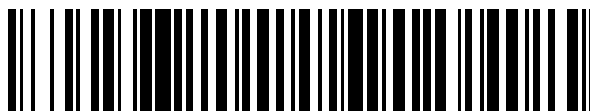


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 261**

51 Int. Cl.:

A61K 38/30

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2007 E 07798148 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 2032155**

54 Título: **Polipéptidos estabilizados del factor de crecimiento similares a insulina**

30 Prioridad:

09.06.2006 US 812349 P

20.10.2006 US 862244 P

24.01.2007 US 897187 P

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

18.02.2015

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)

Lichtstrasse, 35

4056 Basel , CH

72 Inventor/es:

GLASS, DAVID JONATHAN y

FORNARO, MARA

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 529 261 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

Polipéptidos estabilizados del factor de crecimiento similares a insulina

Antecedentes de la invención

- 5 Los factores de crecimiento similares a insulina (IGF) son parte de un sistema complejo que las células utilizan para comunicarse con su ambiente fisiológico. Este sistema complejo (a menudo denominado como los ejes del factor de crecimiento similares a insulina) consiste de dos receptores de la superficie de la célula (IGF-1R y IGF-2R), dos ligandos (IGF-1 e IGF-2), una familia de seis proteínas de enlazamiento de IGF de alta afinidad (IGFBP 1-6), y enzimas asociadas que degradan IGFBP (proteasas). Este sistema no sólo es importante para la regulación de la fisiología normal sino también para una cantidad de estados patológicos (Glass, Nat Cell Biol 5: 87 - 90, 2003)
- 10 Se ha demostrado que los ejes del IGF juegan un papel en la promoción de la proliferación celular y en la inhibición de la muerte celular (apoptosis). El IGF-1 se secreta principalmente por el hígado como resultado de la estimulación mediante la hormona de crecimiento humana (hGH). Casi cada célula en el cuerpo humano es afectada por el IGF-1, especialmente las células en los músculos, cartílagos, huesos, hígado, riñón, nervios, piel y pulmones. Además de efectos como los de la insulina, IGF-1 también puede regular el crecimiento celular. IGF-1 e IGF-2 son regulados por
- 15 una familia de productos génicos conocidos como las proteínas de enlazamiento del IGF. Estas proteínas ayudan a modular la acción del IGF en formas complejas que involucran tanto la inhibición de la acción del IGF al evitar el enlazamiento con los receptores del IGF como también la promoción de la acción del IGF ayudando al suministro a los receptores e incrementando la vida media del IGF en el torrente sanguíneo. Existen por lo menos seis proteínas de enlazamiento caracterizadas (IGFBP1-6).
- 20 En su forma madura, el IGF-1 humano (gpeticlgaelvdaquvcgdrfyfknkptg ygssrrapqtgividccfrscdlrrlem ycaplkpaksa; SEQ ID NO:1), también llamado somatomedina, es una proteína pequeña de 70 aminoácidos que ha demostrado que estimula el crecimiento de un amplio rango de las células en cultivo. La proteína madura inicialmente es codificada mediante tres ARNm variantes de empalme conocidos. El marco de lectura abierto de cada ARNm codifica una proteína precursora que contiene el IGF-1 de 70 aminoácidos y un péptido E particular en el terminal C,
- 25 que depende del ARNm particular del IGF-1. Estos péptidos E han sido llamados los péptidos Ea (rsvraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm; SEQ ID NO: 2), Eb (rsvraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpxkthpggeqkegt easlqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk; SEQ ID NO: 3), y Ec (rsvraqrhtdm pktqkyqppstnknktsqrrkgstfeerk; SEQ ID NO: 4) y varían de 35 a 87 aminoácidos de longitud y abarcan una región de secuencia común en el terminal N y una región de secuencia variable en el terminal C. Por ejemplo, el marco de lectura abierto de tipo silvestre para el IGF-1-Ea codifica un polipéptido de 105 aminoácidos (gpeticlgaelvdaquvcgdrfyfknkptgygssrrapqtgividccfrscdlrrlemycaplkpkaksa rsvraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm; SEQ ID NO: 5). En la expresión fisiológica, se escinden los péptidos E del precursor mediante proteasas endógenas para proporcionar el IGF-1 maduro de 70 aminoácidos que se sabe que es bioactivo. En ciertos contextos, se sabe que de uno a tres de los aminoácidos del terminal N del IGF-1 son escindidos bajo condiciones fisiológicas, produciendo IGF-1 activo que tiene entre 67 - 70
- 35 aminoácidos. La expresión génica del IGF-2 y el procesamiento se caracterizan por atributos similares excepto que se ha identificado sólo un péptido E (rdvstptvlpdnfprypvgkffqydtwkqstqurrpallrarrghvlakeleafreakhrplialpt qdpahggappemasnrk; SEQ ID NO: 6) para IGF-2 humano para el precursor de 156 aminoácidos (ayrpsetlccgelvdtquvcgdrfyfyrspasvrsrrgiveccfrscdlalletcatpakserdvstptvlpdnfprypvgkffqydtwkqstqurrpallrarrgh vlakeleafreakhrplialptqdpahggappemasnrk; SEQ ID NO: 7). Tanto IGF-1 como IGF-2 parecen ser candidatos pobres
- 40 a fármacos, debido a que estas proteínas son rápidamente degradadas por proteasas endógenas en el suero de los pacientes. Una estrategia que se ha contemplado es estabilizar el IGF-1 como un fármaco formando un complejo con una de sus proteínas de enlazamiento.

Resumen de la invención

- 45 La invención se basa en el descubrimiento de que un precursor de la proteína del IGF-1 o IGF-2 que contiene sustancialmente su péptido E es bioactivo y se estabiliza en presencia de suero, que resulta en un polipéptido de IGF-1 o IGF-2 que es útil como un compuesto farmacéutico. En las composiciones de la invención, se evita la escisión normal del péptido E del IGF-1, por ejemplo, mediante la mutación o supresión ya sea de la arginina en la posición 1 o la serina en la posición 2 de los péptidos E (que corresponden a las posiciones 71 y 72 en el precursor de tipo silvestre del IGF-1). En el IGF-2, se evita la escisión, por ejemplo, mediante la mutación o supresión ya sea de la arginina en la posición 1 o el ácido aspártico en la posición 2 del péptido E (que corresponde a las posiciones 68 y 69 en el precursor de tipo silvestre del IGF-2). Otras modificaciones de una proteína precursora del IGF pueden evitar o reducir esta escisión.

- 55 Además, modificaciones adicionales de la secuencia de aminoácidos del precursor del IGF-1 pueden conferir beneficios farmacéuticos adicionales. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención pueden exhibir mayor afinidad por el receptor del IGF-1 o la disminución de la capacidad de enlazamiento a una proteína de enlazamiento inhibidora del IGF-1 o IGF-2.

En aras a la claridad y consistencia, la numeración de los residuos de aminoácidos en los precursores del IGF-1 o IGF-2 o en las proteínas maduras a través de esta solicitud y en las reivindicaciones, se basa en la numeración de la secuencia de proteína precursora de tipo silvestre sin péptido de señal.

5 De acuerdo con lo anterior, la invención incluye un polipéptido que contiene una proteína precursora del IGF-1 humano, en donde la escisión del péptido E del IGF-1 mediante una proteasa se reduce por la modificación de la proteína precursora. El péptido E puede ser el péptido Ea, Eb, o Ec. En el terminal N del precursor, se pueden eliminar o mutar los aminoácidos G1, P2, o E3 de la proteína precursora, como lo puede hacer R36 (por ejemplo, R36A) y R37 (por ejemplo, R37A).

10 La proteína, precursora puede incluir adicionalmente la secuencia de consenso de glicosilación NXS/T ligada a N, por ejemplo mediante la inserción de 93 - 102 aminoácidos de Ea entre los aminoácidos N95 y T96 del Eb. En general, la proteína precursora puede incluir un oligosacárido ligado covalentemente a una cadena lateral de aminoácido de la proteína precursora, tal como una cadena lateral de arginina de la proteína precursora.

15 Además, un residuo de la proteína precursora puede ser reemplazado por un aminoácido no natural (por ejemplo, uno que incluya un grupo acetileno o azido). Tales aminoácidos no naturales pueden facilitar el enlazamiento de una fracción poli(etilenglicol) a una cadena lateral de la proteína precursora, a través de estrategias típicas de pegilación de proteína que son bien conocidas en la técnica.

20 La proteína precursora puede incluir adicionalmente uno o más péptidos E adicionales enlazados al terminal C de la proteína precursora. Por ejemplo, un polipéptido puede incluir, del terminal N al terminal C, (1) una proteína precursora del IGF-1 que tiene un primer péptido Eb, en donde se eliminan G1, P1, y E1, se mutan R36 o R37 o ambos, se eliminan R71 y S72, y se eliminan los últimos siete aminoácidos del terminal C del primer péptido Eb; (2) un segundo péptido Eb, en donde se eliminan R71, S72, y los últimos siete aminoácidos de terminal C del segundo péptido Eb; (3) un tercer péptido Eb, en donde se eliminan R71, S72, y los últimos siete aminoácidos de terminal C del tercer péptido Eb; y (4) un cuarto péptido Eb, en donde se elimina R71 y S72.

Un medio efectivo para evitar la escisión del péptido E del IGF-1 es la supresión o mutación de R71 o S72.

25 De forma similar, la invención incluye una proteína precursora del IGF-2 humano en donde la escisión del péptido E del IGF-2 por una proteasa se reduce mediante la modificación de la proteína precursora. En particular, la supresión o mutación de R68 o D69 puede ser un medio efectivo de evitar la digestión por la proteasa de la proteína precursora del IGF-2.

30 Además, cualquier péptido E del IGF-1 se puede combinar con un IGF-2 y cualquier péptido E del IGF-2 se puede combinar con IGF-1 para proporcionar los beneficios descritos aquí.

La invención incluye además un método para tratar una enfermedad musculoesquelética, diabetes, muerte de células neuronales al administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la invención. En forma similar, la invención incluye el uso de un polipéptido de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad musculoesquelética, diabetes, muerte de células neuronales, o anemia.

35 En otra realización, la invención incluye un IGF-1 pegilado sin un péptido E pero que tiene introducido un aminoácido no natural como el sitio de pegilación. Cualquier IGF-1 pegilado, modificado, que contiene un aminoácido no natural como se describe aquí, sin un péptido E, se incluye también en la invención.

La invención también incluye métodos veterinarios y usos para administrar una cantidad efectiva del polipéptido de la invención para obtener un efecto deseado.

40 Los usos veterinarios incluyen (i) mejorar la tasa y/o el grado de crecimiento en un animal, (ii) mejorar la eficiencia de su conversión de alimento en tejido corporal, (iii) mejorar la producción de leche en animales lactantes, (iv) tratar síntomas de deterioro en animales asociados con caquexia, trauma, u otras enfermedades de consumo, y (v) tratar animales lactantes para mejorar la salud neonatal.

Breve descripción de los dibujos

45 Las figuras 1A-1C son transferencias tipo Western de polipéptidos de la invención y del precursor del IGF-1 de tipo silvestre después de cero o 16 horas de incubación en presencia o en ausencia de 10% de suero humano a 37° C. Los vectores de expresión que codifican varios constructos del IGF-1 fueron transfectados en células Cos7, y se obtuvo el medio de cultivo acondicionado. El "3mut" se refiere a un precursor del péptido hIGF-1-E que tiene los siguientes tres conjuntos de modificaciones: supresión de G1, P2, y E3; mutación de Arg 37 en Ala (R37A); y
50 supresión de R71 y S72. La figura 1A muestra los resultados de la transferencia tipo Western (utilizando anticuerpo

para IGF-1) para el precursor 3mut y de tipo silvestre que contiene Ea. La figura 1B muestra los resultados de la transferencia tipo Western (utilizando anticuerpo para hIGF-1) para el precursor 3mut y de tipo silvestre que contiene Eb. La figura 1C muestra los resultados de la transferencia tipo Western (utilizando anticuerpo para hIGF-1) para el precursor 3mut y de tipo silvestre que contiene Ec.

5 Las figuras 2A-2D son gráficos de líneas que muestran la actividad biológica de varios polipéptidos del IGF-1 ("ligandos"). Se midió la actividad biológica mediante estimulación de mioblastos C2C12 con polipéptidos expresados en Cos7. Se ensayaron luego las células C2C12 estimuladas para las cantidades relativas de AKT total y AKT fosforilado. Long-R3-IGF-1 es un reactivo comercialmente disponible (Sigma producto No. I-1271) que
10 consiste de la secuencia de aminoácido IGF-1 humano maduro, con una mutación E3R y un péptido de extensión de 13 aminoácidos del terminal N. La figura 2A muestra la actividad de IGF-1-Ea3mut. La figura 2B muestra la actividad de IGF-1-Eb3mut. La figura 2C muestra la actividad de IGF-1-Eab3mut, que es un constructo 3mut en el que se insertaron 93 a 102 aminoácidos de Ea entre los 95 y 96 aminoácidos de Eb. La figura 2D muestra la actividad de IGF-1-Ec3mut.

15 Las figuras 3A-3D y 4A-4D son gráficos de líneas que muestran si los polipéptidos de precursor del IGF-1 de la invención mantienen selectividad por el receptor apropiado mediante el ensayo de fosforilación del receptor en respuesta al enlazamiento del ligando. Las Figuras 3A y 3B prueban la selectividad del receptor de IGF-1-Ea3mut contra el receptor del IGF-1 (Fig. 3A) y el receptor de insulina (Fig. 3B). Las figuras 3C y 3D prueban la selectividad del receptor de IGF-1-Eb3mut contra el receptor de IGF-1 (Fig. 3C) y el receptor de insulina (Fig. 3D). Las figuras 4A y 4B prueban la selectividad del receptor de IGF-1-Ec3mut contra el receptor de IGF-1 (Fig. 4A) y el receptor de insulina (Fig. 4B). Las figuras 4C y 4D prueban la selectividad del receptor de IGF-1-Eab3mut contra el receptor de IGF-1 (Fig. 4C) y el receptor de insulina (Fig. 4D). "IGF1-R3" se refiere al Long-R3-IGF-1 descrito anteriormente. El polipéptido listado como "IGF1Eab" se refiere al constructo en el que los aminoácidos 93 a 102 de Ea se insertan entre los aminoácidos 95 y 96 de Eb.

25 La Figura 5 es una transferencia tipo Western que muestra la fosforilación relativa de AKT luego de estimulación de miotubos C2C12 (como resultado de 3 a 4 días de diferenciación de los miocitos C2C12) mediante diferentes ligandos. El multímero IGF-1Eb se refiere al constructo mostrado esquemáticamente que se muestra en la Figura 6A.

30 Las figuras 6A y 6B son representaciones esquemáticas de dos de los polipéptidos de la invención. La figura 6A muestra un polipéptido precursor del IGF-1-Eb con cuatro conjuntos de modificaciones: supresión de G1, P2, y E3; mutación de R37 por A; supresión de R71 y S72; y supresión de los últimos siete aminoácidos de terminal C. Además, se alarga el polipéptido mediante la adición de dos péptidos Eb más (pero sin R71 y S72 y sin los últimos siete aminoácidos del terminal C) y la adición de un péptido Eb final (pero sin R71 y S72) en el terminal C del polipéptido. Este constructo a menudo se denomina como el multímero IGF-1-Eb. La figura 6B muestra un polipéptido precursor del IGF-1-Eab con cuatro conjuntos de modificaciones: supresión de G1, P2, y E3; mutación de R37 por A; supresión de R71 y S72; e inserción de los aminoácidos 93 a 102 de Ea entre los aminoácidos 95 y 96 de Eb.

40 La figura 7A es una alineación de secuencia del IGF-1 humano (SEQ ID NO: 1) con el correspondiente IGF-1 animal. Se suministran todas las especies animales analizadas y sus correspondientes números de acceso del GenBank para la secuencia. G1, P2, E3 se conservan en todas las especies analizadas excepto Sterlet (en donde S2 reemplaza a P2). R36 y R37 se conservan en todas las especies analizadas.

45 La figura 7B es un gráfico que muestra la filogenia de las secuencias de aminoácido analizadas comparadas con el IGF-1 humano (SEQ ID NO: 1). Abajo del árbol hay una escala que indica el número de "Sustituciones de Aminoácidos" por 100 residuos para las secuencias de proteína. La fórmula de distancia de Kimura se utiliza para calcular los valores de distancia, derivados del número de faltas de correlación sin espacios y corregidas para sustituciones silenciosas. Los valores computados son el número promedio de diferencias por sitio y caen entre cero y 1. El cero representa identidad completa y 1 representa no identidad. La escala del árbol filogenético utiliza estos valores multiplicados por 100.

50 La figura 8A es una alineación de secuencia del péptido Ea humano (SEQ ID NO: 2) con varios péptidos Ea animales. Se presentan todas las especies animales analizadas y sus correspondientes números de acceso del GenBank para la secuencia. R71 y S72 se conservan en todas las especies analizadas.

La figura 8B es un gráfico que muestra la filogenia de las secuencias de aminoácido analizadas comparadas con el péptido Ea del IGF-1 humano (SEQ ID NO: 2).

55 La figura 9A es una alineación de secuencias del péptido Eb humano (SEQ ID NO: 3) con varios péptidos Eb animales. Se presentan todas las especies animales analizadas y sus correspondientes números de acceso del GenBank para la secuencia. R71 y S72 se conservan en todas las especies analizadas.

La Figura 9B es un gráfico que muestra la filogenia de las secuencias analizadas de aminoácido comparada con el péptido Eb del IGF-1 humano (SEQ ID NO: 3).

La Figura 10A es una alineación de secuencias del péptido Ec humano (SEQ ID NO: 4) con varios péptidos Ec animales. Se presentan todas las especies animales analizadas y sus correspondientes números de acceso del GenBank para la secuencia. R71 y S72 se conservan en todas las especies analizadas.

La Figura 10B es un gráfico que muestra la filogenia de las secuencias de aminoácidos analizadas comparadas con el péptido Ec del IGF-1 humano (SEQ ID NO: 4).

La Figura 11A es una alineación de secuencia del IGF-2 humano (SEQ ID NO: 7) con el correspondiente IGF-2 animal. Se presentan todas las especies animales analizadas y sus correspondientes números de acceso del GenBank para la secuencia. R68 se conserva en todas las especies analizadas; D69 se conserva excepto para el chimpancé, en donde hay un residuo de histidina en esa posición.

La Figura 11B es un gráfico que muestra la filogenia de las secuencias de aminoácido analizadas comparadas con IGF-2 humano (SEQ ID NO: 7).

La Figura 12A es una alineación de secuencias del péptido E del IGF-2 humano (SEQ ID NO: 6) con varios péptidos E del IGF-2 animal. Se presentan todas las especies animales analizadas y sus correspondientes números de acceso del GenBank para la secuencia. R68 se conserva en todas las especies analizadas; D69 se conserva excepto para el chimpancé, en donde hay residuos de histidina en esa posición.

La Figura 12B es un gráfico que muestra la filogenia de las secuencias de aminoácido analizadas comparadas con el péptido E del IGF-2 humano (SEQ ID NO: 6).

Descripción detallada de la invención

La invención se relaciona con nuevos polipéptidos precursores del IGF-1 e IGF-2 que contienen sustancialmente un péptido E que ha sido modificado para prevenir, reducir, o evitar la escisión típica de la proteasa responsable por la liberación de los IGF-1 o IGF-2 activos de sus péptidos E. La utilidad de los polipéptidos de la invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que tales polipéptidos precursores son biológicamente activos, estables y benéficos como compuestos farmacéuticos.

Cribado de polipéptidos precursores del IGF activo

La utilidad de cualquier polipéptido de la invención se puede evaluar utilizando los siguientes ensayos.

Estabilidad. Un polipéptido de la invención debe tener suficiente estabilidad en presencia de proteasas endógenas, tal como en suero humano, para ser un fármaco efectivo. Para evaluar la estabilidad, se puede transfectar un vector de expresión que codifica el polipéptido en células Cos7 (ATCC) en un medio DMEM que contiene 10% de suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomycin. Se puede aplicar el medio de cultivo que contiene polipéptidos secretados a análisis adicionales, o alternativamente, el vector de expresión puede codificar fácilmente etiquetas disponibles, tales como una etiqueta de hexa-histidina, en el polipéptido para facilitar la purificación eficiente de los polipéptidos expresados en los cultivos de Cos7. Una vez preparada, se incubaba la muestra de polipéptido en suero humano normal (Sigma) o en PBS varias veces (por ejemplo, 0, 1, 5, 10, y 16 horas), y se la somete a electroforesis en gel de poli(acrilamida), se transfiere a nitrocelulosa, y se visualizan las proteínas relevantes utilizando un anticuerpo primario contra IGF-1 o IGF-2 humano y un segundo anticuerpo, por ejemplo, conjugado con peroxidasa de rábano. Se puede utilizar cualquier cantidad de técnicas similares de transferencia y detección, algunas utilizando colorantes fluorescentes o incluso radionúclidos. La intensidad de la banda precursora versus la intensidad de la banda de IGF-1 o IGF-2 deben indicar el grado en el que el polipéptido precursor se escinde bajo diferentes condiciones. Un polipéptido de la invención que se expone a suero humano durante 16 horas a 37°C puede exhibir una proporción del precursor no escindido con respecto a IGF maduro no escindido de aproximadamente 1:2 hasta 1:0,1, por ejemplo, aproximadamente 1:1 hasta 1:0,5, particularmente una proporción de aproximadamente 1:1 o una proporción de aproximadamente 1:0,5. Típicamente, el precursor debe exhibir una proporción de al menos 1:1.

Fosforilación de AKT. Un polipéptido de la invención debe mantener la capacidad de señalización a través del receptor del IGF-1. (Tanto la señal del IGF-1 como del IGF-2 a través del receptor del IGF-1). Para determinar esta capacidad de señalización, se puede evaluar si un objetivo intracelular secuencia abajo, AKT, se fosforila en respuesta al enlazamiento del ligando en la superficie celular. Para el análisis de la fosforilación de AKT, se mantienen sin alimentación los mioblastos C2C12 en medio libre de suero y luego se estimulan con diferentes ligandos. Las células se lisan y se limpian mediante centrifugación. Se analizan la fosforilación de AKT y los niveles

totales de AKT mediante ELISA utilizando un kit de ELISA tipo sándwich PathScan fosfo AKT (Ser473) y un kit de ELISA tipo sándwich PathScan AKT (Señalización celular), respectivamente.

Especificidad del receptor de IGF-1. Un polipéptido de la invención preferiblemente mantiene la especificidad para el receptor de IGF-1 y se debe unir al receptor de insulina relacionado con baja afinidad. Para evaluar la especificidad del receptor, se añaden muestras de polipéptido a las células NIH3T3 privadas de suero que sobreexpresan al receptor de IGF-1 o al receptor de insulina, y se determina el nivel de fosforilación del receptor de IGF-1 o la fosforilación del receptor de insulina mediante lisado de las células y sometiendo los lisados a ELISA utilizando el receptor de fósforo-IGF-1 humano DuoSet IC y el kit de ELISA del receptor de insulina (R&D Systems).

Ensayo *in vivo* en modelos de ratón de hipertrofia. Para determinar si un polipéptido de la invención puede actuar para incrementar la masa músculo esquelética bajo un contexto que conduzca fácilmente a hipertrofia muscular, se pueden someter animales tratados y no tratados a ejercicio y determinar si los animales que reciben el polipéptido han desarrollado músculos más grandes que los animales no tratados.

Modelos de ejercicio

Un modelo conocido en la técnica se basa en el uso de una rueda que gira a voluntad con cargas variables de usuario (véase, por ejemplo, Konhilas et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol 289: H455 - H465, 2005). La rueda de jaula que gira a voluntad elimina los traumatismos físicos y psicológicos que son comunes en modelos de ejercicio forzoso, y por lo tanto son más apropiados para evaluar los fármacos candidatos que se utilizan en individuos relativamente saludables para quienes es deseable el incremento de la masa muscular.

Se puede utilizar cualquier cepa de ratón adecuada. Por ejemplo, ratones machos C57B1/6J que se pueden asignar aleatoriamente a grupos experimentales (por ejemplo, que reciben polipéptido precursor del IGF) y de control. Los animales se colocan individualmente en una jaula que contiene una rueda de ejercicio; se colocan los animales de control sedentarios en jaulas idénticas sin rueda. Las ruedas de ejercicio se describen en Allen et al., J Appl Physiol 90: 1900 - 1908, 2001. En resumen, el sistema consiste de una rueda de 11,5 cm de diámetro con una superficie para carrera con un ancho de 5,0 cm (modelo 6208, PetSmart, Phoenix, AZ) equipada con un contador magnético digital (modelo BC 600, Sigma Sport, Olney, IL) que se activa por rotación de la rueda. Adicionalmente, cada rueda se construye con un mecanismo de resistencia que permite el ajuste de la carga. Esto se logra al adherir una línea de pesca de acero inoxidable a la parte superior de la jaula y envolver el cable alrededor de una polea inmóvil que se asegura a la rueda de la jaula en el eje de rotación con el fin de no contribuir a la carga de la rueda. El cable se asegura de nuevo a la parte superior de la jaula con un resorte y tornillo. Este diseño permite ajustes finos de la carga de la rueda, que se distribuye uniformemente a través de la rotación de la rueda. Los valores diarios de ejercicio en cuanto distancia y tiempo se registran para cada animal ejercitado a través de la duración del período de ejercicio. A todos los animales se les suministra agua y concentrado estándar duro para roedores a placer. La carrera voluntaria (exposición a la rueda de jaula) puede empezar a una edad promedio de aproximadamente 12 semanas para todos los grupos. Cada grupo continúa corriendo bajo resistencia variable, dependiendo del grupo experimental, durante 50 días hasta que los animales son de aproximadamente 19 semanas de edad. La carga en la rueda se determina al colgar los pesos conocidos sobre la rueda hasta que la rueda se desplaza ligeramente. Todos los grupos de ejercicio comienzan sin carga en la rueda de la jaula durante la primera semana. Sin embargo, la condición "sin carga" es realmente de 2 g, que se determina como la carga necesaria para mantener la inercia de la rueda y la carga de fricción. Considerando un período de aclimatación de la rueda de una semana, se pueden cambiar las cargas de la rueda en intervalos de una semana, excepto para cargas mayores, que se pueden cambiar después de dos semanas. El rango de cargas puede ser en cualquier sitio de 2 g hasta 12 g. A los animales de control sedentario y ejercitados se les practica la eutanasia mediante dislocación cervical bajo anestesia inhalada inmediatamente después del final del período de ejercicio específico. Se mide la masa corporal, y se retiran los músculos específicos rápidamente, se lavan, y se congelan para ensayos bioquímicos o histológicos en una fecha posterior.

Los modelos alternativos de hipertrofia de ejercicio también están disponibles para el experto en el arte. Véase, por ejemplo, el modelo de ejercicio tipo noria descrito en Lerman et al., J Appl Physiol 92: 2245 - 2255, 2002.

Modelo de inyección de clenbuterol

El clenbuterol es un agonista adrenérgico β_2 con propiedades promotoras del crecimiento que originan un incremento documentado en la masa muscular. El mecanismo preciso de la acción de clenbuterol aún no es claro, aunque se ha propuesto una reducción en la degradación de la proteína del músculo. En las clínicas, el clenbuterol se utiliza como un fármaco contra el asma, pero aparece ser mal empleado en su mayoría como un agente de fisicoculturismo para incrementar la masa muscular en humanos y animales de exposición.

A cinco ratones se les administra una inyección diaria de clenbuterol (3 mg/kg, en forma subcutánea (s.c.)) durante 3, 7, o 14 días para inducir hipertrofia muscular. Los ratones inyectados con PBS sirven como control negativo. Se

controlan diariamente los animales (inspección visual) por cualquier reacción adversa (es decir, pelaje desaliñado, letárgico) al tratamiento. El tratamiento de clenbuterol tiene el potencial de volver a los ratones más temerosos o agresivos, de modo que los ratones deben ser controlados especialmente por si pelean cuando se alojan en grupos. Los ratones pueden moverse, y pueden comer y beber normalmente. Se controlan los ratones diariamente hasta que se les practica la eutanasia en el día 3, 7, o 14, y se recolecta el tejido para análisis adicional.

Análisis *in vivo* de modelos de atrofia muscular. En varios modelos de atrofia músculo esquelética, se puede analizar un polipéptido precursor del IGF de la invención por la capacidad de mantener la masa muscular bajo condiciones que reducen generalmente la masa muscular. Con los modelos de ejemplo descritos a continuación, el experto en la materia puede diseñar e implementar fácilmente experimentos controlados que involucran la administración y el uso del polipéptido precursor del IGF para determinar si tales polipéptidos pueden incrementar la masa muscular.

Por ejemplo, se adquieren ratones macho C57B16/2 a través de The Jackson Laboratories. Se adquieren los ratones de aproximadamente 9 semanas al inicio de cada experimento. Los ratones generalmente se alojan en jaulas microaisladoras con concentrado normal para roedor. Al inicio de cada experimento se pesan los ratones. Al final de cada experimento, a los ratones generalmente se les practica la eutanasia mediante inhalación de CO₂ seguido por dislocación cervical, y se recogen los tejidos musculares para procesamiento adicional. Los ratones se pesan para proporcionar el "peso corporal final". Los músculos esqueléticos que se pueden recolectar son el músculo anterior de la tibia, el músculo extensor de los dedos, el sóleo, y los músculos gemelos. Otros tejidos recolectados ocasionalmente son corazón, hígado, bazo, riñones, testículos y cerebro. Todos los músculos y tejidos se disecan completamente y se pesan en una balanza capaz de medir hasta 0,0001 g. Luego se congelan instantáneamente los tejidos en nitrógeno líquido para extracción posterior de ARN y proteína, o se congelan instantáneamente embebidos en OCT en un disco de corcho. Los músculos congelados en un disco de corcho para crioseccionamiento posterior se sumergen en isopentano frío en una colada espesa mediante nitrógeno líquido. Todas las muestras se almacenan a -80° C.

Tratamiento con dexametasona

Un método farmacológico para inducir deterioro muscular en los ratones es mediante inyección intraperitoneal diaria con dexametasona a razón de 20 mg/kg. La dexametasona es un miembro sintético de la clase glucocorticoide de las hormonas. Este actúa como un antiinflamatorio e inmunosupresor, con una potencia de aproximadamente 40 veces la de la hidrocortisona. La dexametasona se utiliza para tratar muchas condiciones inflamatorias y autoinmunes, por ejemplo artritis reumatoide. También se la administra a pacientes con cáncer que experimentan quimioterapia, para contrarrestar ciertos efectos colaterales de su tratamiento antitumoral. La dexametasona causa atrofia muscular tanto en ratones como en pacientes humanos.

Los ratones se inyectan en forma intraperitoneal (i.p.) con dexametasona durante 3, 7, o 14 días. El último día se les practica la eutanasia a los sujetos utilizando CO₂ y se recolectan los músculos de las patas. Se hace control diario a los animales (inspección visual) por cualquier reacción adversa (es decir pelaje desaliñado, letárgico) al tratamiento. Los ratones usualmente pueden moverse, y pueden comer y beber normalmente. Los ratones inyectados con PBS son el control negativo.

Inmovilización mediante yeso

El desuso físico de varios grupos de músculos resulta en la atrofia de esos músculos. La fijación de la articulación del tobillo ("talón con pasador" o enyesado) ha probado ser una forma reproducible y altamente útil para inducir inmovilización física de las patas traseras de ratas y ratones.

Los ratones se anestesian con isoflurano para la inmovilización. Las articulaciones del tobillo y talón se fijan a 90 grados con un material moldeable de peso liviano (VET-LITE) alrededor de las articulaciones. El material se enjuaga con agua caliente y luego se envuelve alrededor del miembro, dejando los dedos y la articulación de la cadera libres. Las articulaciones se mantienen en las posiciones a 90° hasta que se ha secado el material de enyesado. La pata contralateral sirve como control. A los ratones luego se les permite recuperarse de la anestesia y se alojan en jaulas microaisladoras normales. No se ha observado que el yeso origine tensión excesiva, y los animales se mueven libremente alrededor de la jaula para alimentarse y beber. Sin embargo se hace seguimiento a los ratones diariamente por cualquier evento adverso que afecten el peso corporal, la actividad, y las irritaciones.

Una vez se aplica un yeso a un ratón, se controla el animal diariamente para asegurarse de que el yeso permanece en su lugar, ya que puede ser masticado. Los animales se pueden mover, beber, y alimentarse después de recuperarse de la anestesia, y no requieren descanso especial, ni dispositivos de bloqueo u otra ayuda.

Denervación

Generalmente, se anestesian los ratones con gas se isoflurano para la denervación. Utilizando procedimientos quirúrgicos asépticos (tres lavados de betadina con un lavado final de etanol), se aísla el nervio ciático derecho en la parte media del muslo y se corta un pedazo de 2 a 5 mm. La parte contralateral de la pata sirve como control.

5 Más específicamente, la incisión en la piel se cierra con un clip de sutura, y se inyectan los animales con una dosis única de buprenorfina antes de permitirles recuperarse de la anestesia. Tres, siete, o 14 días después de la cirugía se practica la eutanasia a los animales mediante la inhalación de CO₂ seguida por dislocación cervical, y se remueven los músculos (complejo gastrocnemio, tibia anterior, extensor de los dedos, sóleo) para análisis histológico y bioquímico.

10 Dado que el nervio ciático se corta en sección transversal, el miembro afectado se inmoviliza para inducir atrofia músculo esquelética de los músculos involucrados. Sin embargo, el animal puede moverse, beber, y alimentarse después recuperarse de la anestesia y no requiere descanso especial, ni dispositivo de bloqueo u otra ayuda. No obstante, se controlan los animales inmediatamente después de la cirugía y durante la recuperación (1 - 2 horas). Además, se controlan los sitios de incisión y la salud general del animal durante 3 días después de la cirugía. Se remueve el clip de sutura 7 a 10 días después de la cirugía.

15 Modelos genéticos

Los ratones transgénicos manipulados genéticamente también se pueden utilizar como modelos de atrofia muscular. Por ejemplo, los llamados Mini Ratones (The Jackson Laboratory, Lote No. 003258) contienen una mutación transgénica en el gen de IGF-1 que resulta en la reducción anormal del crecimiento postnatal, así como también un bajo peso corporal y de la talla. Para información adicional, véase Powell-Braxton et. al., Genes Dev 7: 2609 - 2617, 1993. Además, los llamados Mini Ratones (The Jackson Laboratory, Lote No. 003259) contienen una mutación diferente en el gen de IGF-1 que resulta en un bajo peso corporal en el adulto que exhibe hipomorfismo y otros fenotipos cardiovasculares. Para información adicional, véase Lembo et al., J Clin Invest 98: 2648 - 2655, 1996.

Mutaciones críticas y opcionales o modificaciones en los precursores del IGF

25 Mutaciones críticas. La invención se basa en parte en la observación de que un polipéptido precursor del IGF que contiene sustancialmente su péptido E permanece bioactivo y estable en presencia de suero. Para asegurar que el péptido E no se escinde mediante proteasas endógenas destinadas al sitio de la proteasa dibásica, en general se elimina, muta, o bien enmascara cualquiera de los dos aminoácidos dibásicos del terminal N del péptido E en el precursor. En el caso del hIGF-1, estos dos aminoácidos son R71 y S72, mientras que en el caso del hIGF-2, estos dos primeros aminoácidos son R68 y D69.

30 Una variedad de modificaciones permiten evitar esta escisión:

(1) Eliminación de uno o ambos residuos dibásicos

(2) Mutación de uno o ambos residuos dibásicos hasta un aminoácido no básico, tal como alanina

(3) Inserción de uno o más aminoácidos no básicos entre los residuos dibásicos

35 (4) Colocación de un sitio de glicosilación cerca de los residuos dibásicos, suficiente para enmascarar el sitio de la proteasa

(5) Pegilación dirigida al sitio utilizando el reemplazo de cualquier residuo dibásico, o inserción cerca o entre los residuos dibásicos, con un aminoácido no natural, como se describe más adelante.

40 Además, los residuos K68 y K65 parecen jugar un papel en la escisión del IGF-1/péptido E; de acuerdo con lo anterior, las mutaciones o eliminaciones de estos residuos se pueden incorporar en cualquier táctica dirigida a los aminoácidos dibásicos como se describió anteriormente.

45 Mutaciones en el terminal N del IGF maduro. En ciertas realizaciones de la invención, los polipéptidos precursores del IGF tienen eliminaciones o mutaciones de los pocos primeros aminoácidos del terminal N. En el caso del IGF-1, cualquiera de los primeros tres aminoácidos del terminal N se pueden eliminar o mutar, mientras que en el caso del IGF-2, cualquiera de los primeros seis aminoácidos del terminal N se pueden eliminar o mutar. Se ha observado que ciertos aminoácidos del terminal N se escinden naturalmente *in vivo*, y la introducción de estas mutaciones o eliminaciones minimiza las asociaciones *in vivo* de los polipéptidos de la invención con proteínas de enlazamiento del IGF (IGFBP). La interacción de IGF-1 e IGF-2 con el receptor del IGF-1 es regulada por las IGFBP. Se ha demostrado que todas las seis IGFBP inhiben la acción del IGF (particularmente las IGFBP5), pero en algunos casos se ha observado un efecto estimulador. Por lo menos 99% del IGF en la circulación se enlaza normalmente a

las IGFBP. La IGFBP más abundante en la circulación después del período neonatal es IGFBP3 que se puede enlazar a IGF-1 e IGF-2 con afinidades similares. La ocurrencia natural del IGF-1 truncado (que experimenta la supresión de G1, P2, y E3) se enlaza a IGFBP3 con varias veces menor afinidad que el IGF-1 natural. Además, G3 es importante para el enlazamiento de IGFBP, y G6 juega un papel similar en el péptido de IGF-2.

- 5 De acuerdo con lo anterior, en el caso del precursor de IGF-1, se puede eliminar o mutar cualquiera entre G1, P2, o E3 ya sea solo o en combinación. Cuando se desea una mutación, se puede introducir una mutación a la alanina. En otro ejemplo, en el caso del precursor de hIGF-2, se puede eliminar o mutar cualquiera entre P4, S5, y E6 ya sea solo o en combinación. Cuando se desea una mutación, se puede introducir una mutación a la alanina.

- 10 Mutaciones en los residuos 36 y 37. Se puede escindir el IGF-1 mediante serina proteasas presentes en suero humano. La mutación ya sea de R36 o R37 en A puede prevenir la escisión de IGF-1 en su sitio de escisión predicho entre R36 y R37. En el caso de hIGF-2, se puede mutar o eliminar R38 para prevenir esta escisión perjudicial.

- 15 Uso de la glicosilación. La vida media *in vivo* de los polipéptidos de la invención se puede mejorar mediante la adición de los sitios de glicosilación ligados a N ya sea en el IGF o en las porciones del péptido E del precursor cuando se expresan en mamíferos o en otras células eucarióticas capaces de glicosilación ligada a N. Se ha demostrado *in vitro* que el IGF-1 Ea se glicosila en N92 y N100, ya que estas porciones de Ea se ajustan al consenso de la secuencia de glicosilación ligada a N de N-X-S/T, en donde X puede ser cualquier aminoácido y el tercer aminoácido de la tripleta es S o T. También se sabe que el contexto del aminoácido adyacente del consenso afectará fuertemente la glicosilación de la asparagina. Por lo tanto, una estrategia para introducir un sitio de glicosilación en Eb o Ec es insertar aminoácidos Ea alrededor de la secuencia de consenso aproximadamente en la misma parte de Eb o Ec. Una implementación particular de esta estrategia se ilustra en los Ejemplos más adelante. En cualquier caso, cualquier otro sitio de glicosilación de consenso ligado a N, incluye los aminoácidos de contexto circundantes, que el experto en la materia sabe que se pueden insertar en un polipéptido precursor de la invención. Además, la glicosilación ligada a O de un polipéptido de la invención se puede llevar a cabo mediante la selección del huésped particular utilizado para la producción del polipéptido. Por ejemplo, el uso de ciertas cepas de levadura para la expresión de IGF-1 resulta en la adición de oligosacáridos en unas serinas o treoninas. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5.273.966.

- 30 Adición de poli(etilenglicol). La conjugación con poli(etilenglicol) (PEG; pegilación) ha probado ser benéfica al prolongar la vida media de los fármacos de proteínas terapéuticas. Se espera que la pegilación de los polipéptidos precursores del IGF de la invención pueda resultar en ventajas farmacéuticas similares. Los métodos de pegilación del IGF-1 son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2006/0154865, que describe las propiedades benéficas de IGF-1 monopegilado con lisina. Tal monopegilación con lisina se puede adaptar para los polipéptidos precursores del IGF de la invención. Además, la pegilación se puede lograr en cualquier parte de un polipéptido de la invención mediante la introducción de un aminoácido no natural. Se pueden introducir ciertos aminoácidos no naturales mediante la tecnología descrita en Deiters et al., J Am Chem Soc 125: 11782 - 11783, 2003; Wang y Schultz, Science 301: 964 - 967, 2003; Wang et al., Science 292: 498 - 500, 2001; Zhang et al., Science 303: 371 - 373, 2004 o en la patente de los Estados Unidos No. 7.083.970. En resumen, algunos de estos sistemas de expresión involucran mutagénesis dirigida al sitio para introducir un codón no sentido, tal como un TAG ámbar, en el marco de lectura abierto que codifica un polipéptido de la invención. Tales vectores de expresión luego se introducen en un huésped que puede utilizar un ARNt específico para el codón no sentido introducido y cargado con el aminoácido no natural de escogencia. Aminoácidos no naturales particulares que son benéficos para el propósito de conjugar fracciones a los polipéptidos de la invención incluyen aquellos con cadenas laterales de acetileno y azido. Los polipéptidos precursores del IGF que contienen estos aminoácidos novedosos pueden ser luego pegilados en estos sitios escogidos en la proteína. Además, tales moléculas pegiladas de IGF sin el péptido E son útiles como compuestos terapéuticos.

- 45 Multímeros de péptidos E. En ciertos contextos farmacológicos, es benéfico incrementar el tamaño de un fármaco peptídico o proteínico para asegurar que el fármaco permanezca en un lado de la barrera hematoencefálica o en la otra. Ya que las moléculas del IGF maduro son péptidos relativamente cortos, aún si el péptido E permanece unido, puede ser benéfico incrementar el tamaño de los polipéptidos de la invención. Un medio para hacer esto es proporcionar multímeros de péptidos E en el terminal C del polipéptido precursor del IGF, como se ilustra en ciertos ejemplos descritos más adelante.

- 55 Eliminación de terminal C de péptidos E. Se sospecha que la cisteína libre en la posición 81 de Eb puede resultar en homodimerización u otros efectos que, cuando están presentes en los polipéptidos de la invención, pueden conducir a fármacos de actividad más baja. Por lo tanto, la supresión o mutación de C81 en Eb puede optimizar la actividad del fármaco. En un ejemplo particular, la supresión de los últimos siete aminoácidos de Eb (es decir, los aminoácidos 81 - 87) es benéfica.

Otras mutaciones o modificaciones. Mutaciones o modificaciones adicionales de IGF que se pueden incorporar en los polipéptidos precursores del IGF de la invención se describen en la patente de los Estados Unidos No.

5.077.276; y en la publicación de las solicitudes de patente de los Estados Unidos Nos. 2005/0287151, 2006/0211606, y 2006/0166328.

- 5 La invención, se debe interpretar de manera que incluya, además de IGF-1 e IGF-2 humano, todas las secuencias precursoras de IGF-1 e IGF-2 animales no humanos conocidas y desconocidas que contienen sustancialmente su péptido E en donde se evita o reduce la escisión normal del péptido E de acuerdo con modificaciones de la presente invención.

El tipo preferido de IGF que se puede utilizar depende de la especie del sujeto que está siendo tratado.

Se prefiere que el IGF sea de una especie compatible, por ejemplo, cuando se trata una vaca, el tipo preferido de IGF es IGF de bovino.

- 10 Aunque todas las formas de IGF es probable que tengan un efecto en sujetos diferentes debido a la alta homología de secuencia, las especies compatibles evitarán complicaciones inmunológicas adversas potenciales provenientes de la inducción de una respuesta inmune a un IGF de una especie diferente.

En una realización de la invención, se proporcionan secuencias modificadas del precursor de IGF-1 de animal no humano.

- 15 Se prefieren las secuencias del precursor de IGF-1 que contienen sustancialmente su péptido E en donde la escisión normal del péptido E se evita o se reduce de acuerdo con modificaciones de la presente invención de un animal vertebrado.

Por ejemplo, tales secuencias incluyen pero no se limitan a secuencias de un ratón, rata, vaca, cerdo, caballo, oveja, cabra, pájaro, perro, gato, pez y similares, a partir de cualquier fuente ya sea natural, sintética, o recombinante.

- 20 En otra realización de la invención, se proporcionan las secuencias modificadas del precursor de IGF-2 de animal no humano.

Se prefieren las secuencias del precursor de IGF-2 que contienen sustancialmente su péptido E en donde la escisión normal del péptido E se evita o reduce de acuerdo con modificaciones de la presente invención de un animal vertebrado.

- 25 Por ejemplo, tales secuencias incluyen pero no se limitan a secuencias de un ratón, rata, vaca, cerdo, caballo, oveja, cabra, pájaro, perro, gato, pez y similar, de cualquier fuente ya sea natural, sintética, o recombinante.

Uso terapéutico de polipéptidos precursores del IGF

- 30 Indicaciones. La invención también incluye el uso de un polipéptido precursor del IGF de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad musculoesquelética. Además, la invención incluye el uso de polipéptidos precursores del IGF para incrementar la masa ósea o muscular en un individuo, esté o no tal individuo en riesgo de tener o que tenga una enfermedad musculoesquelética.

- 35 En particular, la enfermedad musculoesquelética puede ser atrofia muscular. Existen muchas causas de atrofia muscular, incluyendo aquellas como resultado del tratamiento con un glucocorticoide tal como cortisol, dexametasona, betametasona, prednisona, metilprednisolona, o prednisolona. La atrofia muscular también puede ser un resultado de la denervación debida a trauma nervioso o resultado de neuropatía degenerativa, metabólica o inflamatoria (por ejemplo, síndrome de Guillian-Barré, neuropatía periférica, o exposición a fármacos o toxinas ambientales). Además, la atrofia muscular puede ser el resultado de una enfermedad neuromotora de adulto, atrofia muscular de médula espinal de infante, atrofia muscular de médula espinal juvenil, neuropatía motriz autoinmune con bloqueo del conductor multifocal, parálisis debido a apoplejía o lesión de la médula espinal, inmovilización
- 40 esquelética debido a trauma, reposo prolongado en cama, inactividad voluntaria, inactividad involuntaria, estrés metabólico o insuficiencia nutricional, cáncer, SIDA, ayuno, rabdomiolisis, un trastorno de la glándula tiroides, diabetes, hipotonía congénita benigna, enfermedad del núcleo central, miopatía nemalena, miopatía miotubular (nuclear central), lesión por quemadura, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad hepática, sepsis, falla renal, falla cardíaca congestiva, o envejecimiento.

- 45 La enfermedad musculoesquelética puede también ser un síndrome de distrofia muscular, tal como Duchenne, Becker, miotónica, fascioescapulohumeral, Emery-Deifuss, oculofaríngeo, escapulohumeral, del anillo óseo, una distrofia muscular congénita, o miopatía distal hereditaria. La enfermedad musculoesquelética puede también ser osteoporosis, una fractura ósea, estatura corta, o enanismo.

Se sugiere al IGF-1 como tratamiento para diabetes insensible a insulina, dado que el IGF-1 también puede unir heterodímeros del receptor de IGF-1 y del receptor de insulina. Por lo tanto, los polipéptidos de la invención se pueden utilizar para tratar la diabetes.

5 El IGF-1 es neurotrófico e incrementa la supervivencia de las neuronas. Se ha sugerido que el IGF-1 se puede utilizar para tratar casos de muerte de neuronas motoras tal como se ve en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia de cerebro, envejecimiento, y demencia. Por lo tanto, los polipéptidos de la invención se pueden utilizar para tratar afecciones asociadas con muerte neuronal, tal como ELA, atrofia del cerebro, o demencia.

10 El IGF-1 incrementa tanto las poblaciones de glóbulos rojos como blancos y tiene un efecto aditivo para la administración de eritropoyetina. Por lo tanto, los polipéptidos de la invención se pueden utilizar para tratar la anemia.

Ya que IGF-1 e IGF-2 son reguladores esenciales y ubicuos de la división celular y el crecimiento de vertebrados, se pueden utilizar ventajosamente en una variedad de métodos veterinarios para mejorar exógenamente o mantener el crecimiento en un animal. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a:

15 (i) mejorar la tasa y/o grado de crecimiento en un animal, por ejemplo, mejorar el crecimiento muscular en cerdos, ganado, aves y peces;

(ii) mejorar la eficiencia de conversión de alimento en tejido corporal (proporción de carne a grasa), por ejemplo, en cerdos, ganado, ovejas, aves, y peces; y

(iii) mejorar la producción de leche en animales lactantes, por ejemplo, ganado lechero, ovejas, cabras. Otras aplicaciones terapéuticas veterinarias incluyen, pero no se limitan a:

20 (iv) tratar síntomas de desperdicio animal asociados con caquexia, trauma u otras enfermedades de consumo, por ejemplo, en animales de compañía tales como perros, gatos, y caballos; y

(v) tratar animales lactantes para mejoramiento en la salud neonatal, por ejemplo, cerdas lactantes para mejoramiento en el desempeño neonatal.

25 Métodos de administración. Los polipéptidos de la invención se pueden suministrar en una variedad de formas, que incluyen el uso de vehículos de suministro génico. Se pueden utilizar métodos conocidos en la técnica para el suministro terapéutico de agentes tales como proteínas o ácidos nucleicos para el suministro terapéutico de un polipéptido de la invención, por ejemplo, transfección celular, terapia génica, administración directa con un vehículo de suministro, o un portador farmacéuticamente aceptable, suministro indirecto al proporcionar células recombinantes que contienen un ácido nucleico que codifica el polipéptido.

30 Se conocen diferentes sistemas de suministro y se pueden utilizar para administrar el polipéptido de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar la proteína, endocitosis mediada por el receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, J Biol Chem 262: 4429 - 4432, 1987), la construcción de un ácido nucleico como parte de un retrovirus, virus adeno asociado, adenovirus, virus de la viruela (por ejemplo, virus de la viruela aviar, particularmente virus de la viruela en gallináceas) u otro vector, etc.

35 Los métodos de introducción pueden ser enterales o parenterales e incluyen pero no se limitan a rutas intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, pulmonar, intranasal, intraocular, epidural, y oral. Los polipéptidos se pueden administrar mediante cualquier ruta convencional, por ejemplo por infusión o inyección de bolo, por absorción a través del revestimiento epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central mediante cualquier ruta adecuada, que incluye inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular se puede facilitar mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un reservorio, tal como un reservorio Ommaya. La administración pulmonar también se puede emplear, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente formador de aerosol.

40 o local. Además, puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central mediante cualquier ruta adecuada, que incluye inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular se puede facilitar mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un reservorio, tal como un reservorio Ommaya. La administración pulmonar también se puede emplear, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente formador de aerosol.

45 En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente al área que requiere del tratamiento; esto se puede lograr, por ejemplo, y no a manera de limitación, mediante infusión local durante una cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, por inyección, por medio de un catéter, o por medio de un implante, siendo el implante de un material poroso o no poroso, o gelatinoso, que incluye membranas, tales como membranas sialásticas, fibras, o sustitutos comerciales para la piel.

50 En otra realización, el agente activo se puede suministrar en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, Science 249: 1527 - 1533, 1990). En aún otra realización, se puede suministrar el agente activo en un sistema de

liberación controlada. En una realización, se puede utilizar una bomba. En otra realización, se pueden utilizar materiales poliméricos (véase Howard et al., J Neurosurg 71: 105, 1989). En otra realización en donde el agente activo de la invención es un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención, se puede administrar el ácido nucleico *in vivo* para promover la expresión de su proteína codificada, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrarlo hasta que se convierta en intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 4.980.286), o por inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o cubriendo con lípidos o receptores de la superficie de la célula o agentes de transfección, o mediante su administración en unión con un péptido similar a homeobox que es conocido por entrar al núcleo (véase, por ejemplo, Joliot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864 - 1868, 1991), etc. Alternativamente, se puede introducir un ácido nucleico en forma intracelular e incorporarlo dentro del ADN de la célula huésped para expresión, mediante recombinación homóloga.

Transfección celular y terapia génica. La presente invención abarca el uso de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la invención para la transfección de células *in vitro* e *in vivo*. Estos ácidos nucleicos se pueden insertar en cualquiera entre una cantidad de vectores bien conocidos para transfección de células objetivo y organismos. Los ácidos nucleicos se transfectan en las células *ex vivo* e *in vivo*, a través de la interacción del vector y la célula objetivo. Se administran las composiciones (por ejemplo, mediante inyección en un músculo) a un sujeto en una cantidad suficiente para provocar una respuesta terapéutica.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar un sitio objetivo, es decir, una célula o tejido objetivo, en un humano u otro animal que incluye transfectar una célula con un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención, en donde el ácido nucleico incluye un promotor inducible operablemente enlazado al ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión objetivo. Para procedimientos de terapia génica en el tratamiento o prevención de una enfermedad humana, véase por ejemplo, Van Brunt Biotechnology 6: 1149 - 1154, 1998.

Terapias de combinación. En numerosas realizaciones, se pueden administrar los polipéptidos de la presente invención en combinación con uno o más compuestos adicionales o terapias. Por ejemplo, se pueden administrar conjuntamente múltiples polipéptidos en conjunto con uno o más compuestos terapéuticos. La terapia de combinación puede abarcar la administración simultánea o alternante. Además, la combinación puede abarcar administración aguda o crónica. Los polipéptidos de la invención se pueden administrar en combinación con agentes anabólicos tales como testosterona o moduladores específicos del receptor de andrógeno (MERA). Los agentes anabólicos adicionales incluyen hormona de crecimiento (HC) o moléculas que inducen la liberación de HC. La Ghrelina es particularmente útil en una terapia de combinación para caquexia, dado que la Ghrelina puede originar un incremento en el apetito. En una forma similar, los polipéptidos de la invención se pueden combinar con complementos proteínicos para incrementar el anabolismo, o combinados con terapia física o ejercicio para incrementar el peso corporal. Cualquier molécula que inhiba la miostatina también es una candidata para la terapia de combinación.

Composiciones farmacéuticas. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína precursora del IGF de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno estatal o federal o enlistado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales o humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el cual se administra el compuesto terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los excipientes farmacéuticamente adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede contener también cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes reguladores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación continuada y similares. La composición puede ser formulada como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de portadores farmacéuticamente adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin.

En algunas realizaciones, la composición se formula de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Cuando sea necesario, la composición puede también incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Cuando la composición se administra por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua de grado farmacéutico estéril o solución salina. Cuando se administra la composición mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina dado que los ingredientes se pueden mezclar antes de su administración.

Los polipéptidos de la invención se pueden formular en forma de sal o neutros. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con grupos amino libres tales como aquellos derivados de ácidos clorhídrico, fosfóricos, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellos formados con grupos carboxilo libres tales como aquellos derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

La cantidad de un polipéptido de la invención que será efectiva en el tratamiento de una condición o enfermedad se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar con base en la presente descripción. Además, se pueden emplear ensayos *in vitro* opcionalmente para ayudar a identificar los rangos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se puede emplear en la formulación también dependerá de la ruta de administración, y de la seriedad de la condición, y se debe decidir de acuerdo con el juicio del practicante y las circunstancias de cada sujeto. Sin embargo, los rangos de dosificación adecuados para administración intravenosa son generalmente aproximadamente de 20 - 5000 microgramos del composición activo por kilogramo de peso corporal. Los rangos de dosificación adecuados para administración intranasal son generalmente aproximadamente de 0,01 pg/kg de peso corporal hasta 1 mg/kg de peso corporal. Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de curvas de respuesta a las dosis derivadas de sistemas de ensayo del modelo animal o *in vitro*. En particular, un régimen de dosificación posible puede ser aproximadamente de 60 a 120 µg/kg de peso corporal, inyección subcutánea, dos veces al día.

Usos veterinarios

Además de los métodos anteriormente mencionados de administración en humanos, existen consideraciones adicionales para administración veterinaria.

La dosificación puede diferir cuando se administra a un animal saludable animal versus aquellos animales que sufren de una enfermedad. Una evaluación de la dosificación apropiada puede ser hecha fácilmente por aquellos expertos en la técnica utilizando ensayos conocidos en el arte, por ejemplo, el ensayo de proliferación de mioblastos (Ejemplo 79) o el ensayo de tejido epitelial mamario (Ejemplo 80) como se describe más adelante. Los ensayos generales para medir el IGF también se conocen en la técnica, tal como aquellos en el Ejemplo 81.

Aquellos expertos en la técnica reconocerán que algunas especies de animales exhiben la fertilidad estacional influenciada por la duración del fotoperiodo. Cualquier forma de realización de un método veterinario o uso se puede incluir opcionalmente partiendo del método de tratamiento en un tiempo específico dentro del ciclo reproductivo del animal con el fin de alcanzar el efecto deseado. Aquellos expertos en la técnica sabrán que se pueden determinar fácilmente el estado y el ciclo reproductivo, y, si se desea, se pueden sincronizar mediante el uso de un régimen apropiado.

Cuando se utiliza para indicaciones veterinarias, además de los métodos previamente mencionados para uso humano, se puede usar también el péptido de IGF-1 o IGF-2 de la presente invención como una dosis oral, o un complemento para piensos sólidos u orales para animales.

La invención se describe adicionalmente pero no está limitada por los siguientes Ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se construyó un vector de expresión de ADN que codifica al polipéptido precursor de hIGF-1-Ea que contiene las siguientes modificaciones: supresión de G1, supresión de P2, y supresión de E3; mutación de R37 por A; y supresión de R71 y supresión de S72. Estas mutaciones se denominan algunas veces como "3mut" a través de la presente descripción. Esto resulta en la secuencia de proteína secretada:

tlcgaelvdalqfvcgrdyfnkptgygssraapqgtivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlknasr gsagnknryrm

(SEQ ID NO:8)

Se mantuvieron células Cos7 (disponibles de ATCC) en DMEM que contenía 10% de suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomina y se sembraron en placas con una densidad de 1×10^6 células por placa de 10 cm. Estos cultivos celulares se transfectaron con 8 µg de plásmido de expresión utilizando Eugene (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Veinticuatro horas después de la transfección, se lavaron las células una vez y se cultivaron en medio libre de suero durante 48 horas. Se recolectaron los sobrenadantes y se almacenaron a -80° C.

Con el fin de evaluar la estabilidad del polipéptido en suero humano, se incubaron los sobrenadantes recolectados a partir de las células Cos7 transfectadas con hIGF-1Ea de tipo silvestre (wt), y hIGF-1Ea3mut durante 16 horas a 37° C ya sea en ausencia o en presencia de 10% de suero humano (Sigma). Se separaron las muestras mediante 18% de SDS-PAGE, y se llevaron a cabo las inmunotransferencias utilizando anticuerpo policlonal de cabra para IGF-1 humano. Los resultados en la Figura 1A indican que, mientras que el hIGF-1Ea wt se degrada sustancialmente después de incubación con suero durante 16 horas, el hIGF-1Ea3mut se estabilizó. La densitometría indica que la proporción de IGF-1 no escindido con respecto al escindido es aproximadamente de 1:6.2, mientras que la proporción para hIGF-1Ea3mut fue aproximadamente de 1:0,68, lo que muestra que estas mutaciones resultan en un polipéptido estabilizado.

Para confirmar que el hIGF-1Ea3mut fue capaz de señalar a través del IGF-1R, se midió la fosforilación de AKT de las células en contacto con el polipéptido. Las C2C12 se adquirieron de ATCC y se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con alto contenido de glucosa (Invitrogen) que contenía 10% de suero bovino fetal (AMIMED), 100 U/ml de penicilina (Invitrogen), 100 µg/ml de estreptomicina (Invitrogen) y 2 mM de glutamina (Invitrogen). Para el análisis de la fosforilación de AKT, se sembraron en placas las células C2C12 con una densidad de $0,15 \times 10^6$ células por pozo de una placa de 6 pozos y se cultivaron en medio de cultivo durante 72 horas. Se privaron de alimento las células durante cuatro horas en medio libre de suero y luego se estimularon con diferentes ligandos a 37° C durante 30 minutos. Se lisaron las células con regulador PhosphoSafe (Cell Signaling) que contenía varios inhibidores de proteasa y se aclararon mediante centrifugación a $14.000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C. Se analizaron la fosforilación de AKT y los niveles totales de AKT mediante ELISA utilizando un kit de ELISA tipo sándwich (Ser473) fosfo AKT PathScan y un kit de ELISA tipo sándwich AKT PathScan (Cell Signaling), respectivamente. Los resultados de la fosforilación de AKT se resumen en la Figura 2A, que indica que el hIGF-1Ea3mut fue capaz de activar la ruta celular de IGF-1R hasta un grado similar que el reactivo de control positivo long-R3-IGF-1 y el IGF-1 recombinante. Además, los datos en la Figura 5 muestran directamente que el hIGF-1Ea3mut condujo a la fosforilación de AKT

A continuación, para asegurar que la especificidad del receptor del hIGF-1Ea3mut permaneciera con el IGF-1R, se añadieron varios ligandos a los cultivos de NIH3T3 que sobreexpresan ya sea IGF-1R o al receptor de insulina (InsR). Estas células se cultivaron bajo las mismas condiciones como se describió anteriormente para las células Cos7. Para el análisis de IGF-1R y la fosforilación de InsR, se sembraron en placa las células NIH3T3-IGF1R y NIH3T3-InsR con una densidad de $0,2 \times 10^6$ células por pozo de una placa de 6 pozos y se cultivaron en medio de crecimiento durante 24 horas. Se privaron de alimento las células durante 18 horas en medio libre de suero y luego se estimularon con diferentes ligandos a 37°C durante 10 minutos. Se lisaron las células como se describió anteriormente para el experimento de AKT, y se analizaron los niveles de fosforilación de IGF-1R e InsR mediante ELISA utilizando un kit de ELISA para fosfo-InsR o fosfo-IGFIR humano DuoSet IC (R&D Systems). Los resultados resumidos en las figuras 3A y 3B indican que este polipéptido precursor del IGF-1 retiene la especificidad para el receptor de IGF-1 y se debe enlazar al receptor de insulina relacionado con baja afinidad.

Ejemplo 2

Se construye un vector de expresión de ADN que codifica al polipéptido precursor de hIGF-1-Eb que contiene las siguientes mutaciones: supresión de G1, supresión de P2, y supresión de E3; mutación de R37 por A; y supresión de R71 y supresión de S72 (es decir, el 3mut"). Esto resulta en la siguiente secuencia de proteína secretada:

tlcgaelvdaqlqfvcgdrqfyfinkptgygssarapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnk
ntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:9)

Se analizó el polipéptido de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 anterior. La figura 1B y el uso de la densitometría indicaron que la proporción de IGF-1 no escindido con respecto al escindido es aproximadamente de 1:9, mientras que la proporción para hIGF-1Eb3mut fue aproximadamente de 1:1, lo que muestra que estas modificaciones resultan en un polipéptido estabilizado. La figura 2B indica que el hIGF-1Eb3mut fue capaz de activar la ruta celular de IGF-1R hasta un grado similar que el reactivo de control positivo long-R3-IGF-1 y el IGF-1 recombinante. Además, los datos en la Figura 5 muestran directamente que el hIGF-1Eb3mut condujo a la fosforilación de AKT. Los resultados resumidos en las figuras 3C y 3D indican que este polipéptido precursor del IGF-1 retiene la especificidad para el receptor de IGF-1 y se debe enlazar al receptor de insulina relacionado con baja afinidad.

Ejemplo 3

Se construyó un vector de expresión de ADN que codifica al polipéptido precursor de hIGF-1-Ec que contiene las siguientes mutaciones: supresión de G1, supresión de P2, y supresión de E3; mutación de R37 por A; y supresión de R71 y supresión de S72 (es decir, el "3mut"). Esto resulta en la siguiente secuencia de proteína secretada:

tlcgaelvdalqfvcgrgfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnkn
 tksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:10)

Se analizó el polipéptido de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 anterior. La figura 1C y el uso de la densitometría indicaron que la proporción de IGF-1 no escindido con respecto al escindido era aproximadamente de 1:5, mientras que la proporción para hIGF-1Ec3mut era aproximadamente de 1:0,96, lo que muestra que estas modificaciones resultaron en un polipéptido estabilizado. La figura 2D indica que el hIGF-1Ec3mut fue capaz de activar la ruta celular de IGF-1R hasta un grado similar que el reactivo de control positivo long-R3-IGF-1 y el IGF-1 recombinante. Además, los datos en la Figura 5 muestran directamente que el hIGF-1Ec3mut condujo a la fosforilación de AKT. Los resultados resumidos en las figuras 4A y 4B indican que este polipéptido precursor de IGF-1 retiene la especificidad por el receptor de IGF-1 y se debe enlazar al receptor de insulina relacionado con baja afinidad.

Ejemplo 4

Se construyó un vector de expresión de ADN que codifica al polipéptido precursor quimérico de hIGF-1Eab que contiene las siguientes modificaciones para el péptido de hIGF-1Eb: supresión de G1, supresión de P2, y supresión de E3; mutación de R37 por A; supresión de R71 y supresión de S72 (es decir, el "3mut"); e inserción de los aminoácidos 93 a 102 de Ea entre los aminoácidos 95 y 96 de Eb. La inserción crea una señal de glicosilación ligada a N putativo en N92. Esto resulta en la secuencia de proteína secretada:

tlcgaelvdalqfvcgrgfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnkn
 nasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmacrkgk (SEQ ID NO:11)

El polipéptido se evaluó de acuerdo con algunos de los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 anterior. La figura C indica que el hIGF-1Eab3mut fue capaz de activar la ruta celular de IGF-1R hasta un grado similar que el reactivo de control positivo long-R3-IGF-1 y el IGF-1 recombinante. Los resultados resumidos en las figuras 4C y 4D indican que este polipéptido precursor de IGF-1 retiene la especificidad por el receptor de IGF-1 y no activa al receptor de insulina.

Ejemplo 5

Se construyó un vector de expresión de ADN que codifica al polipéptido precursor multímero de hIGF-1Eb que contiene las siguientes mutaciones: supresión de G1, supresión de P2, supresión de E3, supresión de R36, supresión de R37, supresión de R71, supresión de S72, supresión de los últimos siete aminoácidos del terminal C de Eb; y la inserción al terminal C de este precursor de dos péptidos de Eb adicionales ambos sin el R71 y S72 y los últimos siete aminoácidos del terminal C y un cuarto péptido y final de Eb sin el R71 y S72. La figura 6A muestra un dibujo esquemático de este constructo. Esto resulta en la siguiente secuencia de proteína secretada:

tlcgaelvdalqfvcgrgfyfnkptgygssapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnkn
 ksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmasvraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeq
 kegteaslqirgkkkeqrreigsmasvraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqr
 eigsmasvraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmacrkgk
 (SEQ ID NO:12)

Este polipéptido fue sometido a un ensayo de fosforilación de AKT como se describe en el Ejemplo 1. La figura 5 indica que este multímero de hIGF-1Eb fue capaz de señalizar a través de la ruta de IGF-1R.

Ejemplo 6

Se puede expresar un polipéptido precursor de hIGF-1Eb de la invención como se muestra esquemáticamente en la figura 6B. Esta construcción contiene las siguientes modificaciones: supresión de G1, supresión de P2, supresión de E3, supresión de R36, supresión de R37, supresión de R71, supresión de S72; y la inserción de aminoácidos 93 - 102 de Ea entre los aminoácidos 95 y 96 de Eb, creando por lo tanto un sitio de glicosilación ligado a N en la posición N92 y N100. Esto resulta en la siguiente secuencia de proteína secretada:

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnkna
srgsagnkntksqrrkgwphpggeqkegteaslqirgkkekqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:13)

Ejemplo 7

Se puede expresar un polipéptido precursor de hIGF-2-E de la invención que tiene las siguientes modificaciones: supresión de P4, supresión de S5, y supresión de E6; mutación de R38 por A; y supresión de R68 y supresión de D69. Esto resulta en la siguiente secuencia de proteína secretada:

ayrtlcggelvdtlqfvcgdrfyfsrpsrvsrasrgiveeccfrscdlalletycatpaksevspptvlpdnfprypvgkffqydtwkq
stqrlrrglpallrarrghvlakeleafreakhrhplialptqdpahggappemasnrk (SEQ ID NO:14)

Ejemplo 8

Se puede expresar un polipéptido precursor de hIGF-1-Ea de la invención que tiene las siguientes mutaciones: supresión de G1 y supresión de P2; mutación de E3 por X en donde X es un aminoácido no natural que está pegilado; mutación de R37 por A; y supresión de R71 y supresión de S72. Esto resulta en la siguiente secuencia de proteína secretada:

Xtlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssaapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlkna
srgsagnknyrm (SEQ ID NO:15)

Ejemplos 9-78 (Δ = supresión)

9) hIGF-1-Ea: Δ G1, Δ P2, Δ E3; R36A; Δ R71

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssarapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksasvraqrhtdmpktqkevhlknas
rgsagnknyrm (SEQ ID NO:16)

10) hIGF-1-Ea: Δ G1, Δ P2, Δ E3; R36A; Δ S72

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssarapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkevhlknas
rgsagnknyrm (SEQ ID NO:17)

10) hIGF-1-Ea: Δ G1, Δ P2, Δ E3; R36A; Δ R71, Δ S72

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssarapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlknas
gsagnknyrm (SEQ ID NO:18)

11) hIGF-1-Ea: Δ G1, Δ P2, Δ E3; R37A; Δ R71

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssaapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksasvraqrhtdmpktqkevhlknas
rgsagnknyrm (SEQ ID NO:19)

12) hIGF-1-Ea: Δ G1, Δ P2, Δ E3; R37A; Δ S72

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssaapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkevhlknas
rgsagnknyrm (SEQ ID NO:20)

13) hIGF-1-Ea: ΔG1, ΔPZ, ΔE3, ΔR37; ΔR71

tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksasvraqrhtdmpktqkevhlknasr
gsagnknyrm (SEQ ID NO:21)

14) hIGF-1-Ea: Δ61, ΔP2, ΔE3, ΔR37; ΔS72

tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkevhlknasr
gsagnknyrm (SEQ ID NO:22)

5 15) hIGF-1-Ea: ΔG1, ΔP2, ΔE3; ΔR37; ΔR71, ΔS72

tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlknasrg
sagnknyrm (SEQ ID NO:23)

16) hIGF-1-Eb: ΔG1, ΔP2, ΔE3; R36A; ΔR71

tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksasvraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaecrgkkgk (SEQ ID NO:24)

17) hIGF-1-Eb: ΔG1, ΔP2, ΔE3; R36A; ΔS72

tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaecrgkkgk (SEQ ID NO:25)

10

18) hIGF-1-Eb: ΔG1, ΔP2, ΔE3; R37A; ΔR71

tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksasvraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaecrgkkgk (SEQ ID NO:26)

19) hIGF-1-Eb: ΔG1, ΔP2, ΔE3; R37A; ΔS72

tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaecrgkkgk (SEQ ID NO:27)

15 20) hIGF-1-Eb: ΔG1, ΔP2, ΔE3; R37A; ΔR71, ΔS72

tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnk
ntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaecrgkkgk (SEQ ID NO:28)

21) hIGF-1-Eb: ΔG1, ΔP2, ΔE3, ΔR37; ΔR71

tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksasvraqrhtdmpktqkyqppstnk
ntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaecrgkkgk (SEQ ID NO:29)

22) hIGF-1-Eb: ΔG1, ΔP2, ΔE3, ΔR37; ΔS72

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfinkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstnk
ntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:30)

23) hIGF-1-Eb: ΔG1, ΔP2, ΔE3, ΔR37; ΔR71, ΔS72

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfinkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnk
ntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:31)

24) hIGF-1-Ec: ΔG1, ΔP2, ΔE3; R36A; ΔR71

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfinkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksasvraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:32)

5

25) hIGF-1-Ec: ΔG1, ΔP2, ΔE3; R36A; ΔS72

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfinkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:33)

26) hIGF-1-Ec: ΔG1, ΔP2, ΔE3; R36A; ΔR71, ΔS72

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfinkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnk
ntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:34)

10 27) hIGF-1-Ec: ΔG1, ΔP2, ΔE2; R37A; ΔR71

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfinkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksasvraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:35)

28) hIGF-1-Ec: ΔG1, ΔP2, ΔE3; R37A; ΔS72

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfinkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:36)

29) hIGF-1-Ec: ΔG1, ΔP2, ΔE3; R37A; ΔR71, ΔS72

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfinkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnk
ntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:37)

15

30) hIGF-1-Ec: ΔG1, ΔP2, ΔE3, ΔR37, Δ71

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfinkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksasvraqrhtdmpktqkyqppstnk
ntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:38)

31) hIGF-1-Ec: ΔG1, ΔP2, ΔE3, ΔR37, ΔS72

tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstnk
ntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:39)

32) hIGF-1-Eab: ΔG1, ΔP2, ΔE3; R36A; ΔR71; inserción de aa 93-102 de Ea entre aa 95 y 96 de Eb (es decir, "Eab")

tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstn
knasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:40)

33) hIGF-1-Eab: ΔG1, ΔP2, ΔE3; R37A; ΔR71

tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstn
knasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:41)

34) hIGF-1-Eab: ΔG1, ΔP2, ΔE3, ΔR37, ΔR71

tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstnk
nasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:42)

35) hIGF-1-Eab: ΔG1, ΔP2, ΔE3; R36A; ΔS72

tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstn
knasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:43)

36) hIGF-1-Eab: ΔG1, ΔP2, ΔE3; R37A; ΔS72

tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstn
knasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:44)

37) hIGF-1-Eab: ΔG1, ΔP2, ΔE3, ΔR37, ΔS72

tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstnk
nasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:45)

38) hIGF-1-Eab: ΔG1, ΔP2, ΔE3; R36A; ΔR71, ΔS72

tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstnk
nasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:46)

39) hIGF-1-Eab: ΔG1, ΔP2, ΔE3, ΔR37, ΔR71, ΔS72

tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstnk
asrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:47)

40) hIGF-1-Ea: ΔP2, ΔE3; R37A; ΔR71, ΔS72

gtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlkna
srgsagnknyrm (SEQ ID NO:48)

41) hIGF-1-Eb: ΔP2, ΔE3; R37A; ΔR71, ΔS72

gtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:49)

42) multimer hIGF-1-Eb: (ΔG1, ΔP2, ΔE3; R37A)-3xEb(ΔR71, ΔS72, ΔC-term 7 aa)-Eb(ΔR71, ΔS72)

tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnk
ntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeq
kegteaslqirgkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrrei
gsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ
ID NO:50)

43) multimer hIGF-1-Eb: (ΔP2, ΔE3; R37A)-3xEb(ΔR71, ΔS72, ΔC-term 7 aa)-Eb(ΔR71, ΔS72)

gtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpgge
qkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqr
eigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk
(SEQ ID NO:51)

44) hIGF-1-Ec: ΔP2, ΔE3; R37A; ΔR71, ΔS72

gtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:52)

10 45) hIGF-1-Ea: ΔE3; R37A; ΔR71, ΔS72

gptlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlkn
asrgsagnknyrm (SEQ ID NO:53)

46) hIGF-1-Eb: ΔE3; R37A; ΔR71, ΔS72

gptlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppst
nkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:54)

47) multimer hIGF-1-Eb: (ΔG1, ΔP2, ΔE3; R37A)-3xEb(ΔR71, ΔS72, ΔC-term 7 aa)-Eb(ΔR71, ΔS72)

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnk
ntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeq
kegteaslqirgkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrrei
gsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ
ID NO:55)

48) multimer hIGF-1-Eb: (ΔE3; R37A) -3xEb(ΔR71, ΔS72, ΔC-term 7 aa) - Eb(ΔR71, ΔS72)

gptlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppst
nkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpg
geqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeq
rreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk
(SEQ ID NO:56)

49) hIGF-1-Ec: ΔE3; R37A ; ΔR71, ΔS72

gptlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppst
nkntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:57)

50) hIGF-1-Ea: ΔE3; R37A ; ΔR71, ΔS72

gptlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlkn
asrgsagnknyrm (SEQ ID NO:58)

51) hIGF-1-Eb: ΔE3; R37A ; ΔR71, ΔS72

gptlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppst
nkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:59)

52) hIGF-1-Ec: ΔE3; R37A ; ΔR71, ΔS72

gptlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppst
nkntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:60)

53) hIGF-1-Eab: ΔE3; R37A ; ΔR71, ΔS72

gptlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppst
nknasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:61)

54) multimer hIGF-1-Eb: (ΔE3; R37A) - 3xEb(ΔR71, ΔS72, ΔC-term 7 aa) - Eb(ΔR71, ΔS72)

gptlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppst
nkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpg
geqkegteaslqirgkkkeqrreigsnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeq
rreigsnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsnaecrgkkgk
(SEQ ID NO:62)

55) hIGF-1-Ea: E3A; R37A ; ΔR71, ΔS72

gpatlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlk
nasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:63)

56) hIGF-1- Eb: E3A; R37A ; ΔR71, ΔS72

gpatlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqpps
tnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsnaecrgkkgk (SEQ ID NO:64)

57) hIGF-1-Ec: E3A; R37A ; ΔR71, ΔS72

gpatlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqpps
tnkntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:65)

58) hIGF-1-Eab: E3A; R37A ; ΔR71, ΔS72

gpatlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqpps
tnknasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsnaecrgkkgk (SEQ ID NO:66)

10 59) multimer hIGF-1-Eb: (E3A; R37A) - 3xEb(ΔR71, ΔS72, ΔC-term 7 aa) - Eb(ΔR71, ΔS72)

gpatlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqpps
tnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpg
geqkegteaslqirgkkkeqrreigsnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeq
rreigsnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsnaecrgkkgk
(SEQ ID NO:67)

60) hIGF-1-Ea: ΔP2, ΔE3; R37A; ΔR71, ΔS72

gtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlkna
srgsagnknyrm (SEQ ID NO:68)

61) hIGF-1-Eb: ΔP2, ΔE3; R37A; ΔR71, ΔS72

gtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsnaecrgkkgk (SEQ ID NO:69)

62) hIGF-1-Ec: ΔP2, ΔE3; R37A; ΔR71, ΔS72

gtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:181)

63) hIGF-1-Eab: ΔP2, ΔE3; R37A ; ΔR71, ΔS72

gtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
knasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:70)

5 64) multimer hIGF-1-Eb: (ΔP2, ΔE3; R37A) - 3xEb(ΔR71, ΔS72, ΔC-term 7 aa) - Eb(ΔR71, ΔS72)

gtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpgge
qkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqr
eigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk
(SEQ ID NO:71)

65) hIGF-1- Eb: ΔG1, ΔP2; E3X; R37A; ΔR71, ΔS72

Xtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:72)

66) hIGF-1-Ec: ΔG1, ΔP2; E3X; R37A; ΔR71, ΔS72

Xtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:73)

10

67) hIGF-1-Eab: ΔG1, ΔP2; E3X; R37A ; ΔR71, ΔS72

Xtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
knasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:74)

68) multimer hIGF-1-Eb: (ΔG1, ΔP2, E3X; R37A)-3xEb(ΔR71, ΔS72, ΔC-term 7 aa) - Eb(ΔR71, ΔS72)

Xtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpgge
qkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqr
eigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk
(SEQ ID NO:75)

15 69) hIGF-1-Ea: ΔG1, ΔP2; ΔE3; R37A; ΔR71, S72X

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksXvraqrhtdmpktqkevhlkna
srgsagnknyrm (SEQ ID NO:76)

70) hIGF-1-Eb: ΔG1, ΔP2; ΔE3; R37A; ΔR71, S72X

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksXvraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:77)

71) hIGF-1-Ec: ΔG1, ΔP2; ΔE3; R37A; ΔR71, S72X

5 tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksXvraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:78)

72) hIGF-1-Eab: ΔG1, ΔP2; ΔE3; R37A ; ΔR71, S72X

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksXvraqrhtdmpktqkyqppstn
knasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:79)

73) multimer hIGF-1-Eb: (ΔG1, ΔP2, ΔE3; R37A)-Eb(ΔR71, S72X; ΔC-term 7 aa)-2xEb(ΔR71, ΔS72, ΔC-term 7 aa) -
Eb(ΔR71, ΔS72)

10 tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplpakXsavraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpgge
qkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqr
eigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk
(SEQ ID NO:80)

74) hIGF-1-Ea: ΔG1, ΔP2; ΔE3; R37A ; ΔR71, ΔS72; N92X

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplpaksavraqrhtdmpktqkevhlkXas
rgsagnknyrm (SEQ ID NO:81)

75) hIGF-1-Eb: ΔG1, ΔP2; ΔE3; R37A ; ΔR71, ΔS72; C142X

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnk
ntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaeXrgkkgk (SEQ ID NO:82)

15 76) hIGF-1-Eab: ΔG1, ΔP2; ΔE3; R37A; ΔR71, ΔS72; C151X

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnk
nasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaeXrgkkgk (SEQ ID NO:83)

78) multimer hIGF-1-Eb: (ΔG1, ΔP2; ΔE3; R37A)-3xEb(ΔR71, ΔS72, ΔC-term 7 aa) -Eb(ΔR71, ΔS72; C71X)

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnk
 ntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeq
 kegteaslqirgkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrrei
 gsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaeXrgkkkgk (SEQ
 ID NO:84)

Ejemplo 79: Ensayo de proliferación de mioblastos

El ensayo de proliferación de mioblastos proporciona un indicador *in vitro* confiable de la actividad de IGF y se utiliza como modelo para factores que afectan mioblastos embrionarios y células satélite adultas. Los factores activos en este sistema se comportan de forma similar en cultivos primarios de mioblastos. La mejora de la proliferación *in vitro* de mioblastos mediante un péptido de esta invención indica su actividad en causar una mayor proliferación de mioblastos y, por lo tanto, un incremento en la cantidad final de miofibras en el útero. Además, una mejora similar de la proliferación de mioblastos indica que los péptidos de esta invención se pueden utilizar para mejorar la hipertrofia muscular de un adulto, por ejemplo, a través de la estimulación de la proliferación de células musculares satélite.

Ejemplo 80: Ensayo de tejido epitelial mamario

En animales lactantes, la cantidad de tejido epitelial mamario es un factor limitante en la producción de leche, ya que estas son las células que producen y secretan leche. Empleando sistemas *in vitro*, las células epiteliales obtenidas de glándulas mamarias de animales se puede estimular mediante IGF-1 o IGF-2 modificado de la presente invención para proliferar y producir cantidades mayores de constituyentes de la leche. Se puede demostrar adicionalmente que las células epiteliales mamarias estimuladas para proliferar en tal sistema de células *in vitro* se pueden reimplantar en almohadillas de grasas mamarias clarificadas y se pueden estimular para proliferar y/o producir leche en animales hembra lactantes.

Ejemplo 81: Medición de IGF-1 o IGF-2 en sangre u otros fluidos corporales

La cantidad efectiva del péptido administrada en forma parenteral por dosis se puede medir mediante una curva de respuesta a la dosis. Por ejemplo, los péptidos de IGF modificados de la invención se pueden medir en la sangre o los fluidos corporales del sujeto a ser tratado para determinar la dosificación. Alternativamente, se pueden administrar cantidades crecientes del péptido al sujeto y revisar los niveles en suero del sujeto para IGF-1 e IGF-2 modificados. La cantidad de péptido que va a ser empleada se puede calcular sobre una base molar con base en estos niveles en suero de IGF-1 o IGF-2 modificados.

Un método para determinar la dosificación apropiada del péptido implica la medición de un péptido del IGF de la invención en un fluido biológico tal como un fluido corporal o sanguíneo. La medición de tales niveles se puede hacer mediante cualquier medio, incluyendo RIA y ELISA. Después de medir los niveles de IGF, se pone en contacto el fluido con el péptido utilizando dosis únicas o múltiples. Después de esta etapa de contacto, se miden nuevamente los niveles de IGF en el fluido. Si los niveles de IGF en el fluido han caído en una cantidad suficiente para producir la eficacia deseada para la que se administra la molécula, entonces se puede ajustar la dosis de la molécula para producir la máxima eficacia. Este método se puede llevar a cabo *in vitro* o *in vivo*. Preferiblemente, este método se lleva a cabo *in vivo*, es decir, después de extraer el fluido de un sujeto y medir los niveles de IGF, el péptido se administra aquí al mamífero utilizando una dosis única o múltiple (esto es, se logra la etapa de contacto mediante la administración a un animal), y luego se vuelven a medir los niveles de IGF del fluido extraído del animal.

Otro método para determinar la dosificación es mediante el uso de anticuerpos con el péptido u otro método de detección para el péptido en el formato LIFA.

Ejemplo 82: Farmacocinéticas *in vivo* de hIGF-1-Ec 3mut

Ratones machos adultos (n = 3 /grupo) recibieron una inyección de bolo intravenosa (i.v.) de rhIGF-1 a razón de 1 mg/kg, y hIGF-1-Ec 3mut (descrito en el Ejemplo 3) a razón de 1,55 mg/kg. Se recolectaron especímenes de sangre en serie a los 5, 15, 30 y 60 minutos después de administración del material de prueba. Se determinaron las concentraciones en suero de rhIGF-1 y hIGF-1-Ec3mut mediante ELISA. Este ensayo es específico para hIGF-1.

Se administraron dosis equimolares de rhIGF-1 y hIGF-1-Ec3mut en forma i.v. en ratones. Los resultados muestran niveles significativamente altos de la proteína hIGF-1-Ec 3mut comparado con rhIGF-1 en todos los puntos de

tiempo examinados, que indican que el hIGF-1-Ec 3mut es metabólicamente más estable que el IGF-1 de 70 aminoácidos de longitud.

Tiempo (min)	IGF-1-Ec 3mut (nM)	IGF-1 (nM)
5	201,4	54,7
15	65,3	14,3
30	12	2,4
60	0,76	0,2

REIVINDICACIONES

1. Una proteína precursora del IGF-1 humano, en donde:
 - 5 (i) uno o más de los siguientes residuos de la proteína precursora se suprimen o mutan: G1, P2, E3, R36 y R37; y
 - (ii) la escisión del péptido E de IGF-1 mediante una proteasa se reduce mediante la modificación de la proteína precursora, en donde la modificación es la supresión o mutación de R71 o S72 de la proteína precursora.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde la proteína precursora comprende al péptido Ea.
3. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde la proteína precursora comprende al péptido Eb.
- 10 4. El polipéptido de la reivindicación 3, en donde se suprimen los últimos siete aminoácidos del terminal C de Eb.
5. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde la proteína precursora comprende al péptido Ec.
6. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en donde G1 de la proteína precursora es suprimido o mutado.
- 15 7. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en donde P2 de la proteína precursora es suprimido o mutado.
8. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en donde E3 de la proteína precursora es suprimido o mutado.
9. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en donde R36 de la proteína precursora es suprimido o mutado.
- 20 10. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en donde R36 es mutado a alanina.
11. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en donde R37 de la proteína precursora es suprimido o mutado.
12. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en donde R37 es mutado a alanina.
- 25 13. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, que comprende además la secuencia consenso de glicosilación ligada a N NXS/T.
14. El polipéptido de la reivindicación 3, que comprende además los aminoácidos 93-102 de Ea insertados entre los aminoácidos N95 y T96 de la Eb.
15. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, que comprende además un oligosacárido enlazado covalentemente a una cadena lateral de aminoácido de la proteína precursora.
- 30 16. El polipéptido de la reivindicación 15, en donde el oligosacárido está enlazado covalentemente a una cadena lateral de arginina de la proteína precursora.
17. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en donde un residuo de la proteína precursora es reemplazado por un aminoácido no natural.
18. El polipéptido de la reivindicación 17, en donde el aminoácido no natural comprende un grupo acetileno o azido.
- 35 19. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, que comprende además una fracción poli(etilenglicol) unida covalentemente a una cadena lateral de la proteína precursora.
20. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, que comprende además un péptido E adicional enlazado al terminal C de la proteína precursora.
21. Un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 8.
- 40 22. Un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 53.

23. Un polipéptido que comprende, desde el terminal N hasta el terminal C,
una proteína precursora del IGF-1 que comprende un primer péptido Eb, en donde
G1, P2, y E3 se suprimen
R36 y R37 se suprimen,
5 R71 y S72 se suprimen, y
se suprimen los últimos siete aminoácidos del terminal C del primer péptido Eb;
un segundo péptido Eb, en donde R71, S72, y los últimos siete aminoácidos del terminal C del segundo péptido Eb
se suprimen; un tercer péptido Eb, en donde R71, S72, y los últimos siete aminoácidos del terminal C del tercer
péptido Eb se suprimen; y un cuarto péptido Eb, en donde R71 y S72 se suprimen.
- 10 24. Una proteína precursora del IGF-2 humano, en donde:
(i) uno o más de los siguientes residuos de la proteína precursora se suprime o mutan: P4, S5, E6 y R38; y
(ii) la escisión del péptido E de IGF-2 por una proteasa se reduce mediante la modificación de la proteína precursora,
en donde la modificación es la supresión o mutación del R68 o D69 de la proteína precursora.
25. El polipéptido de la reivindicación 24, en donde P4 de la proteína precursora se suprime o se muta.
- 15 26. El polipéptido de la reivindicación 24 o la reivindicación 25, en donde S5 de la proteína precursora se suprime o
se muta.
27. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, en donde E6 de la proteína precursora se
suprime o se muta.
- 20 28. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, en donde R38 de la proteína precursora se
suprime o se muta.
29. Un polipéptido de cualquier reivindicación precedente para uso en terapia.
30. El uso del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28 para la fabricación de un medicamento para el
tratamiento de una enfermedad musculoesquelética, diabetes, muerte celular neuronal, o anemia.
- 25 31. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28 para uso en el tratamiento de una
enfermedad musculoesquelética, diabetes, muerte celular neuronal, o anemia.
32. El uso del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28 para la fabricación de un medicamento para el
tratamiento de una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o una lesión por quemadura.
33. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28 para uso en el tratamiento de la
EPOC o una lesión por quemadura.
- 30 34. Un ácido nucleico que codifica al polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-28.
35. Un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 34.
36. Una célula transfectada con un vector de acuerdo con la reivindicación 35.

FIG. 1A

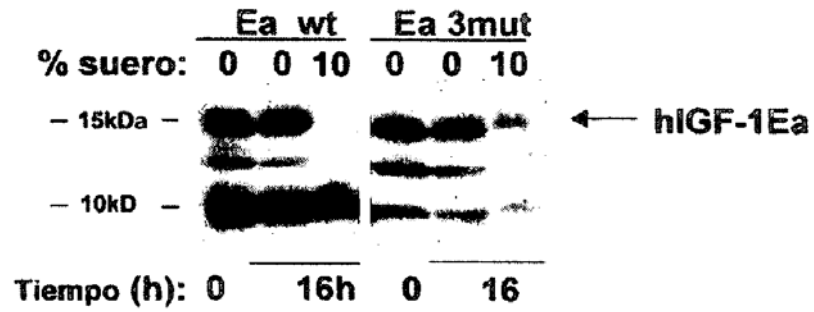


FIG. 1B

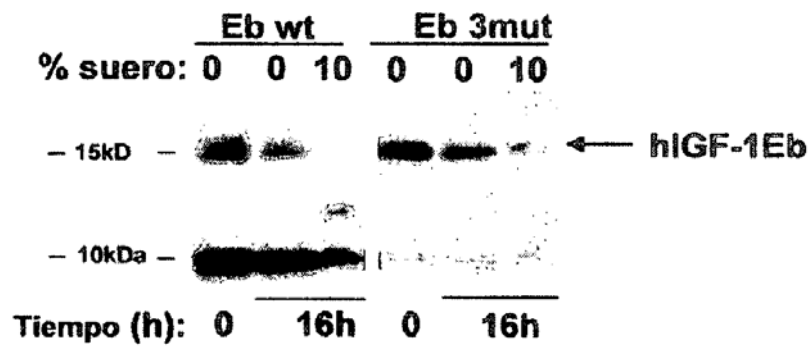


FIG. 1C

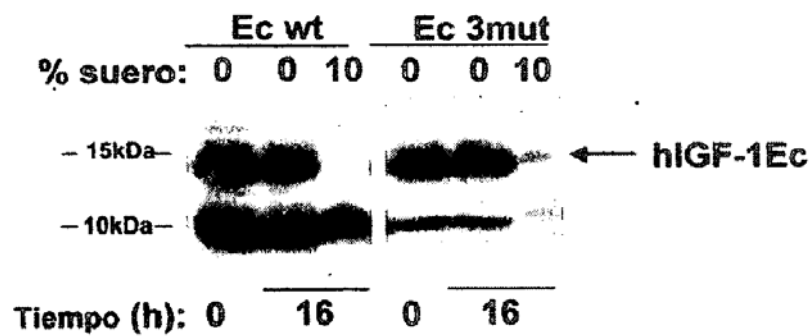


FIG. 2A

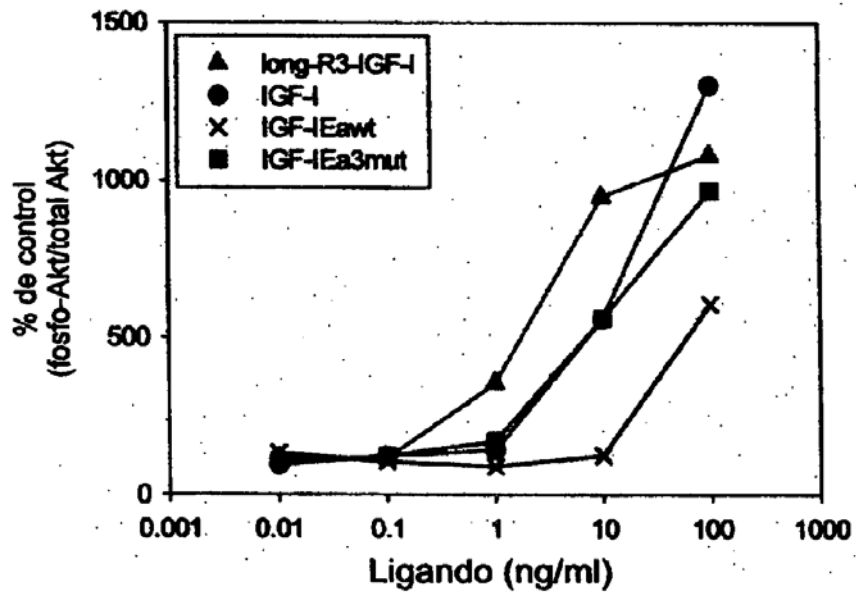


FIG. 2B

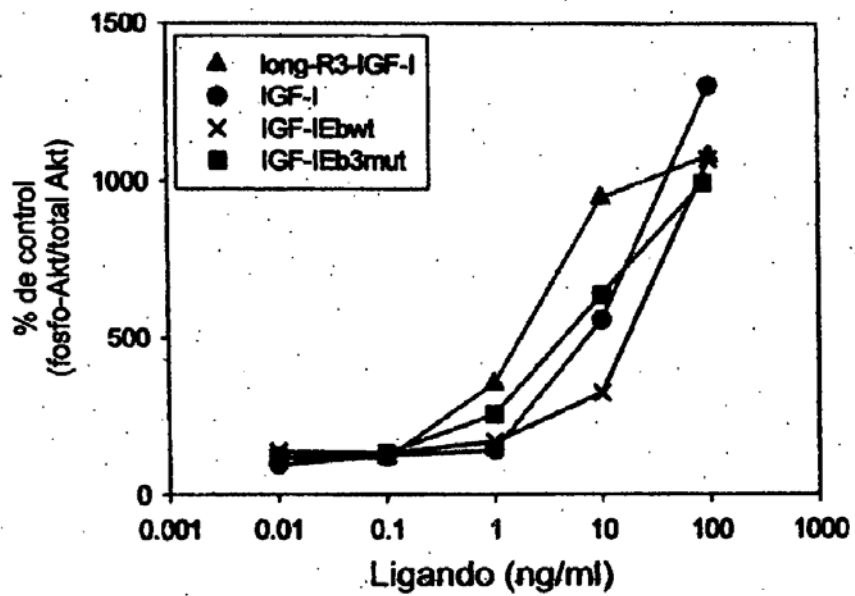


FIG. 2C

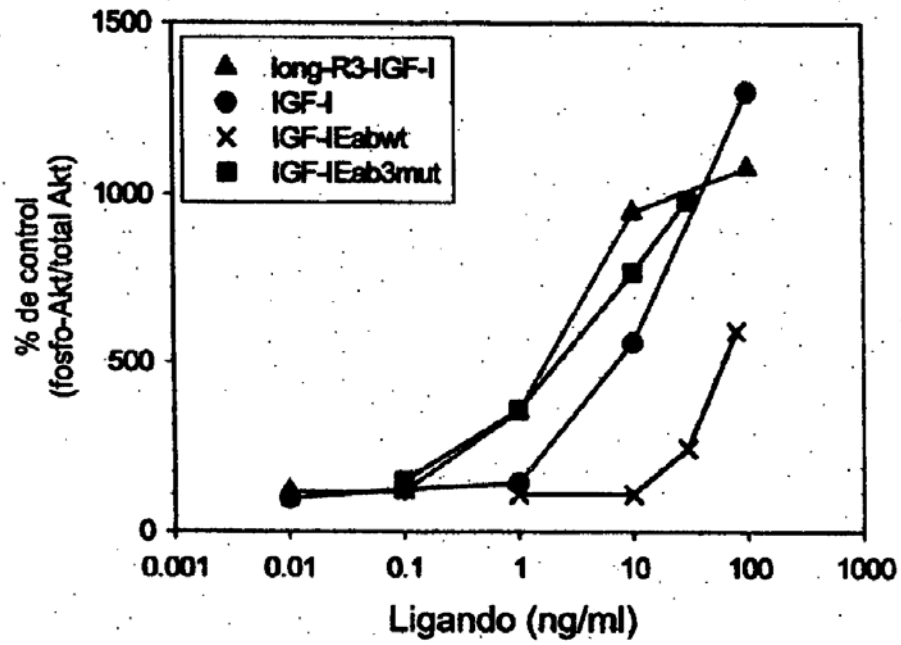


FIG. 2D

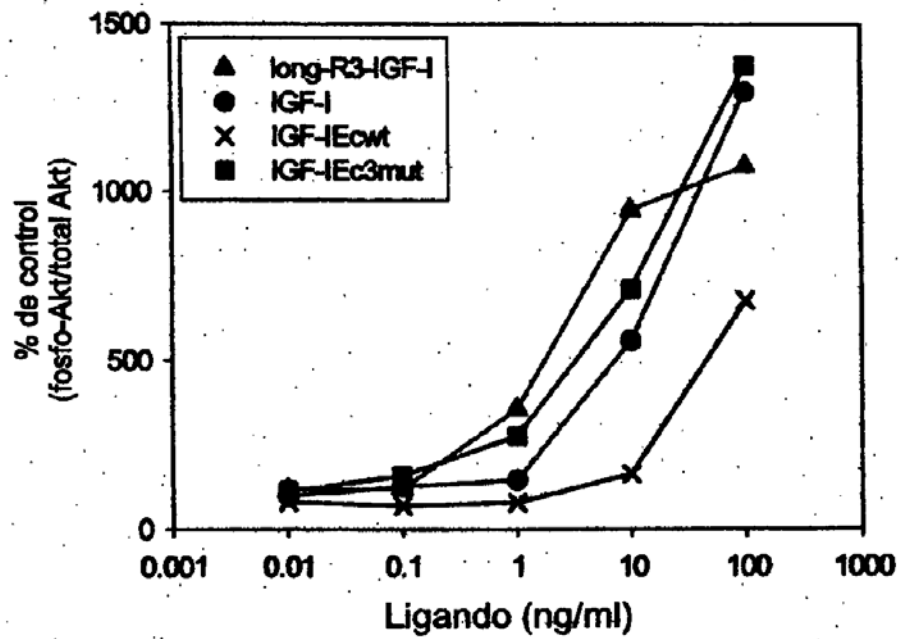


FIG. 3A

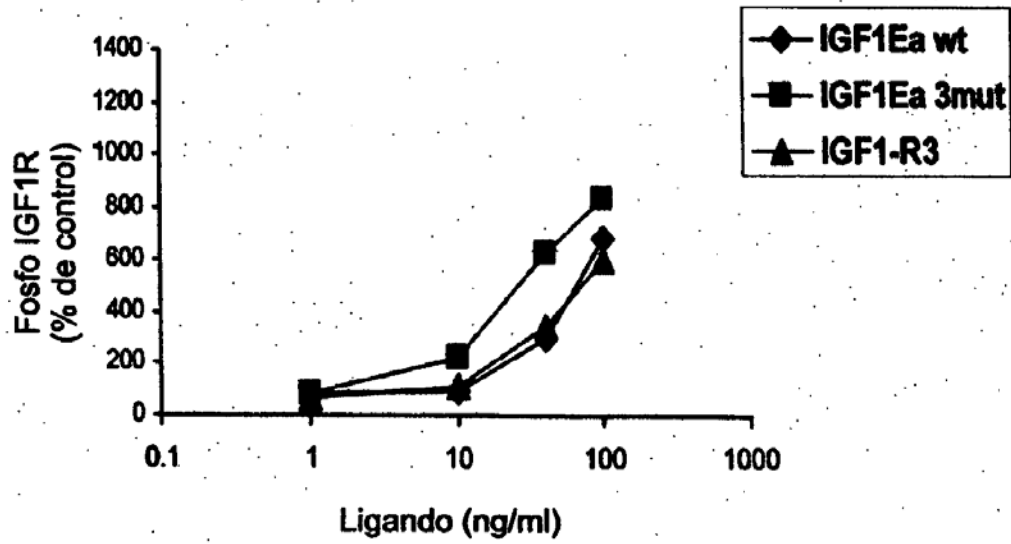


FIG. 3B

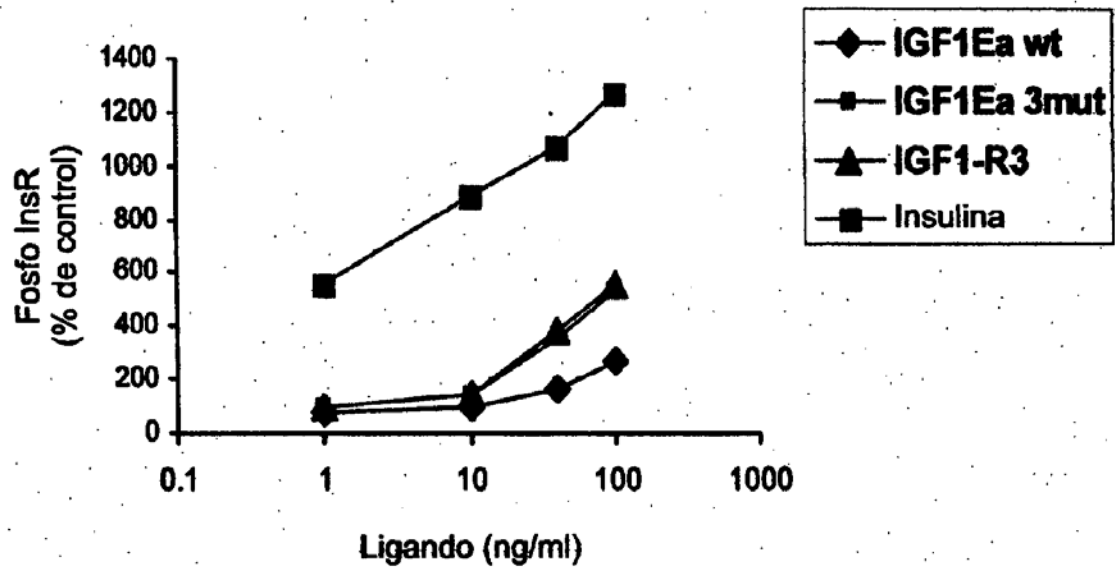


FIG. 3C

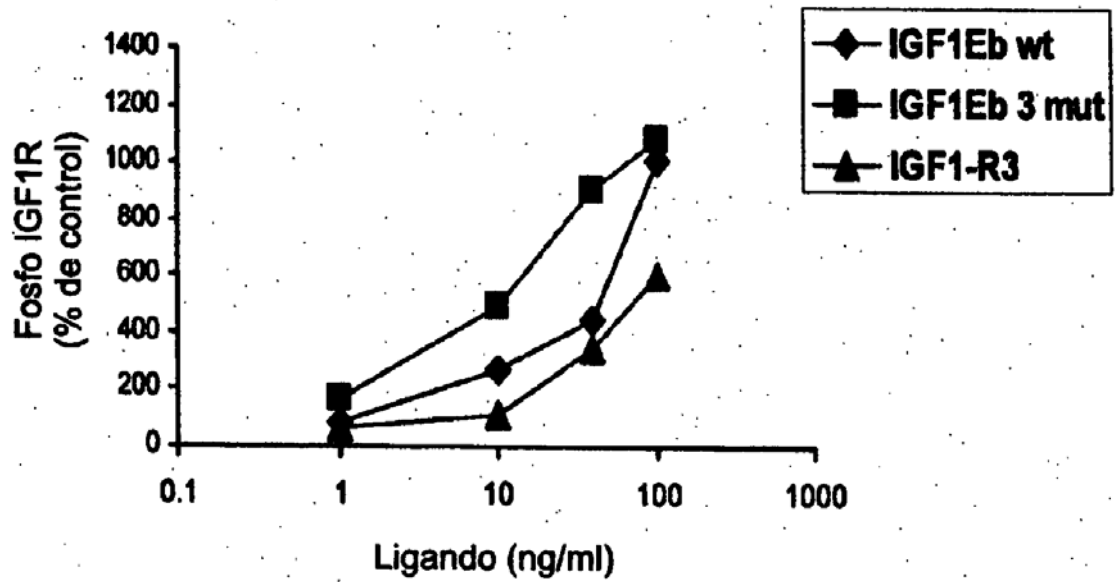


FIG. 3D

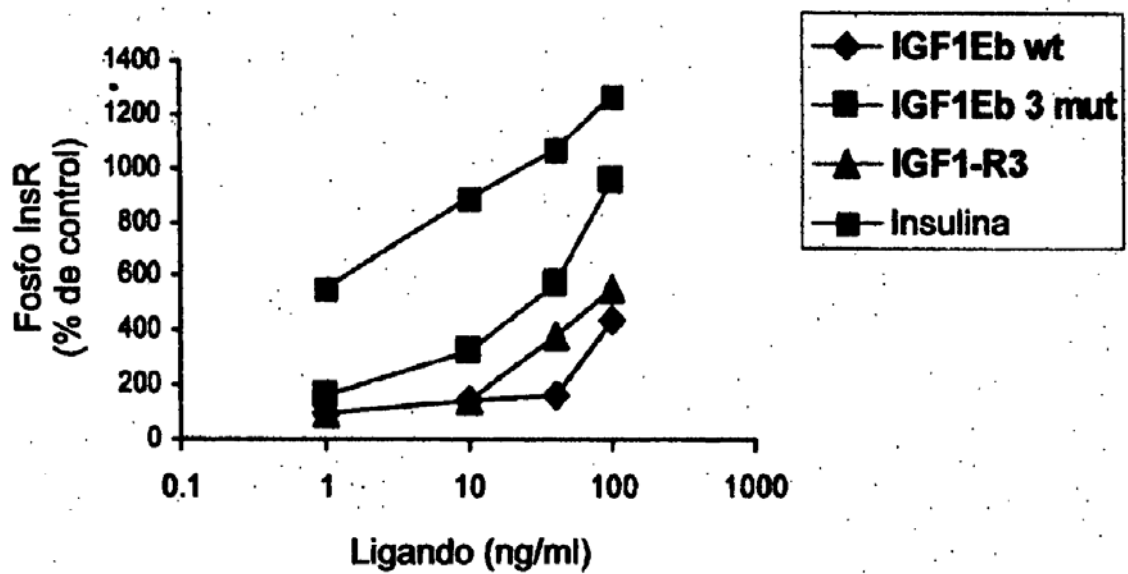


FIG. 4A

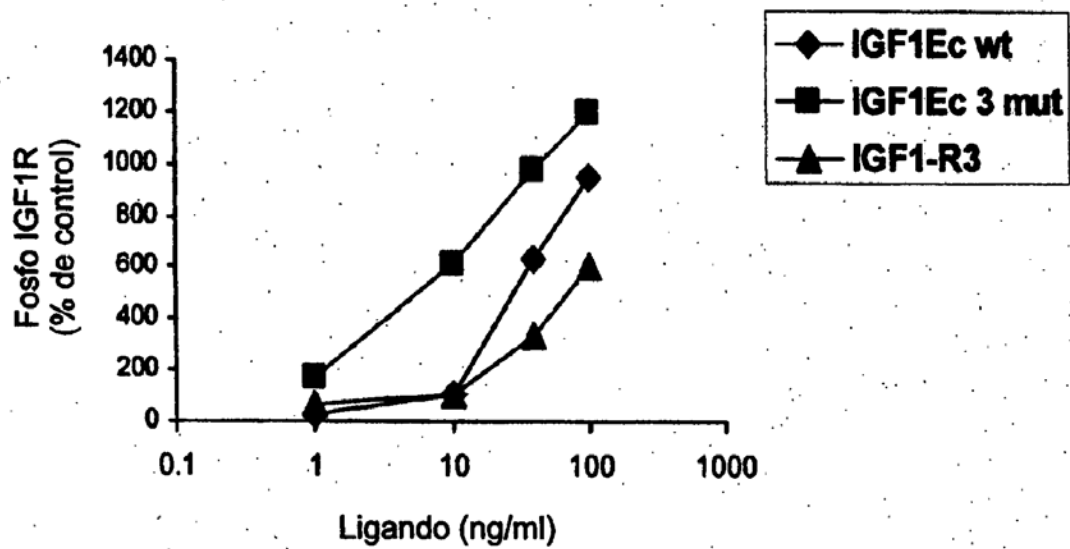


FIG. 4B

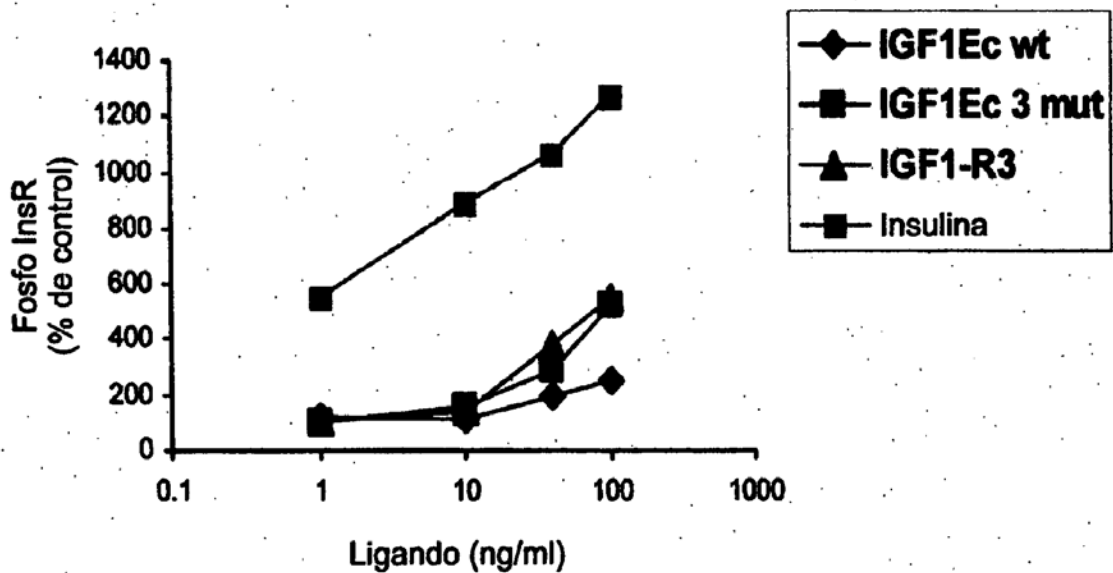


FIG. 4C

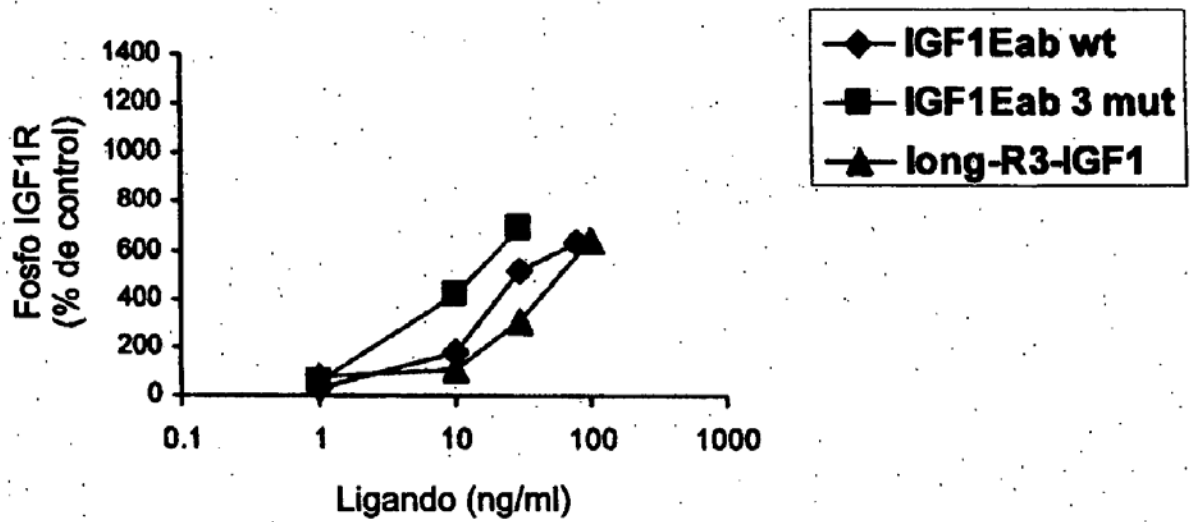


FIG. 4D

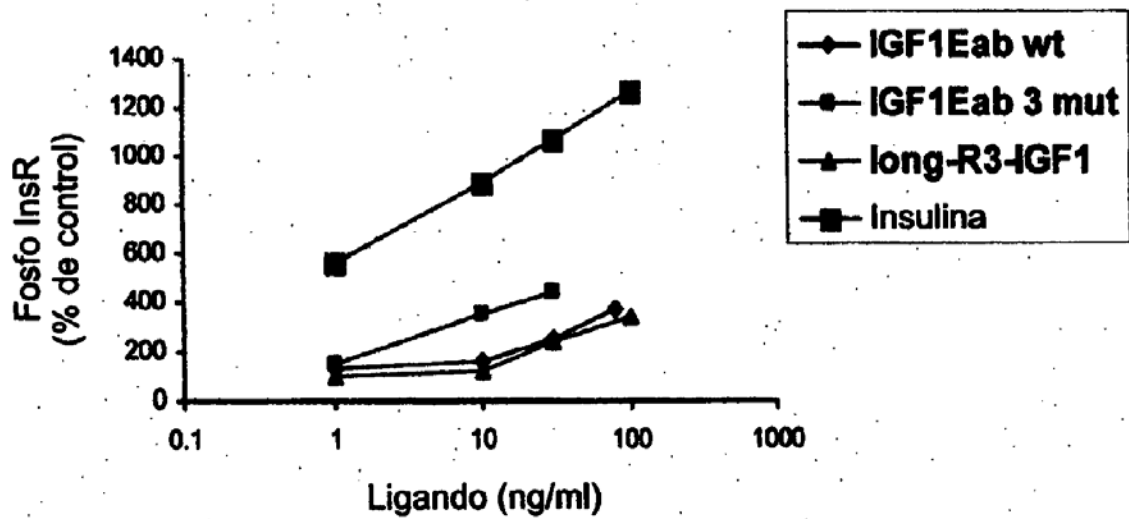


FIG. 5

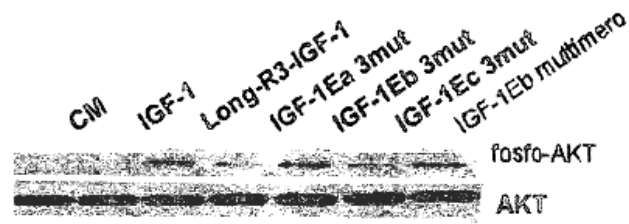


FIG. 6A

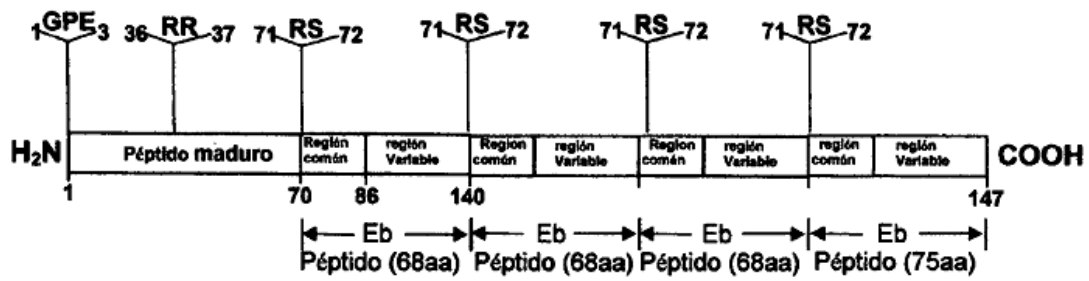


FIG. 6B

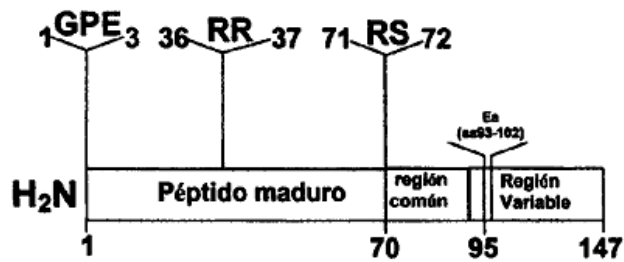


FIG. 7A

SEC ID NO

Mayoría

	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA 1
	50 60 70 80 90 100 110
IGF-1 Humano	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA 1
IA Humano EAW97695.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA 1
IB P05019 humano	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA 1
ref NP_999421.1 cerdo	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA 1
CAA35527 cerdo	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA 1
ABG88023.1 cerdo clase 1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA 1
ABG88024.1 cerdo clase 2	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA 1
refNP_001071296.1 vaca Hereford	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA 1
CAA33746.1 vaca	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA 1
ref NP_001009774.1 oveja	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA 85
ABB02295.1 oveja	-----LVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 86
BAB77524.1 cabra	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 87
P51457 cabra	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 87
P33712 perro	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1
IsoIB XP_866946.1 perro	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1
Iso2 XP_853117.1 perro	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1
Iso3 XP_866935.1 perro	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1
AAB47485.1 Equino	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1
XP_001094129.1 macaco Rhesus	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1
XP_001156459.1 chimpancé	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1
Q6GUL6 tigre	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1
Q6IVA5 panda rojo	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1
Q6JLX1 panda gigante	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 88
ABL98032.1 venado rojo	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 89
AAB48032.1 conejo	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 90
Q95222 conejo	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 90
P17647 cobayo	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1
ref NP_849197.1 rata	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 91
CAA29436.1 rata	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 92
Iso1 ref NP_034642.1 ratón	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 93
Iso2 ref NP_908941.1 ratón	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 93
AAL34535.1 Ratón	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 93
IsoEb AAX61180.1 ratón	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 94
NP_001004384.1 pollo	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 94
AAC26006.1 pavo	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 94
AAF67202.1 codorniz japonesa	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 94
P51462 codorniz japonesa	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 94
ABF57993.1 ganso	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 94
P33712 pato	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1
ABA02291.1 pato	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 94
AAA67268.1 Salmón	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 95
AAA67267.1 Salmón	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 95
ABC54785.1 Esterleto	GSETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 96
CAE52916.2 perca	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 97
Q02815 trucha	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 98
CAA09267.1 Halibut	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 97
AAQ56592.1 bagre	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 99
AAY21902.1 carpa	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 100
AAP78926.1 carpa	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 100
ABB05519.1 Danio gigante	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 101
NP_571900.1 pez zebra	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 102
ABH12114.1 succionador chino	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 103
ABE03747.1 erizo Barbus	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 100
AAT02176.1 pez agua dulce	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 104
AAC83443.1 pez dorado	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 105
AAA70330.1 rana	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 106
AAK16727.1 besugo	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 101
la P16501 rana	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 107
XP_001093911.1 macaco Rhesus	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1
XP_001373491.1 zarigüeya	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 108
AAT47735.1 cerdo	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1

FIG. 7B

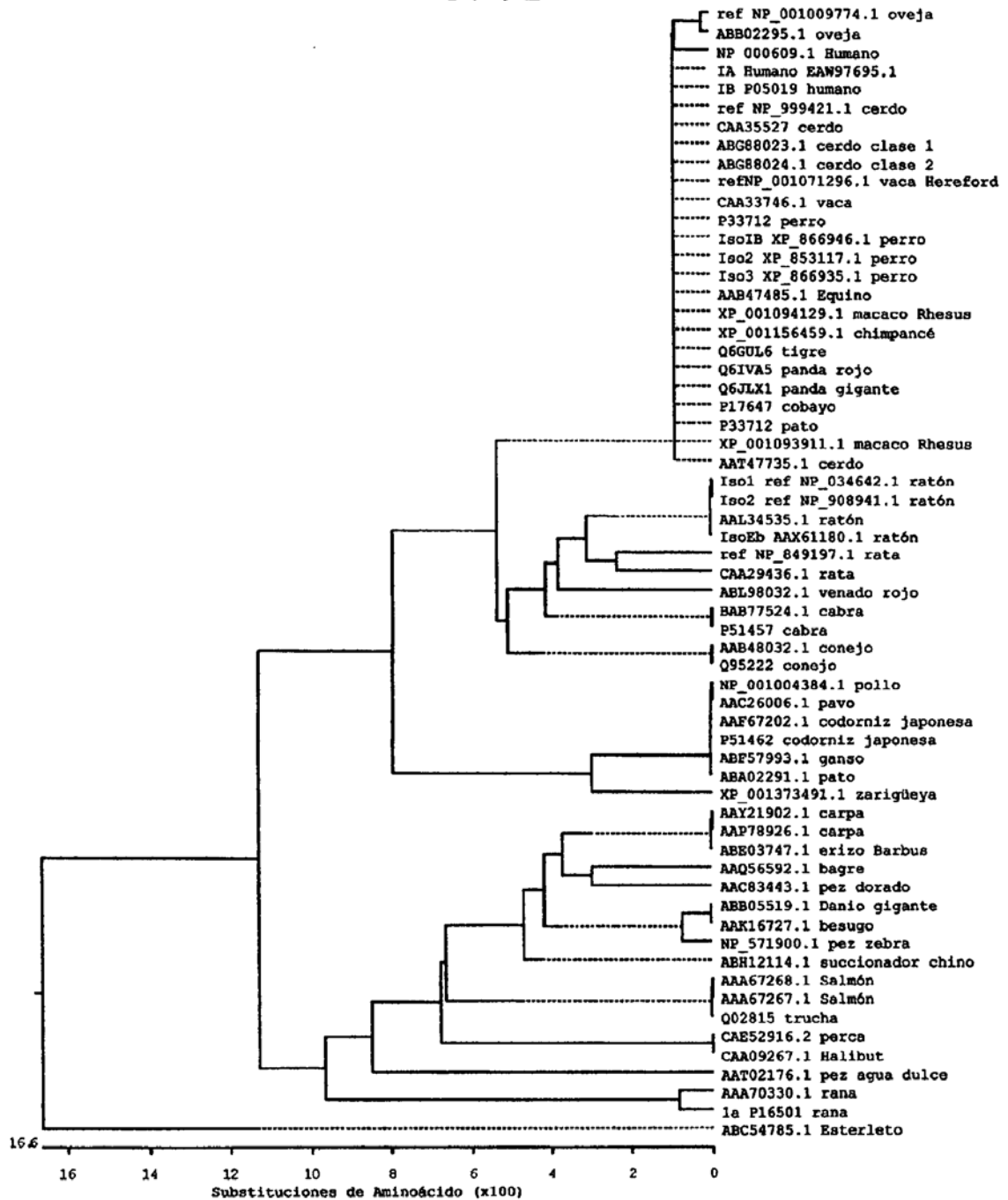


FIG. 8A

SEC ID NO

Mayoría

	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSTGNKNYRM 109
	-----+-----+-----+-----
	10 20 30
	-----+-----+-----+-----
Ea humano	RSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSSAGNKNYRM 2
ref NP_999421.1 cerdo	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSSGNKNYRM 109
CAA35527 cerdo	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSSGNKNYRM 109
ABG88023.1 cerdo clase 1	RSVRAQRHTDMPKARKEVHLKNTSRGSSGNKNYRM 110
ABG88024.1 cerdo cclase 2	RSVRAQRHTDMPKARKEVHLKNTSRGSSGNKNYRM 110
ref NP_001071296.1 vaca Hereford	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 111
CAA33746.1 vaca	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 111
ref NP_001009774.1 oveja	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 111
ABB02295.1 oveja	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 111
BAB77524.1 cabra	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 111
P51457 cabra	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 111
P33712 perro	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNASRGSSAGNKNY 112
Iso2 XP_853117.1 perro	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNASRGSSAGNKNYRM 113
Iso3 XP_866935.1 perro	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNASRGSSAGNKNYRM 113
AAB47485.1 equino	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 111
XP_001094129.1 macaco Rhesus	RSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSSAGNKNYRM 2
Q6GUL6 tigre	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNASRGSSAGNKNYRM 113
Q6IVA5 panda rojo	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNASRGSSAGNKNYRM 113
Q6JLX1 panda gigante	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNASRGSSAGNKNYRM 113
ABL98032.1 venado rojo	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 111
AAB48032.1 conejo	RSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 114
P17647 cobayo	RSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSSAGNKNYRM 2
ref NP_849197.1 rata	RSIRAQRHTDMPKTQKEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 115
CAA29436.1 rata	RSIRAQRHTDMPKTQKEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 115
AAL34535.1 ratón	RSIRAQRHTDMPKTQKEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 115
NP_001004384.1 pollo	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGNTGNRNYRM 116
AAC26006.1 pavo	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGNTGNRNYRM 117
AAF67202.1 codorniz japonesa	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGNTGNRNYRM 116
P51462 cordoniz japonesa	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGNTGNRNYRM 116
ABF57993.1 ganso	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGNTEN 118
P33712 pato	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNASRGSSAGNKNY 112
AAA67268.1 salmón	RSVRAQRHTDMPRTPEVHQKNSSRGNTGGRNYRM 119
AAA67267.1 salmón	RSVRAQRHTDMPRTPEVHQKNSSRGNTGGRNYRM 119
ABC54785.1 esterleto	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHKSNSRGNTGNRNYRI 120
CAE52916.2 percha	RSVRAQRHTDMPRAPKEVHQKNSSRGNTGGRNYRM 121
Q02815 trucha	RSVRAQRHTDMPRTPEVHQKNSSRGNTGGRNYRM 119
CAA09267.1 Halibut	RSVRAQRHTDMPRAPKEVHQKNSSRGTTGGRNYRM 122
AAQ56592.1 bagre	RSVREQRHTDTPKTPEVHQKNSSRGNTGGRNYRM 123
AAZ21902.1 carpa	RSIRAQRHTDSPKTAKEVHQKNSSRGNTGGRNYRM 124
AAP78926.1 carpa	RSVRAQRHTDSPRTAKEVHQKNSSRGNTGGRNYRI 125
ABB05519.1 Danio gigante	RSIRAQRHTDIPRTAKEVHQKNSSRGNTGGRNYRM 126
NP_571900.1 pez zebra	RSIRAQRHTDIPRTPEVHQKNSSRGNTGGRNYRM 127
ABH12114.1 succionador chino	RSIRAQRHTDIPRTPEVHQKNSSRGNTGGRNYRM 128
ABE03747.1 erizo Barbus	RSIRAQRHTDSPRTAKEVHQKNSSRGNTGGRNYRI 129
AAT02176.1 pez agua dulce	RSIRAQRHTDITRTAKEVHQKNSSRGITGGRNYRM 130
AAC83443.1 pez dorado	RSIRAQRHTDGTRTAKEVHQKNSSRGNTGGRNYRM 131
AAA70330.1 rana	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHPKNTSRGNTGSRGFRM 132
AAK16727.1 besugo	RSIRAQRHTDITRTAKEVHQKNSSRGNTGGRNYRI 133
1a P16501 rana	RSVRTQRHTDMPKAQKEVHPKNTSRGNTGSRGFRM 134

FIG. 8B

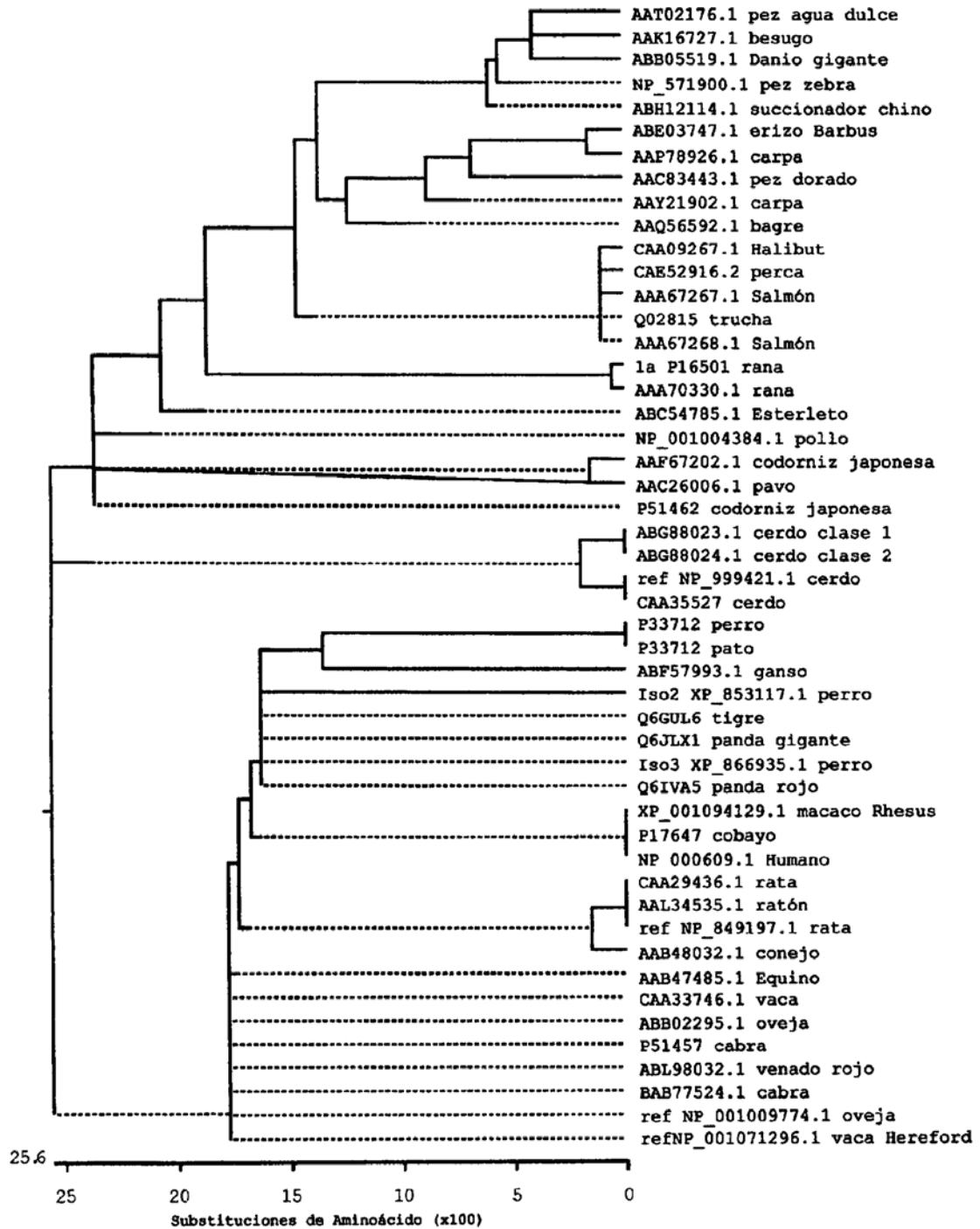


FIG. 9A

Mayoría

```

-----RSVRAQRHTDMPKTQKYPPSTNKKTKSQRRRKGGPKTHPGGEQKE-----
          10      20      30      40      50      60      70
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----
Eb humano      -----RSVRAQRHTDMPKTQKYPPSTNKKTKSQRRRKGGPKTHPGGEQKE-----
P05019 humano  -----RSVRAQRHTDMPKTQKYPPSTNKKTKSQRRRKGGPKTHPGGEQKE-----
AAT47735.1 cerdo -----RSVRAQRHTDMPKAQKYPPSTNKKTKSQRRRKGS--TFEEHK
AAU93628.1 vaca de la India -----YQPPSTNKKTKSQRRRKGGPKTHPGGEQKE
AAA03497.1 ganado HAQSGEGKPARGGGEGRPSYQPPSTNKKTKSQRRRKGGPKTHPGGEQKE
AAU93630.1 bufalo de agua -----YQPPSTNKKTKSQRRRKGGPKTHPGGEQKE
AAU93626.1 oveja -----YQLPSTNKKTKSQRRRKGGPKTHPGGEQKE
XP_866946.1 perro -----RSVRAQRHTDMPKAQKYHPPSTNKKTKSQRRRKGS--TFEECK
Q95222 conejo   -----RSVRAQRHTDMPKTQKYPPSTNKKTKSQRRRKGS--TFEEHK
XP_001156459.1 chimpancé -----RSVRAQRHTDMPKTQKYPPSTNKKTKSQRRRKGGPKTHPGGEQKE-----
XP_001093911.1 mono Rhesus -----RSVRAQRHTDMPKTQKYPPSTNKKTKSQRRRKGGPKTHPGGEQKE-----
NP_908941.1 ratón -----RSIRAQRHTDMPKTQKSPSLSTNKKTKLQRRRKGEKPKTHPGGEQKE-----
AAA41214.1 rata -----RSIRAQRHTDMPKTQKSPSLSTNKKTKLQRRRKGEKPKTHPGGEQKE-----
AAX61180.1 ratón -----RSIRAQRHTDMPKTQKSPSLSTNKKTKLQRRRKGS--TFEEHK

```

SEC ID NO

Mayoría

```

-----135
--
--
Eb humano      GK      3
P05019 humano  GK      3
AAT47735.1 cerdo      136
AAU93628.1 vaca de la India      137
AAA03497.1 ganado      138
AAU93630.1 bufalo de agua      139
AAU93626.1 oveja      140
XP_866946.1 perro      141
Q95222 conejo   142
XP_001156459.1 chimpancé      GK      143
XP_001093911.1 mono Rhesus      GK      144
NP_908941.1 ratón      145
AAA41214.1 rata      146
AAX61180.1 ratón      147

```

FIG. 9B

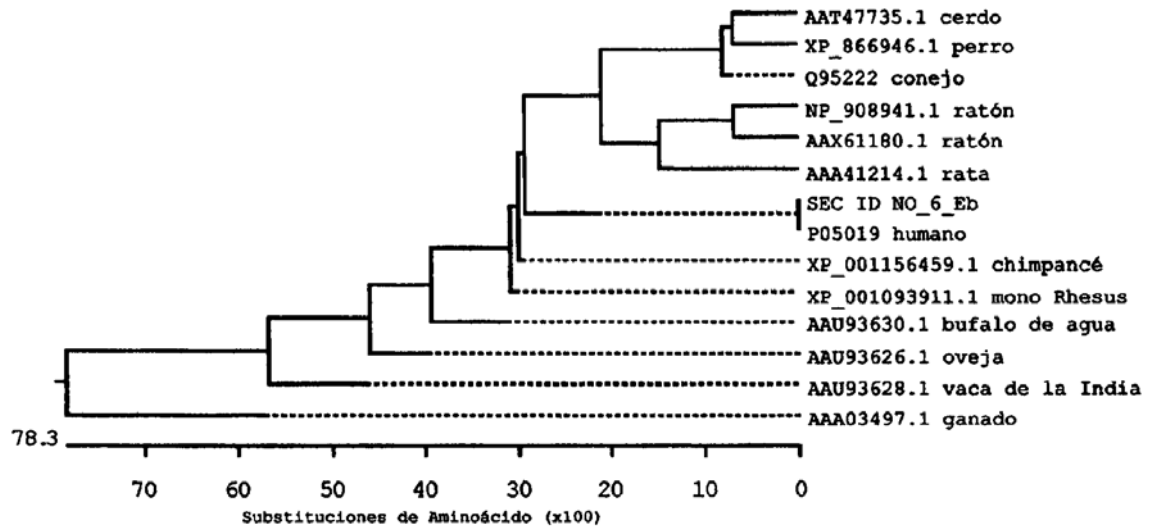


FIG. 10A

	RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNKKTKSQRRRKGSTFEEH-	SEC ID NO
Mayoria	-----+-----+-----+-----+ 10 20 30 40 -----+-----+-----+-----+	148
Ec humano	RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNKNKTSQRR-KGSTFEERK	4
EAW97695.1 humano	RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNKNKTSQRR-KGSTFEER	149
AAA96152.1 humano	RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNKNKTSQRR-KGSTFEER	149
AAT47735.1 cerdo	RSVRAQRHTDMPKAQKYQPPSTNKKTKSQRRRKGSTFEEH	150
Ib XP 866946.1 perro	RSVRAQRHTDMPKAQKYHPPSTTKRMKSQRRRKGSTFEEC	151
Q95222 conejo	RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNKKMKTSQRRRKGSTFEEH	152
XP_001094016.1 mono Rhesus	RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNKNKTSQRRRKGSTFEER	153
Ib AAX61180.1 ratón	RSIRAQRHTDMPKTQKSPSLSTNKKTKLQRRRKGSTFEEH	154
Isol NP_034642.1 ratón	RSIRAQRHTDMPKTQKSPSLSTNKKTKLQRRRKGSTFEEH	154
Ib A40912 rata	RSIRAQRHTDMPKTQKSQPLSTHKKRKLQRRRKGSTLEEH	155
Ib A26859 rata	RSIRAQRHTDMPKTQKSQPLSTHKKRKLQRRRKGSTLEEH	155

FIG. 10B

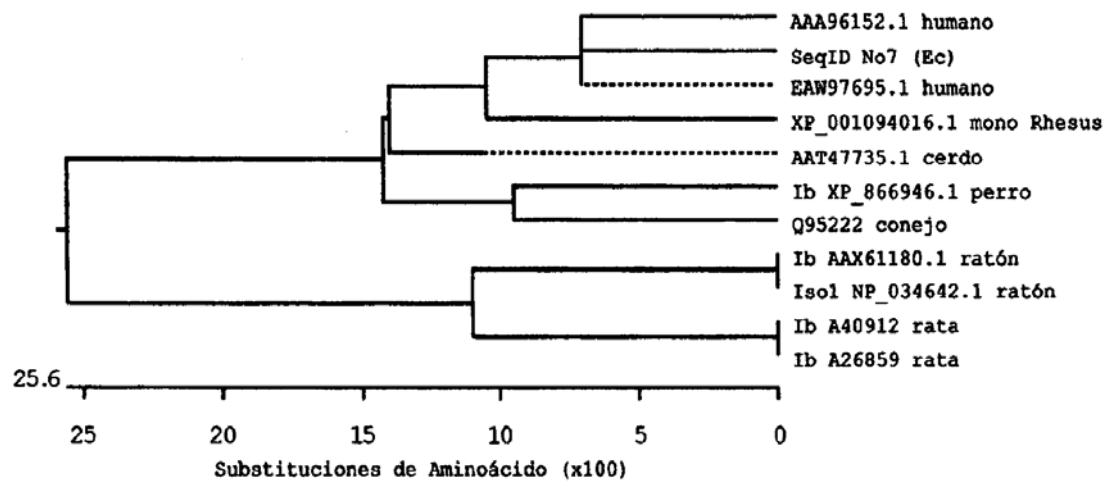


FIG. 11A

Mayoría

	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFS-----RPAS-RVNRRS--RGIVECCFRSCDLALLETCATPAK	
	+-----+-----+-----+-----+	
	10 20 30 40 50 60	
IGF-2 humano	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRP-----AS---RVSRRS--RGIVECCFRSCDLALLETCATPAK	
NP_000603.1 humano	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRP-----AS---RVSRRS--RGIVECCFRSCDLALLETCATPAK	
NP_999048.1 cerdo	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFS-----RPAS-RVNRRS--RGIVECCFRSCDLALLETCATPAK	
NP_776512.2 ganado	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFS-----RPSS-RINRRS--RGIVECCFRSCDLALLETCATPAK	
NP_001009311.1 oveja	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFS-----RPSS-RINRRS--RGIVECCFRSCDLALLETCATPAK	
Iso1 XP_540785.2 perro	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFS-----RPAS-RVTNRSS--RGIVECCFRSCDLALLETCATPAK	
Iso2 XP_851137.1 perro	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFS-----SRPAS-RVTNRSS--RGIVECCFRSCDLALLETCATPAK	
Iso3 XP_863200.1 perro	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSDAALLPPVGLPGRPAS-RVTNRSS--RGIVECCFRSCDLALLETCATPAK	
XP_421026.2 ave roja selvática	AYGTAEITLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFS-----RPVG-RNNRRIN--RGIVECCFRSCDLALLETCATPAK	
NP_113699.1 rata	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFS-----RPSS-RANRRS--RGIVECCFRSCDLALLETCATPAK	
NP_034644.1 ratón	AYGPGETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFS-----RPSS-RANRRS--RGIVECCFRSCDLALLETCATPAK	
XP_001153640.1 chimpancé	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSKA-----STPAAFPI TRPL--RRVQRCCRGGCPCPADLRDASFPRR	
Iso1 XP_001338042.1 pez zebra	EVASAETLCGGELVDALQFVCEDRGFYFS-----RPTSRNSRRSQNRGIVECCFSSCNLALLEQYCAKPAK	
Iso2a NP_001001815.1 pez zebra	EVASAETLCGGELVDALQFVCEDRGFYFS-----RPTSRNSRRSQNRGIVECCFSSCNLALLEQYCAKPAK	
Iso2b NP_571508.1 pez zebra	NVTAGETLCGGELVDTLQFVCGEDGFYIS-----RPN-RSNSRRQP--RGIVECCFRSCDLALLEQYCAKPVK	

Mayoría

	SERDVSTP-----PTVLDPNFPRYPVGKFQFYDTW-KQSAQRLRRGLPALLRARRGHMLAKELEAFREAKR-HRPLI	
	+-----+-----+-----+-----+	
	70 80 90 100 110 120 130	
IGF-2 humano	SERDVSTP-----PTVLDPNFPRYPVGKFQFYDTW-KQSTQRLRRGLPALLRARRGHMLAKELEAFREAKR-HRPLI	
NP_000603.1 humano	SERDVSTP-----PTVLDPNFPRYPVGKFQFYDTW-KQSTQRLRRGLPALLRARRGHMLAKELEAFREAKR-HRPLI	
NP_999048.1 cerdo	SERDVSTP-----PTVLDPNFPRYPVGKFQFYDTW-KQSAQRLRRGLPALLRARRGRTLAKELEAVREAKR-HRPLT	
NP_776512.2 ganado	SERDVSTP-----TTVLDDDTAYIPVGKFQFYDTW-KQSTQRLRRGLPALLRARRGRTLAKELEALREAKS-HRPLI	
NP_001009311.1 oveja	SERDVSTP-----TTVLDDDTAYIPVGKFQFYDTW-KQSTQRLRRGLPALLRARRGRTLAKELEALREAKS-HRPLI	
Iso1 XP_540785.2 perro	SERDVSTP-----PTVLDPNFPRYPVGKFQFYDTW-KQSAQRLRRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR-HRPLI	
Iso2 XP_851137.1 perro	SERDVSTP-----PTVLDPNFPRYPVGKFQFYDTW-KQSAQRLRRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR-HRPLI	
Iso3 XP_863200.1 perro	SERDVSTP-----PTVLDPNFPRYPVGKFQFYDTW-KQSAQRLRRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR-HRPLI	
XP_421026.2 ave roja selvática	SERDLSATSLAGL--PALNKEFQKPSPHAKYSKYNVWQKKSSQLQREVPGILRRARYRWQAEGLQAEEARAHHRPLI	
NP_113699.1 rata	SERDVSTS-----QAVLPDDFPYPYGKFFQDYTW-QQSAGRLLRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR-HRPLI	
NP_034644.1 ratón	SERDVSTS-----QAVLPDDFPYPYGKFFQDYTW-QQSAGRLLRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR-HRPLI	
NP_001153640.1 chimpancé	ESRHLLTS-----PFPSQDNFPRYPYGKFFQDYTW-KQSTQRLRRGLPALLRARRGHMLAKELEAFREAKR-HRPLI	
Iso1 XP_001338042.1 pez zebra	SERDVSTATSLQVI PVMALKQEVPRKHVTVKYSKYDVWQRKAQRLRRGI PAIRRAKKFRROAERIKAQEQLLH-HRPLI	
Iso2a NP_001001815.1 pez zebra	SERDVSTATSLQVI PVMALKQEVPRKHVTVKYSKYDVWQRKAQRLRRGI PAIRRAKKFRROAERIKAQEQLLH-HRPLI	
Iso2b NP_571508.1 pez zebra	SERDVSTATSLQVFPVSQALHKDT----INVKYSKYEVWQQKAQRLRRGVPSILLARKFRROMEKI QDEEQTSF-HRPLM	

SEC ID NO

Mayoría

	ALPTQDPA-HGGASPEASSNRK---	156
	+-----+-----+	
	140 150	
IGF-2 humano	ALPTQDPA-HGGAPPEMASNRKAYR	7
NP_000603.1 humano	ALPTQDPA-HGGAPPEMASNRK	157
NP_999048.1 cerdo	ARPTRDPAAHGASPEASSGHRK	158
NP_776512.2 ganado	ALPTQDPATHGGASASKASSD	159
NP_001009311.1 oveja	ALPTQDPATHGGASASKASSD	160
Iso1 XP_540785.2 perro	ALPTHDPATHGGASPEASGNQK	161
Iso2 XP_851137.1 perro	ALPTHDPATHGGASPEASGNQK	162
Iso3 XP_863200.1 perro	ALPTHDPATHGGASPEASGNQK	163
XP_421026.2 ave roja selvática	SLPSORPP-APRASPEATGPS	164
NP_113699.1 rata	VLPKPKDA-HGGASSEMSNHQ	165
NP_034644.1 ratón	VLPKPKDA-HGGASSEMSNHQ	166
NP_001153640.1 chimpancé	ALPTQDPA-HGGAPPEMASNRK	167
Iso1 XP_001338042.1 pez zebra	TLPKSKLP--ILLPTENIVSHK	168
Iso2a NP_001001815.1 pez zebra	TLPKSKLP--ILLPTENIVSHK	168
Iso2b NP_571508.1 pez zebra	TLPNRQPA--IVFHQISTSK	169

FIG. 11B

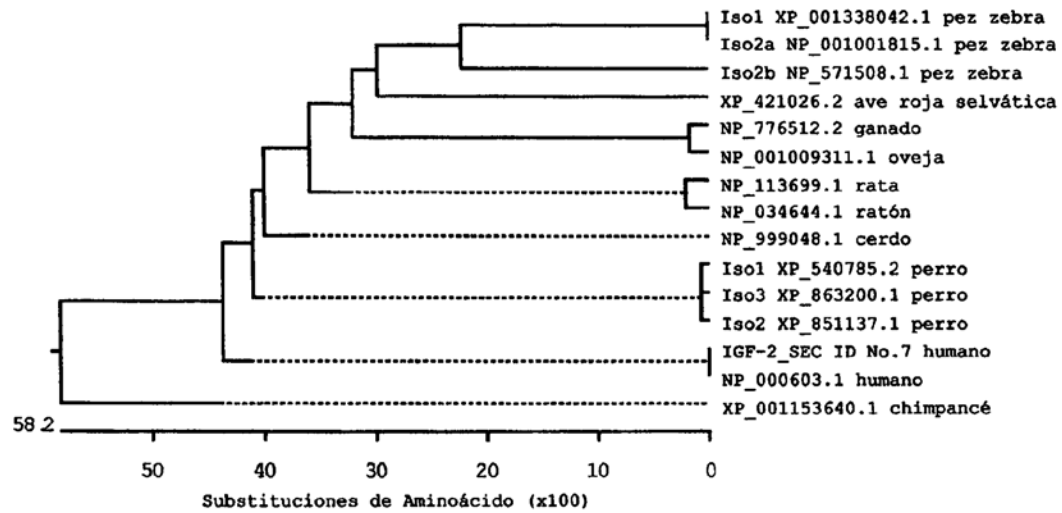


FIG. 12A

Mayoría	RDVSTP-----PTVL	PDNPF	FRYP	VGKGF	FQYD	TDW--KQSA	QRLRR	GLPAL	LRR	GRML	LAKE	LEAF	EAKR--	HRPLIAL
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	70		80		90		100		110		120		130	
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IGF-2 humano	RDVSTP-----	PTVL	PDNPF	FRYP	VGKGF	FQYD	TDW--KQST	QRLRR	GLPAL	LRR	GRHVL	AKE	LEAF	EAKR--
NP_006063.1 humano	RDVSTP-----	PTVL	PDNPF	FRYP	VGKGF	FQYD	TDW--KQST	QRLRR	GLPAL	LRR	GRHVL	AKE	LEAF	EAKR--
NP_999048.1 cerdo	RDVSTP-----	PTVL	PDNPF	FRYP	VGKGF	FQYD	TDW--KQSA	QRLRR	GLPAL	LRR	GRGTL	AKE	LEAF	EAKR--
NP_776512.2 ganado	RDVSAS-----	TTVL	PD	DDTAY	VGKGF	FQYD	DIW--KQST	QRLRR	GLPA	LRR	GRGT	L	AKE	LEALREAKS--
NP_001009311.1 oveja	RDVSAS-----	TTVL	PD	DDTAY	VGKGF	FQSD	TDW--KQST	QRLRR	GLPA	LRR	GRGT	L	AKE	LEALREAKS--
Isol XP_540785.2 perro	RDVSTP-----	PTVL	PDNPF	FRYP	VGKGF	FQYD	TDW--KQSA	QRLRR	GLPAL	LRR	ARR	GRML	AKE	LEAF
Isol2 XP_851137.1 perro	RDVSTP-----	PTVL	PDNPF	FRYP	VGKGF	FQYD	TDW--KQSA	QRLRR	GLPAL	LRR	ARR	GRML	AKE	LEAF
Isol3 XP_863200.1 perro	RDVSTP-----	PTVL	PDNPF	FRYP	VGKGF	FQYD	TDW--KQSA	QRLRR	GLPAL	LRR	ARR	GRML	AKE	LEAF
XP_421026.2 ave roja selvática	RDLSATSLAGL--	PAL	NKSG	FQKSH	AKYS	KNVQ	KKSS--	QSLRL	QRE	VPG	LRL	RRY	WQA	EGLQ
NP_113699.1 rata	RDVSTV-----	QAVL	PD	DFPR	YR	VGKGF	FKFD	TDW--KQSA	QRLRR	GLPAL	LRR	RR	GRML	AKE
NP_034644.1 ratón	RDVSTV-----	QAVL	PD	DFPR	YR	VGKGF	FQYD	TDW--KQSA	QRLRR	GLPAL	LRR	RR	GRML	AKE
NP_001153640.1 chimpancé	RHLLTS-----	PF	SSQ	DNF	FRYP	VGKGF	FQYD	TDW--KQST	QRLRR	GLPAL	LRR	RR	GRHML	AKE
Isol XP_001338042.1 pez zebra	RDVSATSLQVI--	PV	N	PA	LQ	KEV	PRKHV	TKY	SKY	QDV	WQR	KAA	QRLRR	GI
Isol2a NP_001001815.1 pez zebra	RDVSATSLQVI--	PV	N	PA	LQ	KEV	PRKHV	TKY	SKY	QDV	WQR	KAA	QRLRR	GI
Isol2b NP_571508.1 pez zebra	RDVSSTSLQVFP--	VSQAL	HKD	----	IN	V	KYS	KEV	WQ	KAA	QRLRR	GV	SI	L

SEC ID NO

Mayoría	PTQDPA-HGGASPEASSNRK	170
	140	150
IGF-2 humano	PTQDPA-HGGAPPEMASNRK	6
NP_000603.1 humano	PTQDPA-HGGAPPEMASNRK	6
NP_990048.1 cerdo	PTDRPAHGGASPEASGHRK	171
NP_776512.2 ganado	PTQDPAHGGASSKASD	172
NP_001009311.1 oveja	PTQDPATHGGASSEASD	173
Isol XP_540785.2 perro	PTHDPATHGGASPEASGNQK	174
Isol2 XP_851137.1 perro	PTHDPATHGGASPEASGNQK	174
Isol3 XP_863200.1 perro	PTHDPATHGGASPEASGNQK	174
XP_421026.2 ave roja selvática	PSQRPF-APRASPEATGQFE	175
NP_113699.1 rata	PKPDPA-HGGASSEMSNRQ	176
NP_034644.1 ratón	PKPDPA-HGGASSEMSNRQ	177
XP_001153640.1 chimpancé	PTQDPA-HGGAPPEMASNRK	178
Isol XP_001338042.1 pez zebra	PSKLFP--ILLPTENVVSHK	179
Isol2a NP_001001815.1 pez zebra	PSKLFP--ILLPTENVVSHK	179
Isol2b NP_571508.1 pez zebra	ENRQPA--IVPHQVISTSRK	180

FIG. 12B

