con los de animales no tratados a tiempo cero y todas las diferencias eran significativas a $P < 0,01$ hasta 15 días tras la lesión.

La figura 20 muestra los resultados de la investigación de los niveles de ARNm de las isoformas de MGF e IGF-IEa en los dos modelos de daño muscular.

- 15 Se expresaba MGF de manera máxima tan pronto como 1 día tras el estiramiento y la estimulación y 4 días tras la inyección de bupivacaína (figura 20A), mientras que se expresaba IGF-IEa de tipo hepático de manera máxima más tarde a los 7 y 11 días tras la lesión (figura 20B). Se usó análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías para determinar diferencias significativas entre las medias. N = 6 para el modelo de estiramiento/estimulación y N = 4 para el modelo de bupivacaína para cada punto de tiempo. Las mediciones de MGF eran significativas a niveles de $P < 0,01$ durante hasta 5 días e IGF-IEa de tipo hepático durante hasta 11 días.

- 20 Esto proporciona pruebas adicionales de que es la isoforma de MGF en vez de la isoforma de IGF-IEa la que ofrece cardioprotección.

Bibliografía

- Buerke *et al.* (1995) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92:8031-8035
- 25 - Chew *et al.* (1995) Endocrinology 136, n.º 5
- Ding *et al.* (2000) Circulation 101:2854-2862
- Fazio *et al.* (1996) N. Engl. J. Med. 334: 809-814
- Goldspink *et al.* (1997) J. Cell Sci. 110:2969-2978
- Kimes *et al.* (1976) Exp. Cell. Res. 98:367-381
- 30 - Lakshmana *et al.* (1990) Biochemical & Biophysical Research Communications 173, 902-911
- McKoy *et al.* (1999) J. Physiol. 516.2,573-592
- Matthews *et al.* (1999) J Endocrinol. 163: 433-445
- Siegfried *et al.* (1992) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89: 8107-8111
- 35 - Sha *et al.* (1991) J. Cell Biology 114: 827-839
- Skarli *et al.* (1998) 192 J. Physiol. 509P
- Southern *et al.* (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:327-341
- Thuesen *et al.* (1988) Dan. Med. Bull. 35: 193-196
- Tian *et al.* (1999) Endocrinology 140: 3387-3390
- 40 - Wells DJ y Goldspink G. (1992) FEBS Letters 306: 203-205

- Wolff *et al.* (1990) Science 247: 1465-1468
- Yamashita *et al.* (2001) Circ Res. 30; 88(6):609-614
- Yang *et al.* (1996) J. Muscle Res. Cell Motil. 17: 487-495

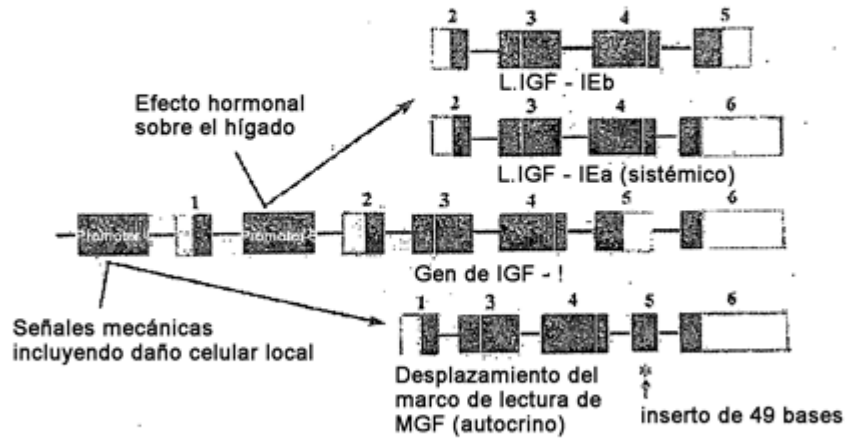
REIVINDICACIONES

1. Polipéptido de factor de crecimiento mecánico (MGF) o polinucleótido que codifica para un polipéptido de MGF para su uso en la prevención o limitación del daño miocárdico en respuesta a un ataque al corazón, previniendo o limitando la apoptosis en el miocardio.
- 5 2. Polipéptido o polinucleótido para su uso según la reivindicación 1, estando el polipéptido de MGF no glicosilado.
3. Polipéptido o polinucleótido para su uso según la reivindicación 1 ó 2, teniendo dicho polipéptido de MGF:
 - (a) la secuencia de MGF humano (SEQ ID NO: 2), MGF de rata (SEQ ID NO:4) o MGF de conejo (SEQ ID NO:6);
 - 10 (b) una secuencia que tiene una identidad de aminoácidos del 80% o mayor con una secuencia de (a); o
 - (c) una secuencia que comprende los aminoácidos codificados por los exones 5 y 6, los exones 4, 5 y 6 o los exones 3, 4, 5 y 6 de ADN de MGF humano, de rata o de conejo de SEQ ID NO: 1, 3 ó 5;
 y teniendo dicho polipéptido la capacidad para prevenir o limitar el daño miocárdico en respuesta a un ataque al corazón previniendo o limitando la apoptosis en el miocardio.
- 15 4. Polipéptido o polinucleótido para su uso según la reivindicación 3, en el que dicha secuencia codificada por los exones 5 y 6 como la secuencia de aminoácidos 87-110 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 87-111 de SEQ ID NO:4 o aminoácidos 87-111 de SEQ ID NO:6.
5. Polipéptido o polinucleótido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, teniendo dicho polipéptido de MGF la capacidad para inducir un fenotipo hipertrófico en células de músculo cardiaco.
- 20 6. Polinucleótido para su uso según la reivindicación 1, codificando dicho polinucleótido que codifica para un polipéptido de MGF para un polipéptido de MGF según la reivindicación 3, 4 ó 5.
7. Polinucleótido para su uso según la reivindicación 6, en el que dicho medicamento se formula para administración intramuscular.
8. Polinucleótido para su uso según la reivindicación 3, 4, 5 ó 6, estando contenido dicho polinucleótido dentro de un vector.
- 25 9. Polinucleótido para su uso según la reivindicación 8, en el que el vector es un plásmido o un vector viral desarmado.
10. Polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, siendo dicho polipéptido para su administración en el plazo de 5 horas de dicho ataque al corazón.
- 30 11. Polipéptido para su uso según la reivindicación 10, siendo dicho polipéptido para su administración en el plazo 2 horas de dicho ataque al corazón.
12. Polipéptido para su uso según la reivindicación 10 u 11, siendo dicho polipéptido para su administración en el plazo de 60 minutos de dicho ataque al corazón.
- 35 13. Polipéptido para su uso según la reivindicación 10, 11 ó 12, siendo dicho polipéptido para su administración en el plazo de 30 minutos, 15 minutos, 10 minutos o 5 minutos de dicho ataque al corazón.
14. Producto que comprende un polipéptido de MGF y un polinucleótido que codifica para un polipéptido de MGF para uso simultáneo, separado o secuencial en la prevención del daño miocárdico en respuesta a un ataque al corazón.
- 40 15. Producto según la reivindicación 14, en el que dicho polipéptido es según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 ó 4 o dicho polinucleótido es según una cualquiera de las reivindicaciones 6, 8 ó 9.
16. Producto según la reivindicación 14 ó 15, en el que dicho polipéptido de MGF es para su administración antes de dicho polinucleótido.

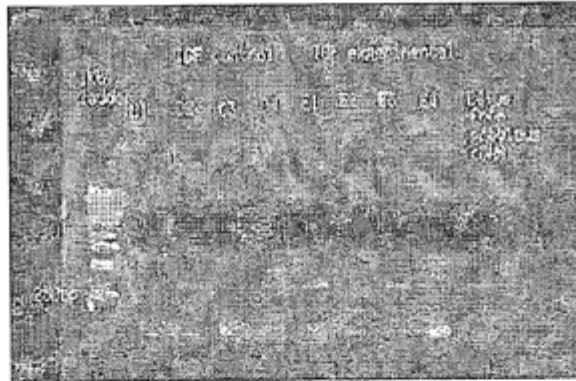
17. Uso de un polipéptido de factor de crecimiento mecánico (MGF) o polinucleótido que codifica para un polipéptido de MGF en la fabricación de un medicamento para la prevención o limitación del daño miocárdico en respuesta a un ataque al corazón previniendo o limitando la apoptosis en el miocardio.
- 5 18. Uso según la reivindicación 17, en el que dicho polipéptido es según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 ó 4 o dicho polinucleótido es según una cualquiera de las reivindicaciones 6, 8 ó 9, o en el que dicha prevención o limitación se logra mediante la administración según una cualquiera de las reivindicaciones 10, 11, 12 ó 13.

FIGURA 1

Corte y empalme alternativo del gen del factor de crecimiento I similar a la insulina



A



B

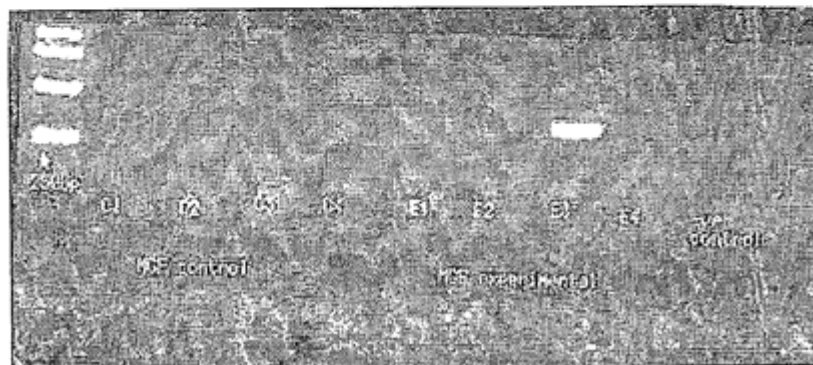


FIGURA 2

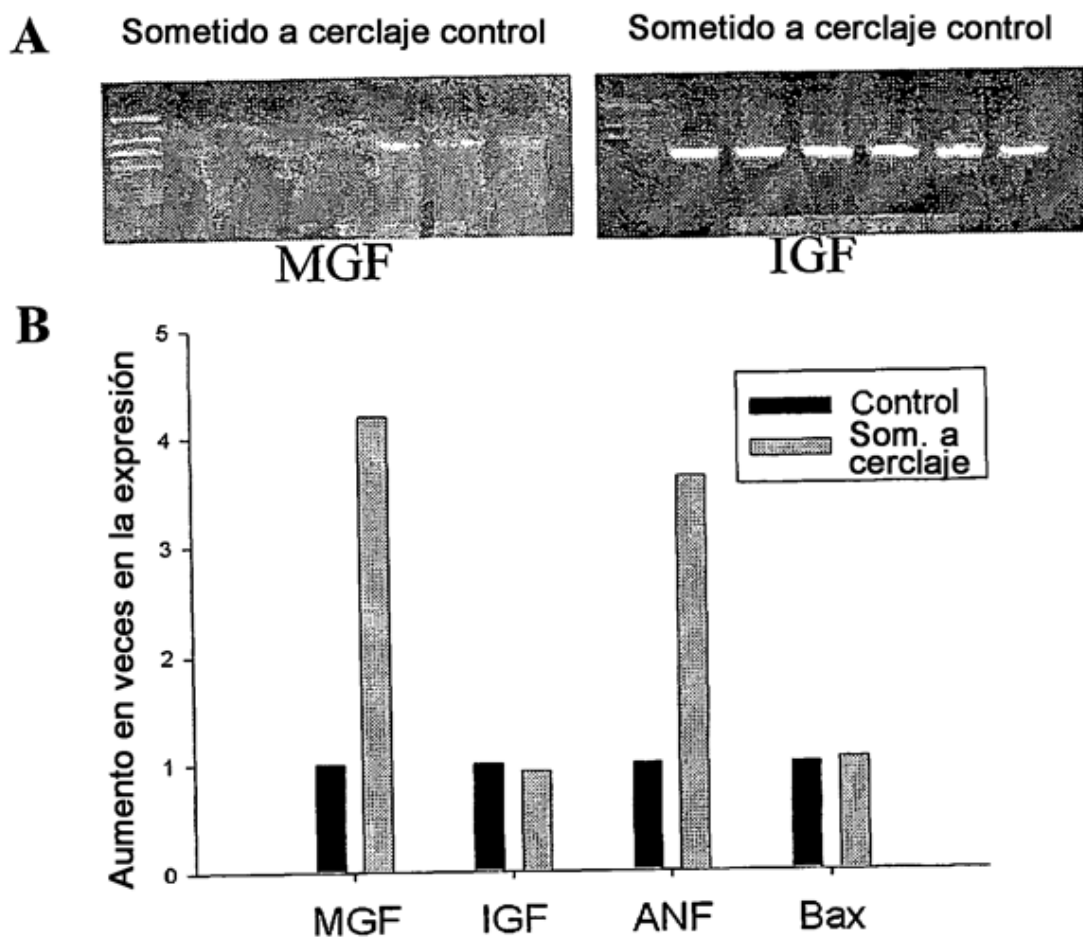


FIGURA 3

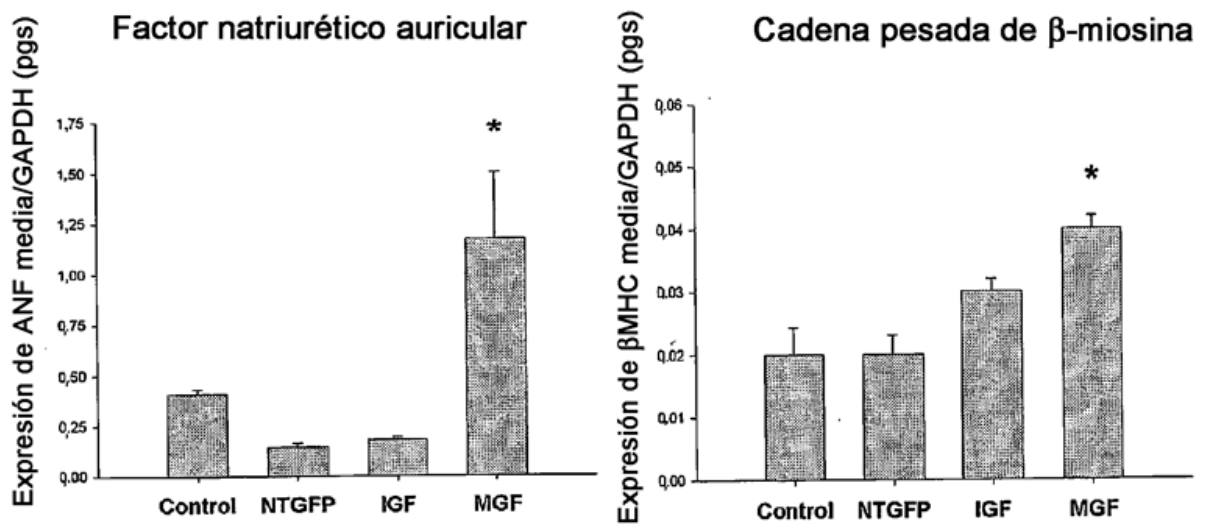


FIGURA 4

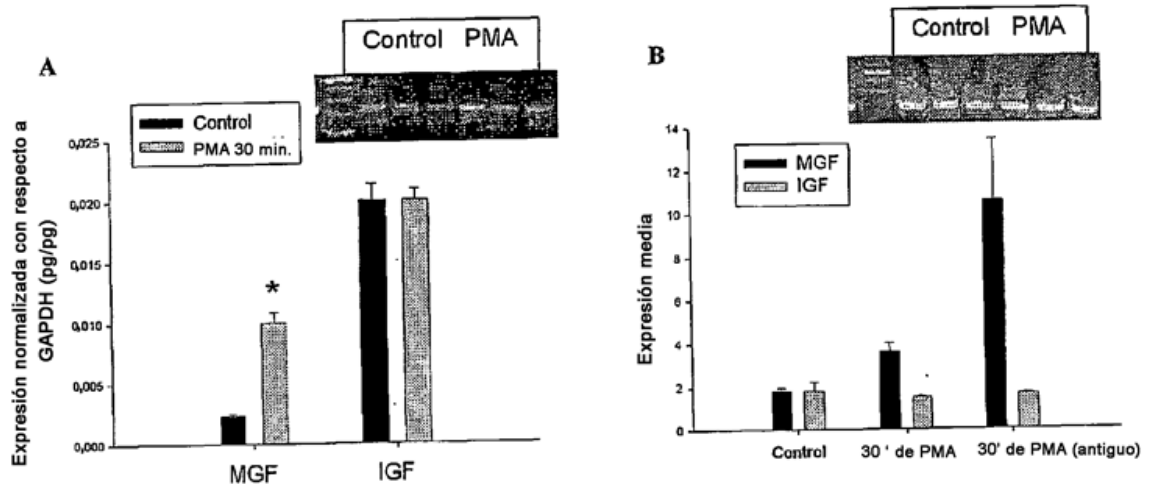


FIGURA 5

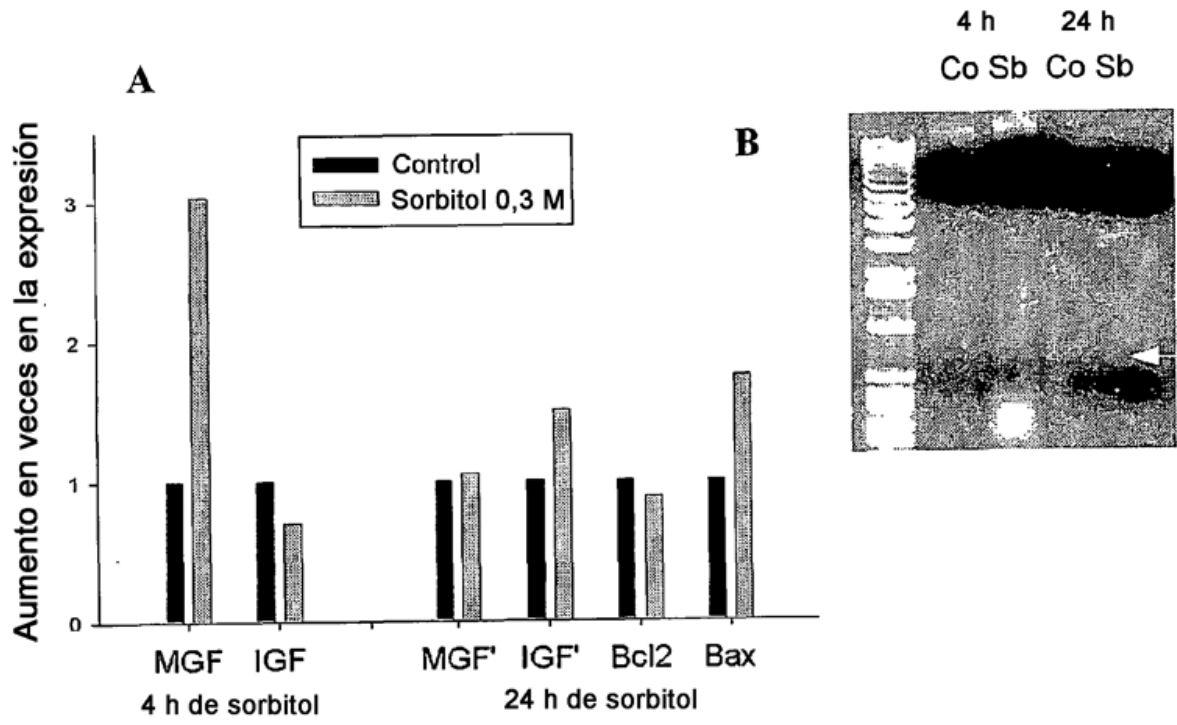


FIGURA 6

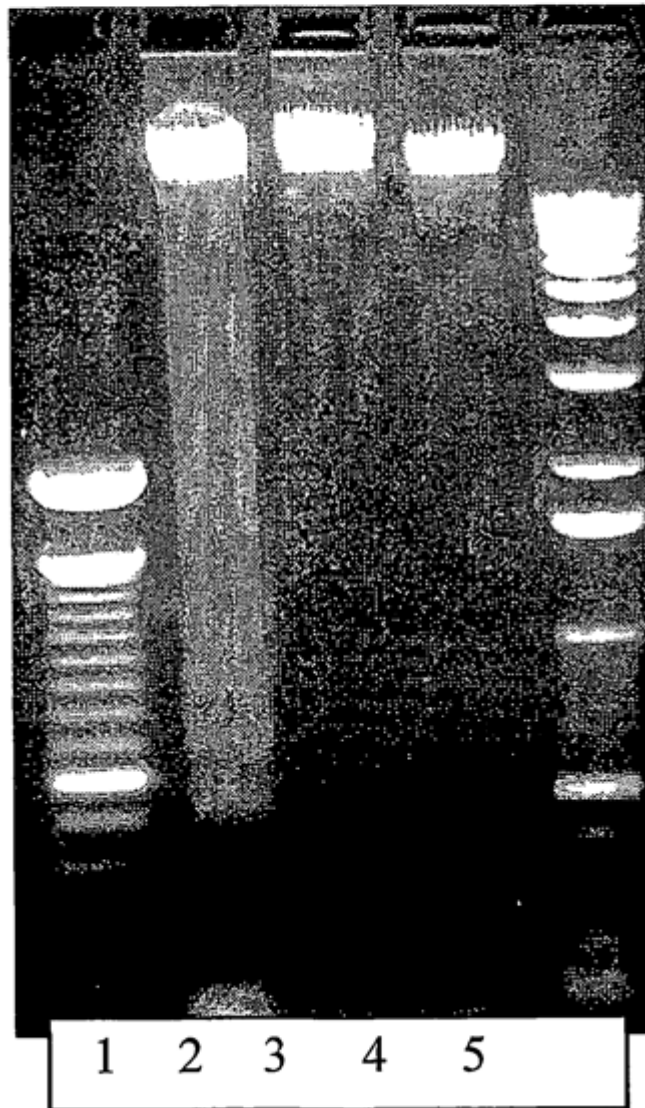


FIGURA 7

Secuencia de ADNc de MGF humano

Exón 3
 GGACCGGAGACCGCTCTGCGGGGCTGACCTGCTGGATGCTCAGTCCTCAGTCGCTGGAGACAGGGGCTTTTATTTCACAAGCCACAGGGTATGGCTCCAGCAGTCCG
 Exón 4
 AGGGCGCCTCAGACAGCGCATCGTGGATGAGTCTGCTCCGGAGCTGTGATCTAAGGAGGCTGGAGATGTATTGGCGCACCCCTCAAGCCCTGCCAAGCTCAGCTCGCTC
 Exón 5
 TGTCCGTGCCCCAGCCACACCAGACATGCCCAAGACCCAGAGATATCAGCCCCCATCTACCAACAAGAACACGAGTCTCAGAGAAAGGAAAGGATPACATTTGGAAG
 Exón 6
 AACCACAAGTAGGGGAGTGCAGGAACACAAGAAGCTACAGGATGTAGAGAGACCCCTTCTGAGGAGTGAAGAGGACAGGCCACCCCGCAGGACCCCTTTGCTCTGCACAGTTA
 CCTGTAAACATTGGATACCGGCCAAAATAAAGTTTGTATCATTTCAAAAGATGGCATTTTCCCCCATTGAAATACACAAAGTAAACAT

Secuencia de proteína de MGF humano

Exón 3
 GlyProGluThrLeuCysGlyAlaGluLeuValAspAlaLeuGlnPheValCysGlyAspArgGlyPheTyrPheAsnLysProThrGlyTyrGlySerSerSerAr
 Exón 4
 gArgAlaProGlnThrGlyIleValAspGluCysCysPheArgSerCysAspLeuArgLeuGluMetTyrCysAlaProLeuLysProAlaLysSerAlaArgS
 Exón 5
 erValArgAlaGlnArgHisThrAspMetProLysThrGlnLysTyrGlnProProSerThrAsnLysAsnThrLysSerGlnArgArgLysGlySerThrPheGlu
 Exón 6
 GluArgLys

FIGURA 8

Secuencia de ADNc de MGF de rata

Exón 3
 GGACCAGACACCCCTTTGGGGGGCTGAGCTGGTGGACCGCTTTCAGTTCGTGTGGACCAAGGGGCTTTTACTTCAACAAGCCACAGTCTATGGCTCCAGCATTCG
 Exón 4
 GAGGGCACACAGACGGGCATTGTGGATGAGTGTTCCTCCGGAGCTGTGATCTGAGGAGGCTGGAGATGTAATGTGTCGGCTGCAAGCCTACAAAAGTCAGCTCGTT
 Exón 5
 CCATCCGGGCCCCAGGCCCCACACTGCACATGCCCAAGACTCAGAAGTCCCAGCCCTATCGACACACAAGAAAAGGAAGCTGCAAGGAGAGAAAGGAAGTACACTT
 Exón 6
 GAAGACACAAAGTAGAGGAAGTGCAGGAAACAAGACCTACAGAAATGTAAGGAGGAGCCTCCCGAGGAAACAGAAAATGCCACGTCACCCGCAAGATCCTTTGCTGCTTGA
 GCACCTGCAAAACATCGGAACACCTGCCAAATATCAATAATGAGTTCAATATTCATTTTCAGAGATGGGCATTTCCCTCAATGAAATACACAAGTAAACATTTCCCGGA

ATTTC

Secuencia de proteína de MGF de rata

Exón 3
 GlyProGluThrLeuCysGlyAlaGluLeuValAspAlaLeuGlnPheValCysGlyProArgGlyPheTyrPheAsnLysProThrValTyrGlySerSerIleAr
 gArgAlaProGlnThrGlyIleValAspGluCysPheArgSerCysAspLeuArgLeuGluMetTyrCysValArgCysLysProThrLysSerAlaArgS
 erIleArgAlaGlnArgHisThrAspMetProLysThrGlnLysSerGlnProLeuSerThrHisLysLysArgLysLeuGlnArgArgGlySerThrLeu
 Exón 5
 Exón 6
 GluGluHisLys

Secuencia de ADNc de MGF de conejo

Exón 3
 GGACCGGAGACGGCTCTGGGGTGTGAGCTGGTGGATGCTCTTCAGTTCTGTGTGGAGACAGGGGCTTTTATTTCACACAGCCACAGGNTACGGCTCCACCGTCCGGAGGGCACC

Exón 4
 TCAGACAGGCATCGTGGATGAGTGTGCTTCCGGAGCTGTGATCTGAGGAGGCTGGAGATGTACTGTGACCCCTCAAGCCGGCAAGGACAGCCGCTCCGTCGCCCCAGGGCC

Exón 5
 ACACCGACATGCCCAAGACTCAGAAGTATCAGCCCTCCATCTACCACACAGAAATGAGTCTCAGAGGAGAAAGGAAGTACATTTGAAGAACAACAAGTAGAGGGAGTCCAGG

Exón 6
 AACAAGAAGTACAGGATGTAGGAAGACCCCTTCTGAGGAGTGAAGAAGGACAGGCCACCGCAGGACCCCTTTGTCTGTGCACAGTTPACCCTGTAACATTTGGAATATCCGGCCAAAAAANT

AAAGTTGATCACATTTCAAGATGGCAATTTCCCCCAATGAATACACAGTAACATTC

FIGURA 9

Secuencia de proteína de MGF de conejo

Exón 3
 GlyProGluThrLeuCysGlyAlaGluLeuValAspAlaLeuGlnPheValCysGlyAspArgGlyPheTyrPheAsnLysProThrGlyTyrGlySerSerSerArgArgAlaPr

Exón 4
 oGlnThrGlyIleValAspGluCysCysPheArgSerCysAspLeuArgLeuGluMetTyrCysAlaProLeuLysProAlaLysAlaAlaArgSerValArgAlaGlnArgH

Exón 5
 isThrAspMetProLysThrGlnLysTyrGlnProProSerThrAsnLysLysMetLysSerGlnArgArgLysGlySerThrPheGluGluHisLys

Exón 6

Secuencia de ADNc de L.IGF-1 humano

Exón 3
 GGACCGGAGACCCCTCTCGGGGCTGACCTGGTGGATGCTCTTCAGTTCTCTGGAGACAGGGGCTTTTATTTCACAACAGCCACAGGGTATGGCTCCAGCAGTGGGAGGGCGCC

Exón 4
 TCAGACAGGCATCGTGGATGAGTCTCTCCGGAGCTGATCTAAGGAGGCTGGAGATGTTTGGCGCACCCCTCAAGCCTGCCAAGTCAGCTCGCTCTGTCCGTGCCCCAGCGCC

Exón 6
 ACACCGACATGCCCAAGACCCAGAGGAGTACATTTGAAGAACGCCAAGTACAGGGAGTCCAGGAACAAAGAACTACAGGATGTAG

FIGURA 10

Secuencia de proteína de L.IGF-1 humano

Exón 3
 GlyProGluThrLeuCysGlyAlaGluLeuValAspAlaLeuGlnPheValCysGlyAspArgGlyPheTyrPheAsnLysProThrGlyTyrGlySerSerSerArgArgAlaPr

Exón 4
 oGlnTheGlyIleValAspGluCysCysPheArgSerCysAspLeuArgLeuGluMetTyrCysAlaProLeuLysProAlaLysSerAlaArgSerValArgAlaGlnArgH

Exón 6
 isThrAspMetProLysThrGlnLysGluValHisLeuLysAsnAlaSerArgGlySerAlaGlyAsnLysAsnTyrArgMet

Secuencia de ADNc de L.IGF-1 de rata

Exón 3
 GGACCAGAGACCCTTTGCGGGGCTGAGCTGGTGGACCGCTTTCACCTTCGTCTGTGGACCAAGGGGCTTTTACTTCAACAAAGCCACAGCTATGGCTCCAGCAATTCGGAGGGCACC

Exón 4
 ACAGACGGGCATTGTGGATGAGTGTTCCTCCGGAGCTGTGATCTGAGGAGGCTGGAGATGTPACTGTGTCCGGCTGCAAGCCTACAAAAGTCAGCTCGTTCCATCCGGGCCCCAGGGCC

Exón 6
 AACTGACATGCCCAAGACTCAGAAGGAAGTACACTTGAAGAACACAAAGTAGAGGAAGTGCAGGAACAACAGACTACAGAAATGTAGGAGGAGCCCTCCCGAGGAACAGAAAATGCCCA

CGTCACCGCAAGATCCTTGCTGTGAGCAACCCTGCAAAACATCCGGAACACCTGCCAAATATCAATAATAGTTCAATATTCAGAGATGGGCATTTCCCTCAATGAAATAC

ACAAGTAAACATTCCTCCGGGAATTC

FIGURA 11

Secuencia de proteína de L.IGF-1 de rata

Exón 3
 GlyProGluThrLeuCysGlyAlaGluLeuValAspAlaLeuGlnPheValCysGlyProArgGlyPheTyrPheAsnLysProThrValTyrGlySerSerIleArgArgAlaPr

oGlnThrGlyIleValAspGluCysCysPheArgSerCysAspLeuArgArgLeuGluMetTyrCysValArgCysLysProThrLysSerAlaArgSerIleArgAlaGlnArgH

istThrAspMetProLysThrGlnLysGluValHisLeuLysAsnThrSerArgGlySerAlaGlyAsnLysThrTyrArgMet

Exón 4

Exón 6

FIGURA 12

Secuencia de ADNc de L.IGF-1 de conejo

Exón 3
 GGA^{CCGGAGACGCTCTGCCGGTCTGAGCTGGTGGATGCTCTTCA}GTTCGTGTGGAGACAGGGGCTTTTATTTCACAAGCCACAGGATACGGCTCCAGCAGTCGGGAGGCACC

Exón 4
 TCAGACAGGCATCGTGGATGATGCTCCGGAGCTGTGATCTGAGGAGGCTGGAGATGTACTGTGCACCCCTCAAGCCGGCAAGGACGCCGCTCCGTCCGTGCCCCAGCGCC

Exón 6
 ACACCGACATGCCCAAGACTCAGAGGAGGTACATTTGAAGAACACAGTAGAGGAGTGCAGGAACAAGAACTACAGGATGTAGGAAGACCCCTTCTGTGGAGTGAAGAAGGACA

GGCCACCGCAGGACCCCTTGTCTGCACAGTTACCTGTAAACATTTGGAAATACCGGCCAAAAAATAAGTTGTATCACATTTCAAGATGGCATTTCCCCCAATGAAATACACAAGTA

AACATTC

Secuencia de proteína de L.IGF-1 de conejo

Exón 3
 GlyProGluThrLeuCysGlyAlaGlnLeuValaspAlaLeuGlnPheValCysGlyAspArgGlyPheTyrPheAsnLysProThrGlyTyrGlySerSerSerArgArgAlaPr

Exón 4
 pGlnThrGlyTlleValaspGluCysPheArgSerCysaspLeuArgArgLeuGluMetTyrCysAlaProLeuLysProAlaLysAlaAlaArgSerValArgAlaGlnArgH

Exón 6
 isThrAspMetProLysThrGlnLysGluValHisLeuLysAsnThrSerArgGlySerAlaGlyAsnLysAsnTyrArgMet

FIGURA 14

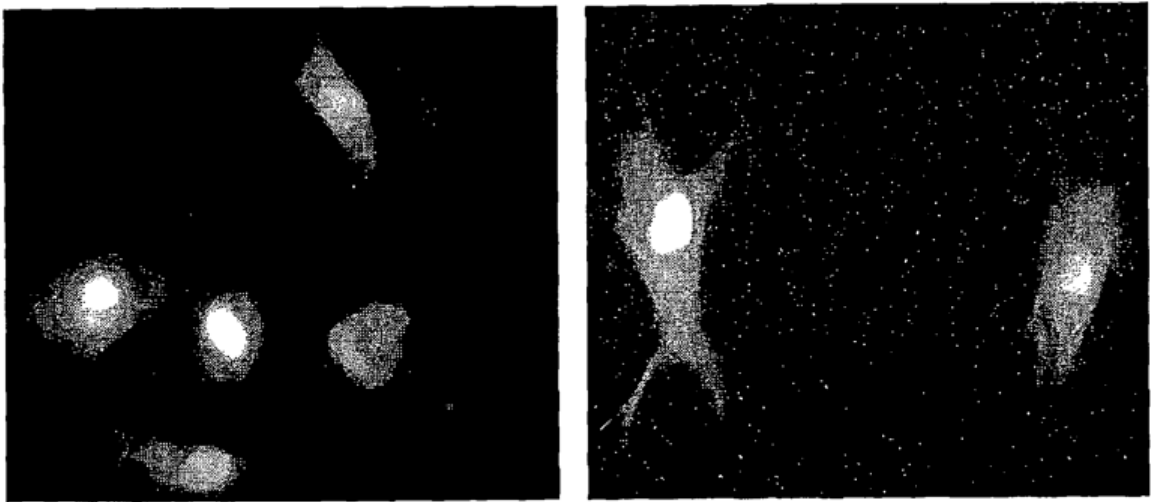


FIGURA 15

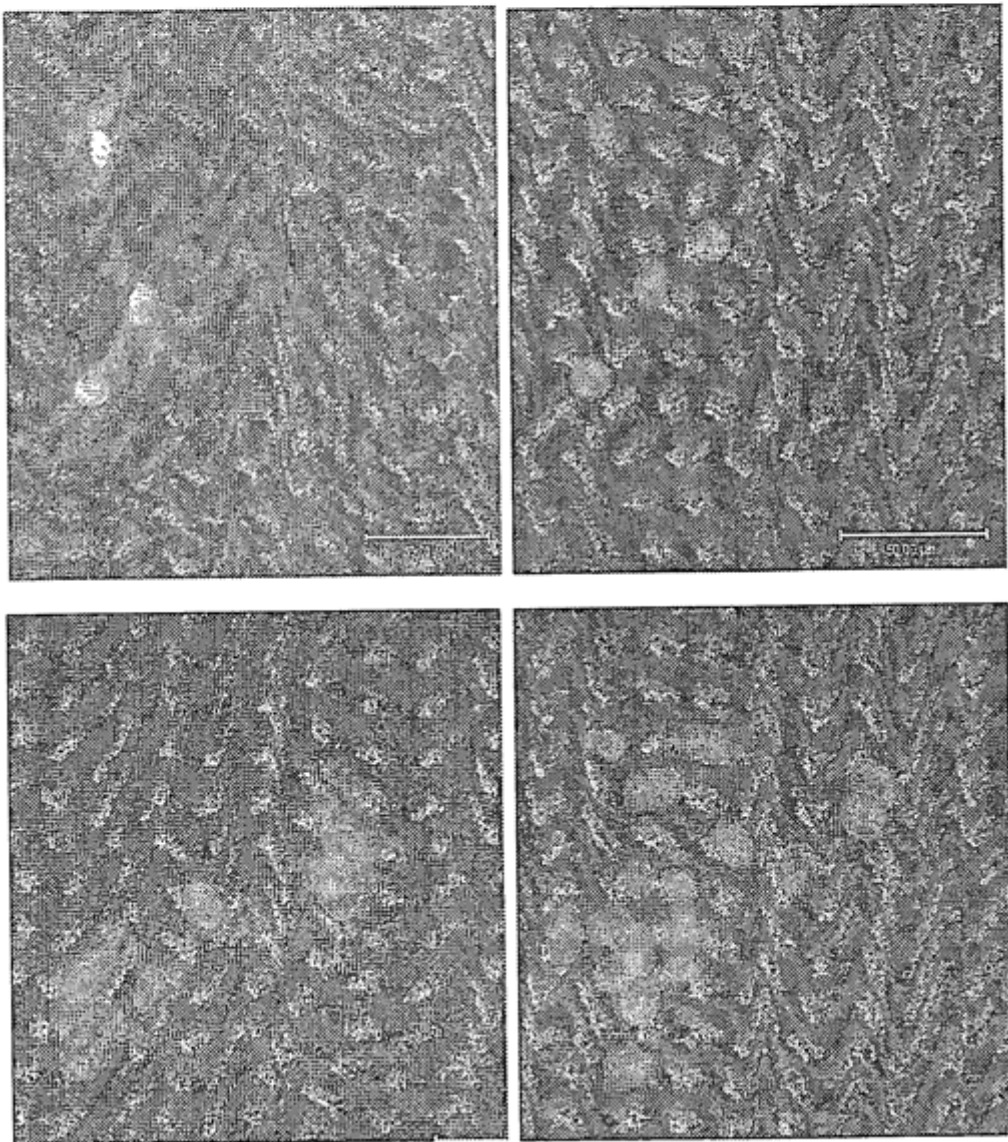


FIGURA 16

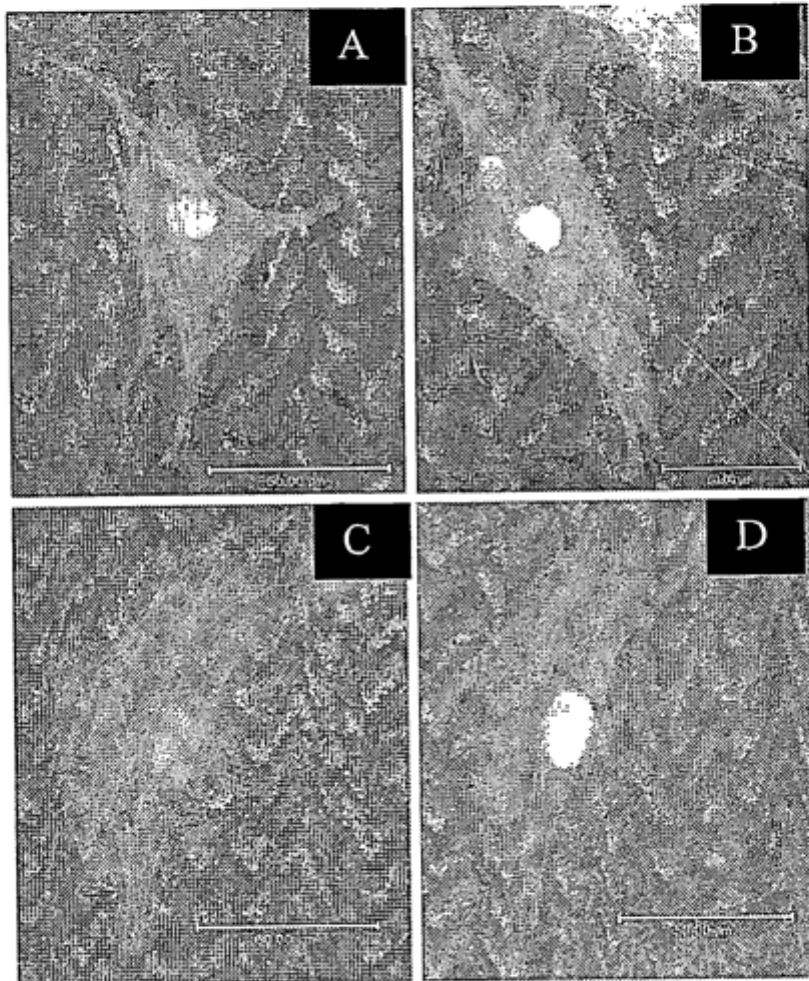


FIGURA 17

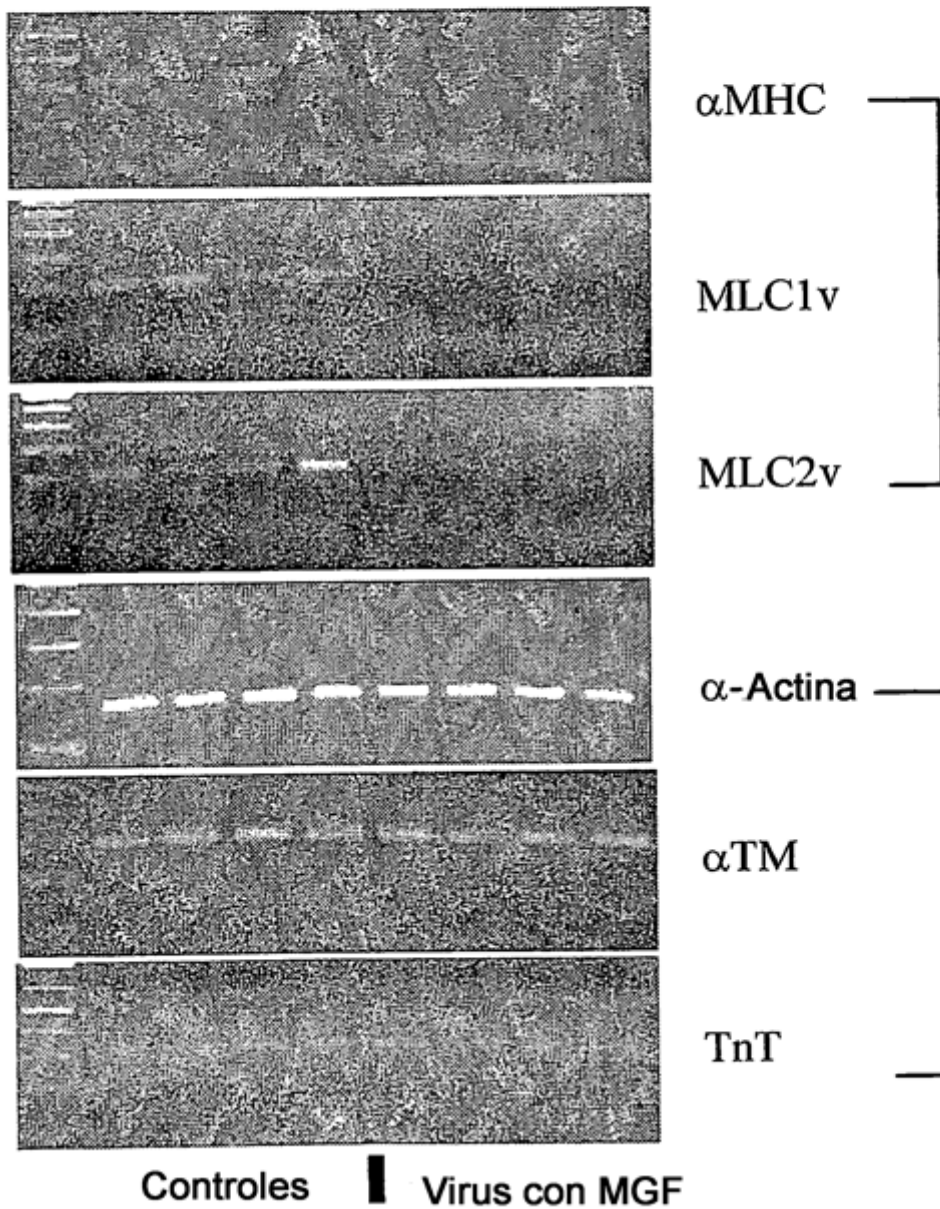


FIGURA 18

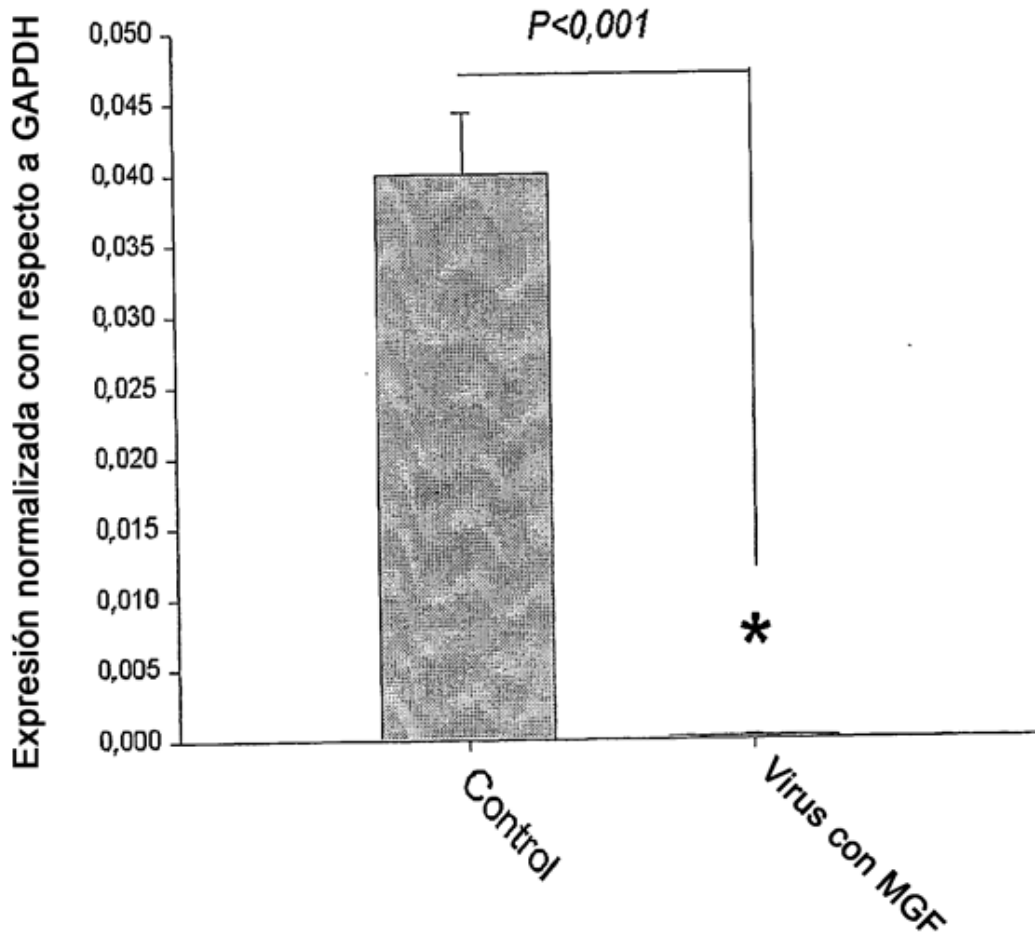
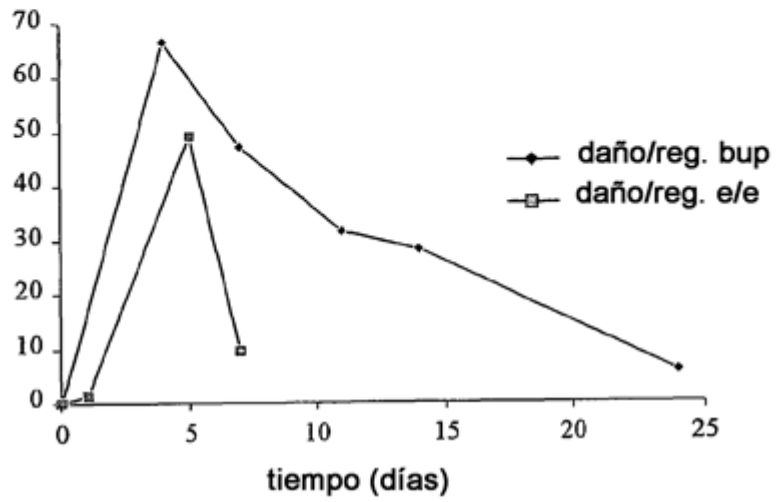


FIGURA 19

A



B

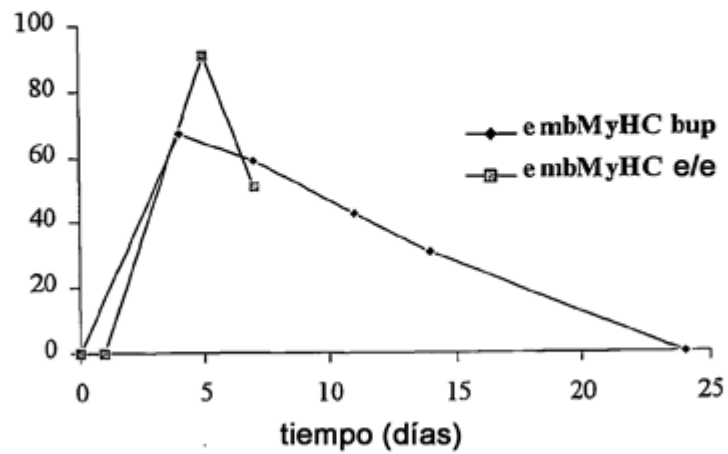
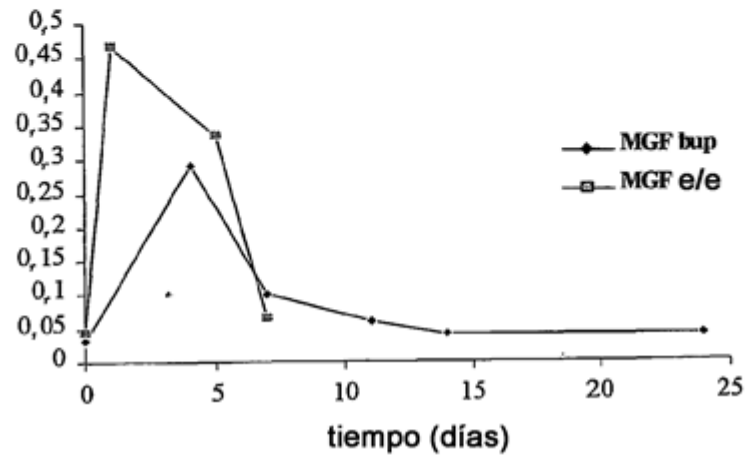


FIGURA 20

A



B

