



CSA221044



Organización y
Digitalización CSA Ltda.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

08 - 129816

**SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION**

TITULO: POLIPETIDOS DE FACTOR DE CRECIMIENTO DE TIPO INSULINA
ESTABILIZADA

SOLICITANTE: NOVARTIS AG

DIRECCIÓN: Lichtstrasse 35, CH- 4056 Basel, Suiza

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ: 04 Diciembre de 2008



No. 08-129816- -00000-0000

Fecha: 2008-12-05 16:16:15 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eje: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 200PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 9 ene 2009 P2008/000196

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)Nombre: NOVARTIS AGDirección: Lichtstrasse 35, CH-4056 BaselNacionalidad o Domicilio: SuizaLugar de Constitución: Suiza

Teléfono: _____ Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADONombre: CARLOS R. OLARTEDirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79782747Bta
TP 74.295INVENTOR (ES)
(72)Nombre: 1) David Jonathan GLASS; 2) Mara FORNARODirección: 1) 341 Furnace Dock Road, #30, Cortlandt Manor, New York
10567 E.U.A.; 2) Eptingerstrasse 14, CH-4052 Basel, SuizaNacionalidad o Domicilio: 1) Estadounidense 2) Italiana

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/070468 Fecha June 6, 2007Publicación Internacional No. WO 2007/146689 Fecha Diciembre 21, 2007

6

Título (54) POLIPÉPTIDOS DE FACTOR DE CRECIMIENTO DE TIPO INSULINA
ESTABILIZADAClasificación Internacional (51) A61K 38/30, C07K 14/65Prioridad
SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

US

US

(32) Fecha

Junio 9, 2006

Octubre 20, 2006

Enero 24, 2007

(31) Número de
Solicitud

60/812,349

60/862,244

60/897,187

9

Comprobante de pago No. 08-93,850Fecha Diciembre 2 de 2008

**ANEXOS**

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. 07-026.397



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.



De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional

**FIGURA CARACTERÍSTICA:**


Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: _____

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NO. 08-129816- -00000-0000

Fecha: 2008-12-05 16:16:15 Dep: 2020 NULCRLACIONI
Tra: 11 PATENTILYII Lva: 378 FASLNACIONAL
Act: 411 PRESENTACION Folios: 200

***** CONSIGNACION *****

***** C O N C E P T O *****

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

TRADUCCIÓN OFICIAL DE UN DOCUMENTO QUE ESTÁ ORIGINALMENTE EN INGLÉS

Nota del traductor:

El documento adjunto de poder de Novartis AG a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana Maria Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro lleva los siguientes datos en inglés.

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

1. En esta fecha, día 30 de Agosto de 2006, yo, el suscrito Notario Público certifico por medio del presente la autenticidad de las firmas del señor Arthur Canonica, ciudadano de Corticiasca, Suiza, residente en Wisen/SO, Suiza, y del Sr. Pascal Traub, ciudadano de Riehen, Suiza, residente en Basilea, Suiza, ambos personas mayores de edad y con dirección comercial en Lichstrasse 35, 4056, Basilea, Suiza. La autenticidad de la firmas fue establecida por medio de la comparación.
2. Además, yo, el Notario Público, certifico por el presente que las anteriores personas han ejecutado el anterior documento como apoderados de Novartis AG.
3. Además, yo, el Notario Público certifico por el presente que Novartis AG, con su principal lugar de negocios en Basilea, Suiza, está debidamente constituida, está actualmente vigente -y que los propósitos para los cuales se otorgó el Documento de Poder están dentro del alcance de sus propósitos corporativos.


Traductor O.
JORGE E. SIERRA
Licencia 376 - 1997

5

4. Además, yo, el Notario Público, certifico por el presente que las anteriores personas tienen la autoridad para ejecutar el documento de Poder y que por este instrumento, su representación es legal.

La base para mis certificaciones de los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los siguientes documentos auténticos:

- Documento de Poder de Novartis AG fechado el 19 de junio de 2006 y
- Extracto del Registro de Comercio del Cantón de la ciudad de Basilea para Novartis AG, en Basilea, fechado el 25 de enero de 2006.

Basilea, Suiza, este día 30 de Agosto de 2006.

(Firmado) Dr. Matthias Staehelin, Notario Público del Cantón de la ciudad de Basilea, Suiza.

Mi licencia vence el 11 de Marzo de 2009.

Hay una Apostilla de Suiza, firmada por Heidi Fischer, bajo el No. 8049/13584.


Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA
Licencia 116 1000

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción verdadera y completa del documento adjunto: "Novartis"

Fecha: 12 de Septiembre de 2006.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes.

Licencia No. 376 de 1993, del Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 No. 99-13. Oficina 411. Bogotá, Colombia.

Teléfono: (57-1) 2182308, (57-1) 6232925.

E-mail: treseser1@yahoo.com. No. 8346

Traductor OJ
JORGE E. SIERRA
Licencia 376-1993

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Ana María Frieri
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro
Zayde Chahí
Jacqueline Chaparrí
José Luis Londoño
Felipe Mendoza
Simón Salina

Of Counsel
Guillermo Chahí
Graciela Mel

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel / Switzerland

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

El suscrito,

NOVARTIS AG

domiciliado en

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:

Date/Fecha: June 27, 2006

City/Country/Ciudad,País: Basel, Switzerland


Arthur Camouker

Pascal Thueb

8

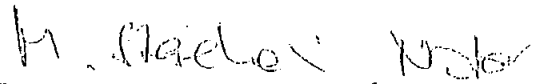
Attestation

- 1 On this date, the 30th (thirtieth) day of August 2006 (two thousand and six), I, the undersigned Notary Public certify herewith the authenticity of the signatures of **Mr. Arthur Canonica**, citizen of Corticiasca, Switzerland, residing in Wisen/SO, Switzerland and of **Mr. Pascal Traub**, citizen of Riehen, Switzerland, residing in Basel, Switzerland, both of legal age and with business address at, Lichtstrasse 35, 4056 Basel, Switzerland. The authenticity of the signatures was established by means of comparison.
- 2 Further, I, the Notary Public certify herewith that the foregoing persons have executed the foregoing document as proxy holders for Novartis AG.
- 3 Further, I, the Notary Public certify herewith that Novartis AG, having its principal place of business located in Basel / Switzerland, is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.
- 4 Further, I, the Notary Public certify herewith that the foregoing persons have the authority to execute the Power of Attorney and that for this instrument their representation is legal.

The foundation for my certifications contained in points 2 (two), 3 (three) and 4 (four) was the exhibition of the following authentic documents:

- Power of Attorney by Novartis AG dated June 19 (nineteen), 2006 (two thousand and six); and
- Extract from the Register of Commerce of the Canton of Basel-City for Novartis AG, in Basel, dated January 25 (twenty-five), 2006 (two thousand and six).

BASEL, Switzerland, this 30th (thirtieth) day of August 2006 (two thousand and six)



Dr. Matthias Staehelin, Notary Public
in the Canton of Basel-City, Switzerland

My license expires on March 11 (eleven),
2009 (two thousand and nine).

APOSTILLE

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)

This official document

2. is signed by *[Signature]*

3. in his/her function as *[Signature]*

4. and certified by the seal of the *[Signature]*

Certified at *Basel*, *2008*

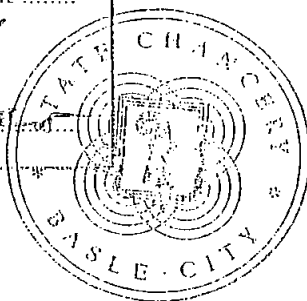
5. in Basel (Bâle) 6. on *[Signature]*

7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

8. no. *[Signature]*

9. Seal/stamp: 10. Signature: *[Signature]*

Heidi Fischer



CESIÓN

Por buena y onerosa consideración, del cual se acusa recibo suficiente, nosotros

(1) David Jonathan GLASS, y (2) Mara FORNARO

Respectivamente residiendo en:

(1) 3414 Furmaco Dock Road, No. 30, Cortlandt Manor, New York
10567 Estados Unidos de America, residente en Estados Unidos de America.

(2) Eptingerstrasse 14, 4052 Basilea, Suiza, residente en Italia.

Por medio de la presente vendemos y transferimos a NOVARTIS AG, una compañía constituida bajo las leyes de la confederación Suiza, de Lichstrasse 35, 4056 Basilea, Suiza y sus sucesores, cesionarios y representantes legales todos nuestros derechos titulo e interés para todos los países del mundo, excepto Austria, y Novartis Pharma GmbH, una compañía constituida bajo las Leyes de Austria de Bruner Strasse 59, 1230 Vienna, Austria y sus sucesores, cesionarios y representantes legales todos nuestros derechos titulo e interés para Austria (Novartis AG y Novartis Pharma GmbH, llamados de ahora en adelante colectivamente los CESIONARIOS) en y para (1) todos nuestros inventos y descubrimientos descritos en la solicitud de patente titulada:

POLIPEPTIDOS DE UN FACTOR DE CRECIMIENTO TIPO INSULINA ESTABILIZADOS

Y presentada en la Oficina de Patentes y Marcas Registradas de Los Estados Unidos De América el 6 de Junio de 2007 y de acuerdo con la Solicitud número _____ * y/o archivada bajo el número **PCT/US2007/70468**, (2) la solicitud de Patente identificada en (1), (3) todas las fases nacionales de dicha solicitud de patente internacional identificada en, (1), (4) todas las demás solicitudes de patentes en todas las regiones y países que reivindiquen prioridad de la(s) solicitud(es) de Patentes Provisionales o no provisionales presentada(s) en la Oficina de Patentes y Marcas Registradas de Los Estados Unidos el **9 de junio de 2006** y de acuerdo con la solicitud numero **60/812,349**, y el **24 de enero de 2007** de acuerdo con la solicitud numero **60/897,187** (5) por todas las solicitudes de Patentes, todos los derechos de prioridad basados en la solicitud de Patente en Los Estados Unidos identificada en (4) en todos los países y regiones bajo la convención de Paris para la protección de la propiedad industrial, la Convención Inter-Americana relacionado con Patentes, Invenciones Diseños y Modelos Industriales y todos los demás convenios internacionales a los cuales esté suscrito o que intente hacerlo, y si la Patente de los Estados Unidos identificada en (4) es una solicitud de Patente provisional, bajo 35USC 119(e)

//

(incluyendo el derecho a presentar solicitud de Patente en dichas invenciones y descubrimientos en nombre de los CESIONARIOS o sus designados o en nuestros nombres, a su elección y de acuerdo a las leyes aplicables en todos los países o regiones), (6) Todas las continuaciones o divisiones de cualquiera de las solicitudes de Patente en Los Estados Unidos o de solicitud de Patente Internacional identificada en (1) y cualquier solicitud de Patente dentro del rango de (4) (incluyendo futuras continuaciones y divisiones tales como, pero no limitadas a, continuaciones de continuaciones de divisiones), (7) todas las Patentes que sean otorgadas en cualquiera de dichas solicitudes de Patente, (8) todas los registros de y confirmaciones de, y certificados de importación basados en, una o mas dichas Patentes y (9) todos los re-otorgamientos, renovaciones, y extensiones de dichas patentes, registros, confirmaciones y certificados de importación y certificados de re reexaminación, expedidos para dichas patentes y certificados de protección basados en dichas patentes y solicitudes para tales re otorgamientos, renovaciones, extensiones, certificados de re-exanimación y certificados de protección, así mismo para ser conservada y disfrutada por dichos CESIONARIOS y sus sucesores, asignados y representantes legales, en su totalidad por dichas patentes, registros, confirmaciones, certificados de importación, certificados de reexaminación, certificados suplementarios de protección, re otorgamientos, renovaciones y extensiones que puedan ser expedidas, proporcionar todos los términos para que todas las patentes puedan ser concedidas, para conservar y disfrutar plenamente y totalmente por nosotros, así mismo como lo haríamos si esta cesión no hubiera sido vendida y transferida.

*Nosotros por medio del presente autorizamos al CESIONARIO y sus representantes para incorporar en este instrumento el número de la solicitud y la fecha de presentación de dicha solicitud cuando esta sea notificada.

Y por medio de la presente nosotros convenimos y acordamos que en cualquier momento, al requerirse y a expensas del CESIONARIO o sus sucesores asignados o representantes legales, ejecutaremos y entregaremos cualquier y todos los documentos necesarios y deseables para perfeccionar el titulo de los anteriores inventos o descubrimientos, solicitudes de patente, registros confirmaciones, certificados de importación, re-otorgamientos, renovaciones, extensiones, certificados de reexaminación, certificados de protección adicional dentro del rango de (8) y (9) a nombre del CESIONARIO, sus cesionarios, sucesores, u otros representantes legales, incluyendo la ejecución y consecución de cualquier y todo documento adicional que evidencie esta cesión y venta según sea necesario o deseable en la Oficina de Patentes u otra Oficina o Agencia para la Propiedad Intelectual o similar de cualquier país o región, (ii) al requerirse, pero a expensas del CESIONARIO o de sus sucesores, asignados, o representantes legales ejecutaremos todas las solicitudes dentro del rango de adicionales de Patente (3), (4) y (6) y todas las solicitudes dentro del rango (8) o (9) y (iii) y realizaremos las declaraciones necesarias juramentadas y realizaremos todos los actos jurídicos necesarios para ello, sin compensación adicional, pero a expensas del CESIONARIO, sus sucesores, cesionarios, u otros representantes legales.

Ejecutado el 10 de Mayo de 2007.

David Jonathan GLASS, (firma ilegible) L.S.

RECONOCIMIENTO

Estado de Massachussetts)
) S.S.:
Condado de middlesex)

El día 10 de Mayo del 2007, se presento ante mí personalmente **David Jonathan Glass** demostrando ante mi ser la misma persona descrita aquí y de ser quien ejecuto este documento y reconoce haberlo hecho por su propia voluntad con el propósito aquí descrito.

Sellado.

Firma ilegible
Notario Público

CESIÓN

Por buena y onerosa consideración, del cual se acusa recibo suficiente, nosotros

(1) David Jonathan GLASS y (2) Mara FORNARO

Respectivamente residiendo en:

- (1) 3414 Furmaco Dock Road, No. 30, Cortlandt Manor, New York
10567 Estados Unidos de America, residente en Estados Unidos de America.
- (2) Eptingerstrasse 14, 4052 Basilea, Suiza, residente en Italia.

Por medio de la presente vendemos y transferimos a NOVARTIS AG, una compañía constituida bajo las leyes de la confederación Suiza, de Lichstrasse 35, 4056 Basilea, Suiza y sus sucesores, cesionarios y representantes legales todos nuestros derechos titulo e interés para todos los países del mundo, excepto Austria, y Novartis Pharma GmbH, una compañía constituida bajo las Leyes de Austria de Bruner Strasse 59, 1230 Vienna, Austria y sus sucesores, cesionarios y representantes legales todos nuestros derechos titulo e interés para Austria (Novartis AG y Novartis Pharma GmbH, llamados de ahora en adelante colectivamente los CESIONARIOS) en y para (1) todos nuestros inventos y descubrimientos descritos en la solicitud de patente titulada:

POLYPEPTIDOS DE UN FACTOR DE CRECIMIENTO TIPO INSULINA ESTABILIZADOS

Y presentada en la Oficina de Patentes y Marcas Registradas de Los Estados Unidos De América el 6 de Junio de 2007 y de acuerdo con la Solicitud número _____* y/o archivada bajo el número **PCT/US2007/70468**, (2) la solicitud de Patente identificada en (1), (3) todas las fases nacionales de dicha solicitud de patente internacional identificada en, (1), (4) todas las demás solicitudes de patentes en todas las regiones y países que reivindiquen prioridad de la(s) solicitud(es) de Patentes Provisionales o no provisionales presentada(s) en la Oficina de Patentes y Marcas Registradas de Los Estados Unidos el **9 de junio de 2006** y de acuerdo con la solicitud numero **60/812,349**, y el **24 de enero de 2007** de acuerdo con la solicitud numero **60/897,187** (5) por todas las solicitudes de Patentes, todos los derechos de prioridad basados en la solicitud de Patente en Los Estados Unidos identificada en (4) en todos los países y regiones bajo la convención de Paris para la protección de la propiedad industrial, la Convención Inter-Americana relacionado con Patentes, Invenciones Diseños y Modelos Industriales y todos los demás convenios internacionales a los cuales esté suscrito o que intente hacerlo, y si la Patente de los Estados Unidos identificada en (4) es una solicitud de Patente provisional, bajo 35USC 119(e)

(incluyendo el derecho a presentar solicitud de Patente en dichas invenciones y descubrimientos en nombre de los CESIONARIOS o sus designados o en nuestros nombres, a su elección y de acuerdo a las leyes aplicables en todos los países o regiones), (6) Todas las continuaciones o divisiones de cualquiera de las solicitudes de Patente en Los Estados Unidos o de solicitud de Patente Internacional identificada en (1) y cualquier solicitud de Patente dentro del rango de (4) (incluyendo futuras continuaciones y divisiones tales como, pero no limitadas a, continuaciones de continuaciones de divisiones), (7) todas las Patentes que sean otorgadas en cualquiera de dichas solicitudes de Patente, (8) todas los registros de y confirmaciones de, y certificados de importación basados en, una o mas dichas Patentes y (9) todos los re-otorgamientos, renovaciones, y extensiones de dichas patentes, registros, confirmaciones y certificados de importación y certificados de re reexaminación, expedidos para dichas patentes y certificados de protección basados en dichas patentes y solicitudes para tales re otorgamientos, renovaciones, extensiones, certificados de re-exanimación y certificados de protección, así mismo para ser conservada y disfrutada por dichos CESIONARIOS y sus sucesores, asignados y representantes legales, en su totalidad por dichas patentes, registros, confirmaciones, certificados de importación, certificados de reexaminación, certificados suplementarios de protección, re otorgamientos, renovaciones y extensiones que puedan ser expedidas, proporcionar todos los términos para que todas las patentes puedan ser concedidas, para conservar y disfrutar plenamente y totalmente por nosotros, así mismo como lo haríamos si esta cesión no hubiera sido vendida y transferida.

*Nosotros por medio del presente autorizamos al CESIONARIO y sus representantes para incorporar en este instrumento el número de la solicitud y la fecha de presentación de dicha solicitud cuando esta sea notificada.

Y por medio de la presente nosotros convenimos y acordamos que en cualquier momento, al requerirse y a expensas del CESIONARIO o sus sucesores asignados o representantes legales, ejecutaremos y entregaremos cualquier y todos los documentos necesarios y deseables para perfeccionar el titulo de los anteriores inventos o descubrimientos, solicitudes de patente, registros confirmaciones, certificados de importación, re-otorgamientos, renovaciones, extensiones, certificados de reexaminación, certificados de protección adicional dentro del rango de (8) y (9) a nombre del CESIONARIO, sus cesionarios, sucesores, u otros representantes legales, incluyendo la ejecución y consecución de cualquier y todo documento adicional que evidencie esta cesión y venta según sea necesario o deseable en la Oficina de Patentes u otra Oficina o Agencia para la Propiedad Intelectual o similar de cualquier país o región, (ii) al requerirse, pero a expensas del CESIONARIO o de sus sucesores, asignados, o representantes legales ejecutaremos todas las solicitudes dentro del rango de adicionales de Patente (3), (4) y (6) y todas las solicitudes dentro del rango (8) o (9) y (iii) y realizaremos las declaraciones necesarias juramentadas y realizaremos todos los actos jurídicos necesarios para ello, sin compensación adicional, pero a expensas del CESIONARIO, sus sucesores, cesionarios, u otros representantes legales.

Ejecutado el 22 de Abril de 2007.

15
Mara FORNARO, (firma ilegible) L.S.

RECONOCIMIENTO

Estado de)
) S.S.:
Condado de)

El día de del 20 , se presento ante mí personalmente **Mara FORMARO** demostrando ante mi ser la misma persona descrita aquí y de ser quien ejecuto este documento y reconoce haberlo hecho por su propia voluntad con el propósito aquí descrito.

Sellado.

Firma ilegible
Notario Público

TESTIFICACION

Yo, el suscrito notario público de Basilea, Suiza, Dr, Matthias Staehelin, certifico por medio del presente la autenticidad de las firmas de la Sra. **Mara Fornaro**, ciudadano Italiano, residente en Basilea, Suiza;

La autenticidad de la firma fue demostrada bajo comparación.

BASILEA, Suiza, 4 días del mes de Mayo de 2007

(Firma) Ilegible

Leg.Prot.Nr. 819/2007

ACEPTACIÓN DE LA CESIÓN

En referencia con la cesión realizada a NOVARTIS AG de una invención titulada "**POLYPEPTIDOS DE UN FACTOR DE CRECIMIENTO TIPO INSULINA ESTABILIZADOS**" y en nombre de NOVARTIS AG; certificamos dicha cesión.

NOVARTIS AG

Por:	<u>(Firma ilegible)</u>	<u>(Firma ilegible)</u>
Nombre:	Sabine Zeller	Reto Halbeisen
Cargo:	Profesional Administrativa NIBR PS	Profesional Administrativa NIBR PS
Fecha:	<u>6 de octubre de 2008.</u>	

17

TESTIFICACION

Yo, el suscrito notario público de Basilea, Suiza, Dr. Matthias Staehelin, certifico por medio del presente la autenticidad de las firmas del Sr. Sabine Zeller, ciudadano Ormalingen/BL, Suiza, residente en Gelterkinden/B, Suiza y del Sr. Reto Halbelsen, ciudadano Wahelen/BL, Suiza, residente en Laufen/BL, Suiza, y en nombre de NOVARTIS AG; en Basilea, Suiza, certificamos dicha cesión.

La autenticidad de la firma fue demostrada bajo comparación.

BASILEA, Suiza, 3 días del mes de Noviembre de 2008

(Firma) Ilegible
Dr. M. Staehelin
Notario

Leg. Prot. Nr. 2288/2008

POR COPIA CERTIFICADA

Yo, El firmante Notario Civil, Dr. Matthias Staehelin, por este medio certifico que el documento aquí adjunto es una copia fiel del documento original.

Basilea Suiza, este 3 de Noviembre de 2008

Firma ilegible: M. Staehelin
Notario

Leg. Prot. 2291/2008

APOSTILLA**(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)**

1. PAÍS: SUIZA
2. ESTE DOCUMENTO PÚBLICO HA SIDO FIRMADO POR: M. Staehelin.
3. EN CALIDAD DE: NOTARIO PÚBLICO OFICIAL
4. CERTIFICADO CON EL SELLO DE: NOTARIO PÚBLICO

 CERTIFICÓ

5. EN BASILEA
6. EL 3 DE NOVIEMBRE DE 2008
7. POR: LA CANCELLERÍA DEL ESTADO DE CANTON DE BASILEA
8. No. 9546/16173
9. SELLO: DE LA CANCELLERÍA DE ESTADO CIUDAD DE BASILEA
10. FIRMA: (ILEGIBLE)
Heidi Fischer

(joint)

Patent Case 50210

ASSIGNMENT

For good and valuable consideration, the receipt and adequacy of which are hereby acknowledged, we

(1) **David Jonathan GLASS** and (2) **Mara FORNARO**

respectively residing at

1. 341 Furnace Dock Road, #30, Cortlandt Manor, New York 10567 USA, citizen of USA
2. Eptingerstrasse 14, 4052 Basel, Switzerland, citizen of Italy

do hereby sell, assign and transfer to Novartis AG, a company organized under the laws of the Swiss Confederation, of Lichtstrasse 35, 4056 Basel, Switzerland, and its successors, assigns and legal representatives, all of our right, title and interest for all countries of the world except Austria and to Novartis Pharma GmbH, a company organized under the laws of Austria, of Brunner Strasse 59, 1230 Vienna, Austria, and its successors, assigns and legal representatives, all of our right, title and interest for Austria (Novartis AG and Novartis Pharma GmbH hereinafter referred to collectively as the "**ASSIGNEES**") in and to (1) all of our inventions and discoveries described in the patent application(s) titled

STABILIZED INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR POLYPEPTIDES

and filed in the United States Patent and Trademark Office on June 6, 2007 and accorded Application Number PCT/US07/70468 * and/or filed in the RO/_____ on _____, 20____ and accorded International Patent Application Number PCT/_____, (2) the patent application(s) identified in (1), (3) all national stages of any international patent application identified in (1), (4) all other patent applications in all countries and regions claiming the priority of the provisional or non-provisional patent application filed in the United States Patent and Trademark Office on 09 June 2006 and accorded Application Number 60/812,349, on 20 October 2006 and accorded Application Number 60/862,244 and on 24 January 2007 and accorded Application Number 60/897,187 (5) for all patent applications, all rights of priority based upon the United States patent application identified in (4) in all countries and regions under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, the Inter-American Convention relating to Inventions, Patents, Designs, and Industrial Models and all other international agreements to which the United States now is or hereafter becomes a signatory and, if the United States patent application identified in (4) is a provisional patent application, under 35 USC 119(e) (including the right to file patent applications on said inventions and discoveries in the names of **ASSIGNEES** or their designees or in our names, at their election and in accordance with applicable law in all countries and regions), (6) all continuations and divisions of any United States patent application or international patent application designating the United States identified in (1), any national stages of any international application identified in (1) and any patent applications within the scope of (4) (including further continuations and divisions such as, but not limited to, continuations of continuations and continuations of divisions), ((2)-(4) and (6) hereinafter referred to collectively as "patent applications"), (7) all patents that are granted on any of said patent applications, (8) all registrations and confirmations of, and importation certificates based upon, one or more of said patents and applications for such registrations, confirmations and importation certificates and (9) all reissues, renewals and extensions of said patents, registrations, confirmations and importation certificates, reexamination certificates issued for said patents and supplementary protection certificates based upon said patents and applications for such reissues, renewals, extensions, reexamination certificates and supplementary protection certificates, the same to be held and enjoyed by said **ASSIGNEES** and their successors, assigns and legal representatives to the full ends of the terms for which said patents, registrations, confirmations, importation certificates, reexamination certificates, supplementary protection certificates, reissues, renewals and extensions may be granted, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by us if this sale, assignment and transfer had not been made.

*We hereby authorize **ASSIGNEES** and their representatives to insert in this Assignment the filing date(s) and Application Number(s) of said patent application(s) when notified thereof.

Patent Case 50210

Executed this 10th day of May, 2007

ACKNOWLEDGEMENT

On this 10th day of May, 2020, personally appeared before me David Jonathan GLASS to me known and known by me to be the same person described in and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that (s)he executed the same of his (her) own free will for the purpose set forth.



Notary Public

(joint)

Patent Case 50210

Executed this _____ day of _____, 20_____.

_____ L.S.
Mara FORNARO

ACKNOWLEDGEMENT

State of _____)
) s.s.:
County of _____)

On this _____ day of _____, 20_____, personally appeared before me
Mara FORNARO to me known and known by me to be the same person described in and who
executed the foregoing Assignment and acknowledged that (s)he executed the same of his (her) own free
will for the purpose set forth.

(Seal)

Notary Public



(joint)

Patent Case 50210

ASSIGNMENT

For good and valuable consideration, the receipt and adequacy of which are hereby acknowledged, we

(1) David Jonathan GLASS and (2) Mara FORNARO

respectively residing at

1. 341 Furnace Dock Road, #30, Cortlandt Manor, New York 10567 USA, citizen of USA
2. Eptingerstrasse 14, 4052 Basel, Switzerland, citizen of Italy

do hereby sell, assign and transfer to Novartis AG, a company organized under the laws of the Swiss Confederation, of Lichtstrasse 35, 4056 Basel, Switzerland, and its successors, assigns and legal representatives, all of our right, title and interest for all countries of the world except Austria and to Novartis Pharma GmbH, a company organized under the laws of Austria, of Brunner Strasse 59, 1230 Vienna, Austria, and its successors, assigns and legal representatives, all of our right, title and interest for Austria (Novartis AG and Novartis Pharma GmbH hereinafter referred to collectively as the "ASSIGNEES") in and to (1) all of our inventions and discoveries described in the patent application(s) titled

TABILIZED INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR POLYPEPTIDES

and filed in the United States Patent and Trademark Office on 06 June, 2007 and accorded Application Number PCT/US07/7C468 * and/or filed in the RO/ _____ on _____, 20____ and accorded International Patent Application Number PCT/ _____*, (2) the patent application(s) identified in (1), (3) all national stages of any international patent application identified in (1), (4) all other patent applications in all countries and regions claiming the priority of the provisional or non-provisional patent application filed in the United States Patent and Trademark Office on 09 June 2006 and accorded Application Number 60/812,349, on 20 October 2006 and accorded Application Number 60/862,244 and on 24 January 2007 and accorded Application Number 60/897,187 (5) for all patent applications, all rights of priority based upon the United States patent application identified in (4) in all countries and regions under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, the Inter-American Convention relating to Inventions, Patents, Designs, and Industrial Models and all other international agreements to which the United States now is or hereafter becomes a signatory and, if the United States patent application identified in (4) is a provisional patent application, under 35 USC 119(e) (including the right to file patent applications on said inventions and discoveries in the names of **ASSIGNEES** or their designees or in our names, at their election and in accordance with applicable law in all countries and regions), (6) all continuations and divisions of any United States patent application or international patent application designating the United States identified in (1), any national stages of any international application identified in (1) and any patent applications within the scope of (4) (including further continuations and divisions such as, but not limited to, continuations of continuations and continuations of divisions), ((2)-(4) and (6) hereinafter referred to collectively as "patent applications"), (7) all patents that are granted on any of said patent applications, (8) all registrations and confirmations of, and importation certificates based upon, one or more of said patents and applications for such registrations, confirmations and importation certificates and (9) all reissues, renewals and extensions of said patents, registrations, confirmations and importation certificates, reexamination certificates issued for said patents and supplementary protection certificates based upon said patents and applications for such reissues, renewals, extensions, reexamination certificates and supplementary protection certificates, the same to be held and enjoyed by said **ASSIGNEES** and their successors, assigns and legal representatives to the full ends of the terms for which said patents, registrations, confirmations, importation certificates, reexamination certificates, supplementary protection certificates, reissues, renewals and extensions may be granted, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by us if this sale, assignment and transfer had not been made.

*We hereby authorize **ASSIGNEES** and their representatives to insert in this Assignment the filing date(s) and Application Number(s) of said patent application(s) when notified thereof.

(joint)

And we hereby covenant and agree that we will, at any time, (i) upon the request, but at the expense, of **ASSIGNEES** or their successors, assigns or legal representatives execute and deliver all documents that may be necessary or desirable to perfect the title to the foregoing inventions and discoveries, patent applications, patents, registrations, confirmations, importation certificates, reissues, renewals, extensions, reexamination certificates, supplementary protection certificates and applications within the scope of (8) and (9) in **ASSIGNEES** or their successors, assigns or legal representatives, including the execution and procurement of all further documents evidencing this sale, assignment and transfer as may be necessary or desirable for recording the same in the patent office or other intellectual property office, agency or the like of any country or region, (ii) upon the request, but at the expense, of **ASSIGNEES** or their successors, assigns or legal representatives execute all additional patent applications within the scope of (3), (4) and (6) and all applications within the scope of (8) or (9) and (iii) make all rightful oaths and declarations and do all lawful acts requisite for procuring the same or for aiding therein, without further compensation, but at the expense of **ASSIGNEES** or their successors, assigns or legal representatives.

Executed this _____ day of _____, 20____.

 David Jonathan GLASS L.S.

ACKNOWLEDGEMENT

State of _____)
) s.s.:
 County of _____)

On this _____ day of _____, 20____, personally appeared before me
David Jonathan GLASS to me known and known by me to be the same person described in and who
 executed the foregoing Assignment and acknowledged that (s)he executed the same of his (her) own free
 will for the purpose set forth.

(Seal)

 Notary Public

(joint)

Patent Case 50210

✓ Executed this 27 day of APRIL, 2007

f Wave of L.S.
Mara FORNARO

ACKNOWLEDGEMENT

State of _____)
) s.s.:
County of _____)

On this _____ day of _____, 20_____, personally appeared before me Mara FORNARO to me known and known by me to be the same person described in and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that (s)he executed the same of his (her) own free will for the purpose set forth.

(Seal)

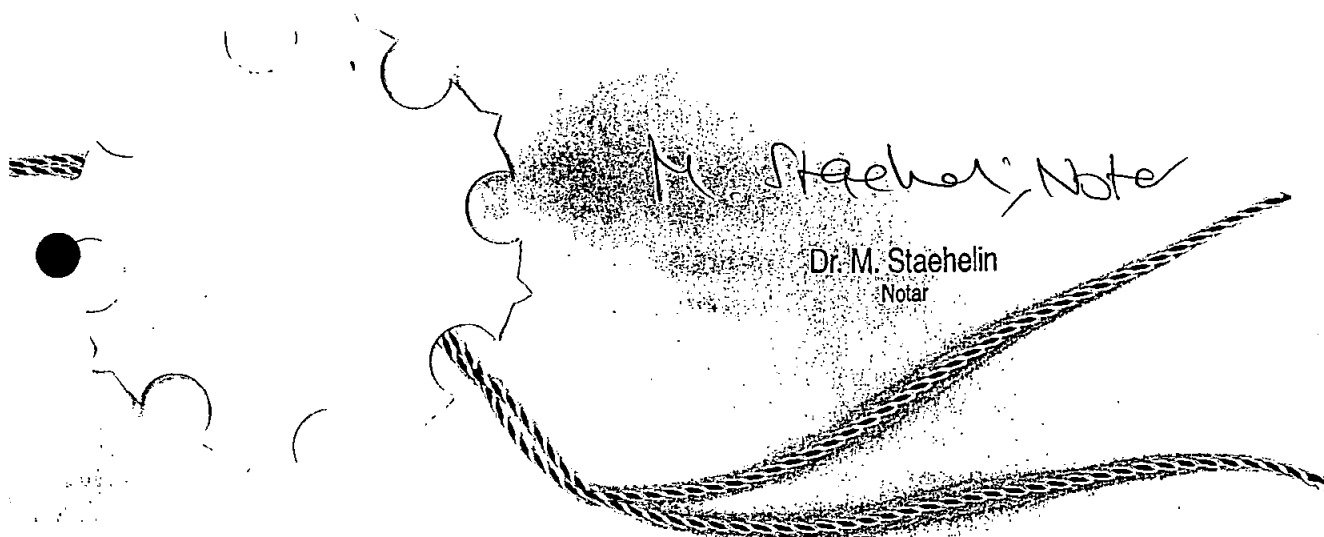
Notary Public

Attestation

I, the undersigned notary public of Basel, Switzerland, certify herewith the authenticity of the signature of **Ms. Mara Fornaro**, Italian citizen, residing in Basel, Switzerland.

The authenticity of the signature was established by means of comparison.

BASEL, Switzerland, this 4th (fourth) day of May 2007 (two thousand and seven)



Dr. M. Staehelin
Notar

Leg.Prot.Nr. 819 /2007

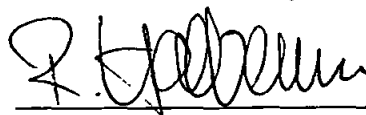
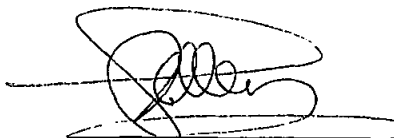
Case No. 50210

ACCEPTANCE OF ASSIGNMENT

With reference to the Assignment to **NOVARTIS AG** of an invention entitled "STABILIZED INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR POLYPEPTIDES" signed by **David Glass** and **Mara Fornaro**; this will certify that **NOVARTIS AG** accepts such Assignment.

NOVARTIS AG

By :



Name :

Sabine Zeller

Reto Halbeisen

Function :

Adm. Professional NIBR PS

Adm. Professional NIBR PS

Date:

06 October 2008

28

Attestation

I, the undersigned notary public in Basel, Switzerland, Dr. Matthias Staehelin, certify herewith that the above signatures are the genuine signatures of **Ms. Sabine Zeller**, citizen of Ormalingen/BL, Switzerland, residing in Gelterkinden/BL, Switzerland, and of **Mr. Reto Halbeisen**, citizen of Wahlen/BL, Switzerland, residing in Laufen/BL, Switzerland, both acting for **Novartis AG**, in Basel, Switzerland, both as proxy holders, both with joint signature.

The authenticity of the signatures was established by means of comparison.

BASEL, Switzerland, this 3rd (third) day of November 2008 (twothousandandeight).



M. Staehelin, Notar

Dr. M. Staehelin
Notar

Leg.Prot.Nr. 2288/2008

FOR CERTIFIED COPY

I, the undersigned Civil Law Notary, Dr. Matthias Staehelin, hereby certify that the document attached heretofore is a true and authentic photocopy of the original.

BASEL, Switzerland, this 3rd (third) day of November 2008 (twothousandandeight)



M. Staehelin, Notar

Dr. M. Staehelin
Notar

Leg. Prot. 2291/2008

APOSTILLE

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)

This official document

2. is signed by *M. Staehelin*

3. in his/her function as *Notar*

4. and certified by the seal of the *Basel-Stadt*

Certified - 3. Nov. 2008

5. in Basel (Bâle)

6. on

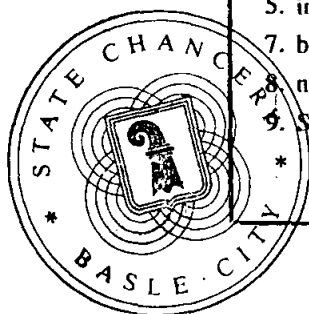
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

no. *9246/16-73*

9. Seal / stamp:

10. Signature:

Fischer
Heidi Fischer



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
21 December 2007 (21.12.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/146689 A3

(51) International Patent Classification:

A61K 38/30 (2006.01) C07K 14/65 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2007/070468

(22) International Filing Date:

6 June 2007 (06.06.2007)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/812,349	9 June 2006 (09.06.2006)	US
60/862,244	20 October 2006 (20.10.2006)	US
60/897,187	24 January 2007 (24.01.2007)	US

(71) Applicant (for all designated States except US): **NOVARTIS AG** [CH/CH]; Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel (CH).(71) Applicant (for AT only): **NOVARTIS PHARMA GmbH** [AT/AT]; Brunner Strasse 59, A-1230 Vienna (AT).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **GLASS, David**Jonathan [US/US]; 341 Furnace Dock Road, #30, Cortlandt Manor, New York 10567 (US). **FORNARO, Mara** [IT/CH]; Eptingerstrasse 14, CH-4052 Basel (CH).(74) Agent: **FERRARO, Gregory D.**; Novartis, Corporate Intellectual Property, One Health Plaza, East Hanover, NJ 07936-1080 (US).

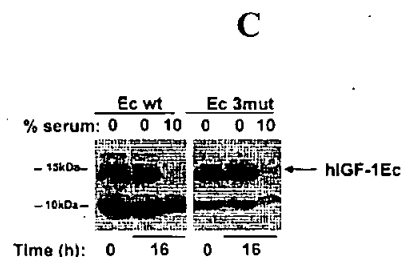
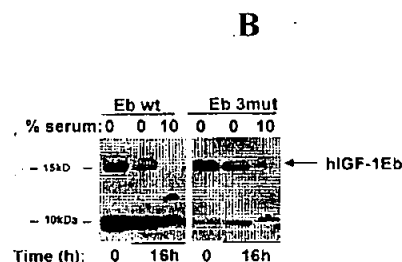
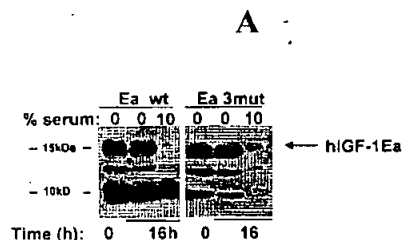
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FR, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,

[Continued on next page]

(54) Title: STABILIZED INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR POLYPEPTIDES

(57) Abstract: The invention relates to stabilized polypeptides having an IGF-1 or IGF-2 sequence and an E-peptide sequence, where the natural physiological cleavage of the E-peptide from the IGF is prevented.





ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— *before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments*

Published:

— *with international search report*

(88) Date of publication of the international search report:

10 April 2008

STABILIZED INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR POLYPEPTIDES

Background of the Invention

Insulin-like growth factors (IGFs) are part of a complex system that cells use to communicate with their physiologic environment. This complex system (often referred to as the insulin-like growth factor axis) consists of two cell-surface receptors (IGF-1R and IGF-2R), two ligands (IGF-1 and IGF-2), a family of six high-affinity IGF-binding proteins (IGFBP 1-6), and associated IGFBP degrading enzymes (proteases). This system is important not only for the regulation of normal physiology but also for a number of pathological states (Glass, Nat Cell Biol 5:87-90, 2003).

The IGF axis has been shown to play roles in the promotion of cell proliferation and the inhibition of cell death (apoptosis). IGF-1 is mainly secreted by the liver as a result of stimulation by human growth hormone (hGH). Almost every cell in the human body is affected by IGF-1, especially cells in muscles, cartilage, bones, liver, kidney, nerves, skin and lungs. In addition to the insulin-like effects, IGF-1 can also regulate cell growth. IGF-1 and IGF-2 are regulated by a family of gene products known as the IGF-binding proteins. These proteins help to modulate IGF action in complex ways that involve both inhibiting IGF action by preventing binding to the IGF receptors as well as promoting IGF action through aiding delivery to the receptors and increasing IGF half life in the blood stream. There are at least six characterized binding proteins (IGFBP1-6).

In its mature form, human IGF-1 (gpetlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssrrapqtgivdeccfrscdlrrlem ycaplkpaksa; SEQ ID NO:1), also called somatomedin, is a small protein of 70 amino acids that has been shown to stimulate growth of a wide range of cells in culture. The mature protein is initially encoded by three known splice variant mRNAs. The open reading frame of each mRNA encodes a precursor protein containing the 70 amino acid IGF-1 and a particular E-peptide at the C-terminus, depending on the particular IGF-1 mRNA. These E-peptides have been termed the Ea (rsvraqrhtdmptktqkevhlknasrgsagnknyrm; SEQ ID NO:2), Eb (rsvraqrhtdmptktqkyqppstnknt ksqrkgwpgkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaecrgkkgk; SEQ ID NO:3), and Ec (rsvraqrhtdm ptktkyqppstnkntksqrkgstfeerk; SEQ ID NO:4) peptides and range from 35 to 87 amino acids in

length and encompass a common sequence region at the N-terminus and a variable sequence region at the C-terminus. For example, the wild-type open reading frame for the IGF-1-Ea encodes a polypeptide of 105 amino acids (gpetlclgaclvdalqfvcgdrqfyfnkptgygssrrapqtgvide ccfrcsdltlrlemycaplkpaksarsvraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm; SEQ ID NO:5). In physiological expression, the E-peptides are cleaved off of the precursor by endogenous proteases to yield the mature 70 amino acid IGF-1 known to be bioactive. In certain contexts, one to three of the N-terminal amino acids of IGF-1 are known to be cleaved under physiological conditions, yielding active IGF-1 having between 67-70 amino acids. IGF-2 gene expression and processing is characterized by similar attributes except that only one E-peptide (rdvstptvlpdnfprypvgkffqydtwkqstqrlrrglpallrarrghvlakeleafreakhrplialptqdpahggappemasnrk; SEQ ID NO:6) for human IGF-2 has been identified for the 156 amino acid precursor (ayrpsetlccggelvdltlqfvcgdrqfyfsrpsrsvrrsrgiveccfrcsdllaletcatpakserdvstptvlpdnfprypvgkffqy dtwkqstqrlrrglpallrarrghvlakeleafreakhrplialptqdpahggappemasnrk; SEQ ID NO:7). Both IGF-1 and IGF-2 appear to be poor drug candidates, since these proteins are quickly degraded by endogenous proteases in the serum of patients. One strategy that has been contemplated is to stabilize IGF-1 as a drug by forming a complex with one of its binding proteins.

Summary of the Invention

The invention is based on the discovery that a precursor IGF-1 or IGF-2 protein containing substantially its E-peptide is bioactive and stabilized in the presence of serum, resulting in an IGF-1 or IGF-2 polypeptide that is useful as a pharmaceutical. In the compositions of the invention, the normal cleavage of the E-peptide from IGF-1 is avoided, for example, by mutating or deleting either of the arginine at position 1 or the serine at position 2 of the E-peptides (corresponding to positions 71 and 72 in the wild-type precursor IGF-1). In IGF-2, the cleavage is avoided, for example, by mutating or deleting either the arginine at position 1 or the aspartic acid at position 2 of the E-peptide (corresponding to positions 68 and 69 in the wild-type precursor IGF-2). Other modifications of an IGF precursor protein can avoid or reduce this cleavage.

In addition, further modifications of the IGF-1 precursor amino acid sequence can confer additional pharmaceutical benefits. For example, the polypeptides of the invention can exhibit

increased affinity for the IGF-1 receptor or decreased binding ability to an inhibitory IGF-1 or IGF-2 binding protein.

For the sake of clarity and consistency, the numbering of amino acid residues in IGF-1 or IGF-2 precursor or mature proteins throughout this application and in the claims is based on the wild-type precursor protein sequence numbering without signal peptide.

Accordingly, the invention includes a polypeptide containing a human IGF-1 precursor protein, where the cleavage of the E-peptide from IGF-1 by a protease is reduced by modification of the precursor protein. The E-peptide can be the Ea, Eb, or Ec peptide. At the N-terminus of the precursor, amino acids G1, P2, or E3 of the precursor protein can be deleted or mutated, as can R36 (e.g., R36A) and R37 (e.g., R37A).

The precursor protein can further include the N-linked glycosylation consensus sequence NXS/T, for example by insertion of amino acids 93-102 of Ea between amino acids N95 and T96 of the Eb. In general, the precursor protein can include an oligosaccharide covalently linked to an amino acid side chain of the precursor protein, such as an arginine side chain of the precursor protein.

In addition, a residue of the precursor protein can be replaced by a non-natural amino acid (e.g., one that includes an acetylene or azido group). Such non-natural amino acids can facilitate linkage of a poly(ethylene glycol) moiety to a side-chain of the precursor protein, though typical protein pegylation strategies are well known in the art.

The precursor protein can further include one or more additional E-peptides linked to the C-terminus of the precursor protein. For example, a polypeptide can include, from N-terminus to C-terminus, (1) an IGF-1 precursor protein having a first Eb peptide, where G1, P1, and E1 are deleted, either R36 or R37 or both are mutated, R71 and S72 are deleted, and the last seven C-terminal amino acids of the first Eb peptide are deleted; (2) a second Eb peptide, where R71, S72, and the last seven C-terminal amino acids of the second Eb peptide are deleted; (3) a third

Eb peptide, where R71, S72, and the last seven C-terminal amino acids of the third Eb peptide are deleted; and (4) a fourth Eb peptide, where R71 and S72 are deleted.

5 An effective means of preventing cleavage of the E-peptide from the IGF-1 is the deletion or mutation of R71 or S72.

Similarly, the invention includes a human IGF-2 precursor protein where the cleavage of the E-peptide from IGF-2 by a protease is reduced by modification of the precursor protein. In particular, deletion or mutation of R68 or D69 can be an effective means of avoiding protease
10 digestion of the IGF-2 precursor protein.

In addition, any E-peptide of IGF-1 can be combined with an IGF-2 and any E-peptide of IGF-2 can be combined with IGF-1 to provide the benefits described herein.

15 The invention further includes a method of treating a musculoskeletal disease, diabetes, neuronal cell death by administering a therapeutically effective amount of a polypeptide of the invention. Likewise, the invention includes the use of a polypeptide of the invention for the manufacture of a medicament for the treatment of a musculoskeletal disease, diabetes, neuronal cell death, or anemia.

20 In another embodiment, the invention includes a pegylated IGF-1 without an E-peptide but having introduced therein a non-natural amino acid as the site of pegylation. Any of the modified, pegylated IGF-1 containing a non-natural amino acid as disclosed herein, without an E-peptide, is also included in the invention.

25 The invention also includes veterinary methods and uses of administering an effective amount of the polypeptide of the invention to obtain a desired effect.

The veterinary uses include (i) enhancing the rate and/or extent of growth in an animal, (ii)
30 enhancing the efficiency of their conversion of feed into body tissue, (iii) enhancing milk production in lactating animals, (iv) treating animal wasting symptoms associated with cachexia,

trauma, or other consumption diseases, and (v) treating lactating animals for improvement in neonatal health.

All cited references or documents are hereby incorporated by reference.

5

Brief Description of the Drawings

Figs. 1A-1C are Western blots of polypeptides of the invention and wild-type IGF-1 precursor after zero or 16-hour incubation in the presence or absence of 10 % human serum at 37°C. Expression vectors encoding various IGF-1 constructs were transfected into Cos7 cells, and the conditioned culture medium obtained. The "3mut" refers to a hIGF-1-E-peptide precursor having the following three sets of modifications: deletion of G1, P2, and E3; mutation of Arg 37 to Ala (R37A); and deletion of R71 and S72. Fig. 1A shows the Western blot results (using antibody to IGF-1) for the wild-type and 3mut precursor containing Ea. Fig. 1B shows the Western blot results (using antibody to hIGF-1) for the wild-type and 3mut precursor containing Eb. Fig. 1C shows the Western blot results (using antibody to hIGF-1) for the wild-type and 3mut precursor containing Ec.

Figs. 2A-2D are line graphs showing the biological activity of various IGF-1 polypeptides ("ligands"). Biological activity was measured by stimulation of C2C12 myoblasts with Cos7-expressed polypeptides. The stimulated C2C12 cells were then assayed for the relative amounts of total AKT and phosphorylated AKT. Long-R3-IGF-1 is a commercially available reagent (Sigma Product No. I-1271) that consists of the mature human IGF-1 amino acid sequence, with an E3R mutation and an additional 13 amino acid N-terminal extension peptide. Fig. 2A shows the activity of IGF-1-Ea3mut. Fig. 2B shows the activity of IGF-1-Eb3mut. Fig. 2C shows the activity of IGF-1-Eab3mut, which is a 3mut construct in which Ea amino acids 93 to 102 were inserted between amino acids 95 and 96 of Eb. Fig. 2D shows the activity of IGF-1-Ec3mut.

Figs. 3A-3D and 4A-4D are line graphs showing whether IGF-1 precursor polypeptides of the invention maintain selectivity to the appropriate receptor by assaying for receptor phosphorylation in response to ligand binding. Figs 3A and 3B test the receptor selectivity of IGF-1-Ea3mut against the IGF-1 receptor (Fig. 3A) and the insulin receptor (Fig. 3B). Figs. 3C

and 3D tests the receptor selectivity of IGF-1-Eb3mut against the IGF-1 receptor (Fig. 3C) and the insulin receptor (Fig. 3D). Figs. 4A and 4B test the receptor selectivity of IGF-1-Ec3mut against the IGF-1 receptor (Fig. 4A) and the insulin receptor (Fig. 4B). Figs. 4C and 4D tests the receptor selectivity of IGF-1-Eab3mut against the IGF-1 receptor (Fig. 4C) and the insulin receptor (Fig. 4D). "IGF1-R3" refers to the Long-R3-IGF-1 described above. The polypeptide listed as "IGF1Eab" refers to construct in which Ea amino acids 93 to 102 were inserted between amino acids 95 and 96 of Eb.

Fig. 5 is a Western blot showing relative AKT phosphorylation upon stimulation of C2C12 myotubes (as a result of 3 to 4 days of differentiation of C2C12 myocytes) by different ligands. The IGF-1Eb multimer refers to the construct schematically shown in Fig. 6A.

Figs. 6A and 6B are schematic representations of two of the polypeptides of the invention. Fig. 6A shows an IGF-1-Eb precursor polypeptide with four sets of modifications: deletion of G1, P2, and E3; mutation of R37 to A; deletion of R71 and S72; and deletion of the last seven C-terminal amino acids. In addition, the polypeptide is lengthened by the addition of two more Eb peptides (but without R71 and S72 and without the last seven C-terminal amino acids) and the addition of a final Eb peptide (buth without R71 and S72) at the C-terminus of the polypeptide. This construct is often referred to as the IGF-1-Eb multimer. Fig. 6B shows an IGF-1-Eab precursor polypeptide with four sets of modifications: deletion of G1, P2, and E3; mutation of R37 to A; deletion of R71 and S72; and insertion of Ea amino acids 93 to 102 between amino acids 95 and 96 of Eb.

Fig. 7A is a sequence alignment of the human IGF-1 (SEQ ID NO:1) with corresponding animal IGF-1. All animal species analyzed and their corresponding GenBank accession numbers for the sequence are given. G1, P2, E3 is conserved in all analyzed species except Sterlet (where S2 replaces P2). R36 and R37 are conserved in all analyzed species.

Fig. 7B is a graph showing the phylogeny of the analyzed amino acid sequences compared to human IGF-1 (SEQ ID NO:1). Below the tree is a scale indicating the number of "Amino Acid Substitutions" per 100 residues for protein sequences. The Kimura distance formula is used to

calculate distance values, derived from the number of non-gap mismatches and corrected for silent substitutions. The values computed are the mean number of differences per site and fall between zero and 1. Zero represents complete identity and 1 represents no identity. The phylogenetic tree scale uses these values multiplied by 100.

5

Fig. 8A is a sequence alignment of the human Ea peptide (SEQ ID NO:2) with various animal Ea peptides. All animal species analyzed and their corresponding GenBank accession numbers for the sequence are given. R71 and S72 are conserved in all analyzed species.

10 **Fig. 8B** is a graph showing the phylogeny of the analyzed amino acid sequences compared to human IGF-1 Ea peptide (SEQ ID NO:2).

Fig. 9A is a sequence alignment of the human Eb peptide (SEQ ID NO:3) with various animal Eb peptides. All animal species analyzed and their corresponding GenBank accession numbers for the sequence are given. R71 and S72 are conserved in all analyzed species.

15

Fig. 9B is a graph showing the phylogeny of the analysed amino acid sequences compared to human IGF-1 Eb peptide (SEQ ID NO:3).

20 **Fig. 10A** is a sequence alignment of the human Ec peptide (SEQ ID NO:4) with various animal Ec peptides. All animal species analyzed and their corresponding GenBank accession numbers for the sequence are given. R71 and S72 are conserved in all analyzed species.

Fig. 10B is a graph showing the phylogeny of the analyzed amino acid sequences compared to human IGF-1 Ec peptide (SEQ ID NO:4).

25

Fig. 11A is a sequence alignment of the human IGF-2 (SEQ ID NO:7) with corresponding animal IGF-2. All animal species analyzed and their corresponding GenBank accession numbers for the sequence are given. R68 is conserved in all analyzed species; D69 is conserved except for chimpanzee, where a histidine resides in that position.

30

Fig. 11B is a graph showing the phylogeny of the analyzed amino acid sequences compared to human IGF-2 (SEQ ID NO:7).

Fig. 12A is a sequence alignment of the human IGF-2 E-peptide (SEQ ID NO:6) with various animal IGF-2 E-peptides. All animal species analyzed and their corresponding GenBank accession numbers for the sequence are given. R68 is conserved in all analyzed species; D69 is conserved except for Chimpanzee, where a histidine resides in that position.

Fig. 12B is a graph showing the phylogeny of the analyzed amino acid sequences compared to human IGF-2 E peptide (SEQ ID NO:6).

Detailed Description of the Invention

The invention relates to new IGF-1 and IGF-2 precursor polypeptides containing substantially an E-peptide that has been modified to prevent, reduce, or avoid the typical protease cleavage responsible for releasing the active IGF-1 or IGF-2 from its E-peptides. The utility of the polypeptides of the invention is based on the surprising discovery that such precursor polypeptides are biologically active, stable and beneficial as pharmaceuticals.

Screening for Active IGF Precursor Polypeptides

The usefulness of any polypeptide of the invention can be assessed using the following assays.

Stability A polypeptide of the invention should have sufficient stability in the presence of endogenous proteases, such as in human serum, to be an effective drug. To assess stability, an expression vector encoding the polypeptide can be transfected into Cos7 cells (ATCC) in a DMEM medium containing 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. The culture medium containing secreted polypeptides can be applied to further analysis, or in the alternative, the expression vector can encode readily available tags, such as a hexa-histidine tag, in the polypeptide to facilitate efficient purification of the expressed polypeptides in the Cos7 cultures. However prepared, the polypeptide sample is incubated in normal human serum (Sigma) or in PBS for various times (e.g., 0, 1, 5, 10, and 16 hours), subjected to polyacrylamide gel electrophoresis, blotted onto nitrocellulose, and the relevant

proteins visualized using a primary antibody against human IGF-1 or IGF-2 and a secondary antibody, e.g., conjugated to horseradish peroxidase. Any number of similar blotting and detection techniques, some using fluorescent dyes or even radionuclides, can be used. The intensity of the precursor band versus the intensity of the IGF-1 or IGF-2 band should indicate the degree to which the precursor polypeptide is cleaved under various conditions. A polypeptide of the invention that is exposed to human serum for 16 hours at 37°C can exhibit a ratio of uncleaved precursor to cleaved mature IGF of about 1:2 to 1:0.1, e.g., about 1:1 to 1:0.5, particularly a ratio of about 1:1 or a ratio of about 1:0.5. Typically, the precursor should exhibit a ratio of at least 1:1.

AKT Phosphorylation A polypeptide of the invention should maintain the ability to signal through the IGF-1 receptor. (Both IGF-1 and IGF-2 signal through the IGF-1 receptor.) To determine this signaling ability, one can assess whether a downstream intracellular target, AKT, is phosphorylated in response to ligand binding at the cell surface. For analysis of AKT phosphorylation, C2C12 myoblasts are starved in serum-free medium and then stimulated with different ligands. Cells are lysed and cleared by centrifugation. AKT phosphorylation and total AKT levels are analyzed by ELISA using PathScan phospho AKT (Ser473) sandwich ELISA kit and PathScan AKT sandwich ELISA kit (Cell Signaling), respectively.

IGF-1 Receptor Specificity A polypeptide of the invention preferably maintains the specificity for the IGF-1 receptor and should bind to the related insulin receptor with low affinity. To assess receptor specificity, polypeptide samples are added to serum-starved NIH3T3 cells overexpressing the IGF-1 receptor or the insulin receptor, and the level of IGF-1 receptor phosphorylation or insulin receptor phosphorylation is determined by lysing the cells and subjecting the lysates to ELISA using the DuoSet IC human phosphor-IGF-1 receptor and insulin receptor ELISA kit (R&D Systems).

In Vivo Testing in Mouse Models of Hypertrophy To determine whether a polypeptide of the invention can act to increase skeletal muscle mass under a context that already leads to muscle hypertrophy, one can subject treated and untreated animals to exercise and determine whether animals receiving the polypeptide have developed larger muscles than untreated animals.

Exercise Models

One model known in the art is based on the use of a voluntary running wheel with user-variable loads (see, e.g., Konhilas et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H455-H465, 2005). The voluntary cage wheel eliminates physical and psychological insults that are common in forced exercised models, and are therefore more appropriate for evaluating candidate drugs that are used in relatively healthy individuals for whom increases in muscle mass is desirable.

Any suitable mouse strain can be used. For example, male C57Bl/6J mice can be randomly assigned to experimental (e.g., receiving IGF precursor polypeptide) and control groups. Animals are individually housed in a cage containing an exercise wheel; sedentary control animals are housed in identical cages without a wheel. The exercise wheels are described in Allen et al., *J Appl Physiol* 90:1900-1908, 2001. Briefly, the system consists of an 11.5 cm-diameter wheel with a 5.0 cm-wide running surface (model 6208, Petsmart, Phoenix, AZ) equipped with a digital magnetic counter (model BC 600, Sigma Sport, Olney, IL) that is activated by wheel rotation. In addition, each wheel is engineered with a resistance mechanism allowing adjustment of the load. This is accomplished by attaching stainless steel fishing line to the cage top and wrapping the wire around an immovable pulley that is secured to the cage wheel at the axis of rotation so as to not contribute to the wheel load. The wire is again secured to the cage top with a spring and screw. This design permits fine adjustments of the wheel load, which is evenly distributed throughout the rotation of the wheel. Daily exercise values for time and distance run are recorded for each exercised animal throughout the duration of the exercise period. All animals are given water and standard hard rodent chow ad libitum. Voluntary running (cage wheel exposure) can begin at an average age of about 12 weeks for all groups. Each group continues running under varying resistance, depending on experimental group, for 50 days until the animals are about 19 weeks of age. The load on the wheel is determined by hanging known weights on the wheel until the wheel was slightly displaced. All exercise groups begin with no load on the cage wheel for the first week. However, the "no-load" condition is actually 2 g, which is determined as the load necessary to maintain wheel inertia and frictional load. Considering a wheel acclimatization period of 1 week, wheel loads can be changed at one-week intervals, except for higher loads, which can be changed after 2 weeks. The range of loads

can be anywhere from 2 g to up to 12 g. Exercised and sedentary control animals are euthanized by cervical dislocation under inhaled anesthesia immediately after the end of the specific exercise period. Body mass is measured, and specific muscles are rapidly excised, washed, and frozen for histological or biochemical assays at a future date.

5

Alternative exercise hypertrophy models are also available to the skilled artisan. See, e.g., the treadmill exercise model described in Lerman et al., J Appl Physiol 92:2245-2255, 2002.

Clenbuterol Injection Model

10

Clenbuterol is a β_2 -adrenergic agonist with growth-promoting properties that cause a documented increase in muscle mass. The precise mechanism of clenbuterol action remains unclear, although a reduction in muscle protein degradation has been proposed. In the clinic, clenbuterol is used as an anti-asthma drug, but it appears to be mostly misused as a body-building agent to increase muscle mass in both humans and show animals.

15

Five mice are given a daily injection of clenbuterol (3 mg/kg, subcutaneous (s.c.)) for 3, 7, or 14 days to induce muscle hypertrophy. Mice injected with PBS serves as negative control. The animals are monitored daily (visual inspection) for any adverse reactions (i.e. unkempt coat, lethargic) to the treatment. Clenbuterol treatment has the potential to make mice more fearful or aggressive, so mice should be especially monitored for fighting if housed in groups. Mice are mobile, and can eat and drink normally. Mice are monitored daily until they are euthanized on day 3, 7, or 14, and tissue collected for further analysis.

20

25

In Vivo Testing in Muscle Atrophy Models In various skeletal muscle atrophy models, an IGF precursor polypeptide of the invention can be tested for the ability to maintain muscle mass under conditions that generally reduce muscle mass. With the example models described below, the skilled artisan can readily design and implement controlled experiments involving the administration and use of IGF precursor polypeptides to determine whether such polypeptides can increase muscle mass.

30

42

For example, C57Bl6/2 male mice are purchased from The Jackson Laboratories. Mice are purchased so that they are about 9 weeks at the start of each experiment. Generally mice are housed in microisolator cages with normal rodent chow. At the start of each experiment mice are weighed. At the end of each experiment, generally mice are euthanized by CO₂ inhalation followed by cervical dislocation, and muscle tissues harvested for further processing. Mice are weighed to provide "end body weight." Skeletal muscles that can be harvested are tibialis anterior, extensor digitorum longus, soleus, and gastrocnemius muscles. Other tissues harvested occasionally are: heart, liver, spleen, kidneys, testes, and brain. All muscles and tissues are completely dissected and weighed on a balance capable of measuring to 0.0001g. Tissues are then snap-frozen in liquid nitrogen for later RNA and protein extraction, or snap-frozen embedded in OCT on a cork disc. Muscles frozen on a cork disc for later cryosectioning are immersed in isopentane cooled to a thick slush by liquid nitrogen. All samples are stored at -80°C.

15 Dexamethasone Treatment

A pharmacological method of inducing muscle wasting in mice is daily intraperitoneal injection with dexamethasone at 20mg/kg. Dexamethasone is a synthetic member of the glucocorticoid class of hormones. It acts as an anti-inflammatory and immunosuppressant, with a potency of about 40 times that of hydrocortisone. Dexamethasone is used to treat many inflammatory and autoimmune conditions, e.g. rheumatoid arthritis. It is also given to cancer patients undergoing chemotherapy, to counteract certain side-effects of their antitumor treatment. Dexamethasone causes muscle atrophy both in mice and in human patients.

Mice are injected intraperitoneally (ip) with dexamethasone for 3, 7, or 14 days. On the terminal day subjects are euthanized using CO₂, and the leg muscles harvested. The animals are monitored daily (visual inspection) for any adverse reactions (i.e. unkempt coat, lethargic) to the treatment. Mice are usually mobile, and can eat and drink normally. Mice injected with PBS are the negative control.

30 Cast Immobilization

Physical disuse of various muscle groups results in atrophy of those muscles. Ankle joint fixation ("pinned heel" or casting) has proven to be a highly useful and reproducible way to induce physical immobilization of rat and mouse hindlimb musculature.

- 5 Mice are anesthetized with isoflurane for immobilization. The ankle and knee joints are fixed at 90 degrees with a light-weight casting material (VET-LITE) around the joints. The material is soaked in warm water and then wrapped around the limb, leaving the toes and hip joint free. The joints are maintained in at 90° positions until the casting material has dried. The contralateral leg serves as control. The mice are then allowed to recover from anesthesia and housed in normal
10 micro isolator cages. Casting has not been observed to cause excessive stress, and animals freely move about the cage to feed and drink. The mice are however monitored daily for any adverse events affecting body weight, activity, and irritations.

- Once a cast is applied to a mouse, the animal is monitored daily to make sure that the cast
15 remains in place, as chewing can occur. The animals can move, drink, and feed after recovery of anesthesia, and they do not require special bedding, caging or other assistance.

Denervation

- Generally, mice are anesthetized with isoflurane gas for denervation. Using aseptic surgical
20 procedures (three washes of betadine with a final ethanol wash), the right sciatic nerve is isolated in the mid-thigh and a 2 to 5 mm piece cut out. The contralateral leg serves as control.

- More specifically, the skin incision is closed with a suture clip, and the animals injected with a single dose of buprenorphine before being allowed to recover from the anesthesia. Three, seven,
25 or 14 days after surgery animals are euthanized by CO₂ inhalation followed by cervical dislocation, and muscles (gastrocnemius complex, tibialis anterior, extensor digitorum longus, soleus) are removed for histological and biochemical analyses.

- Given that the sciatic nerve is transected, the effected limb is rendered immobile to induce
30 skeletal muscle atrophy of the muscles involved. The animal can otherwise move, drink, and feed after recovery of anesthesia and they do not require special bedding, caging or other

assistance. Nonetheless, animals are monitored immediately post-surgery and through recovery (1-2 hrs). In addition, the incision sites and general animal health are monitored for 3 days post-surgery. The suture clip is removed 7 to 10 days after surgery.

5 Genetic Models

Genetically manipulated transgenic mice can also be used as models of muscle atrophy. For example, the so-called Mini Mice (The Jackson Laboratory, Stock No. 003258) contains a knock out mutation in the IGF-1 gene that results in abnormally decreased postnatal growth, as well as low body weight and size. For additional information, see Powell-Braxton et al., Genes Dev
10 7:2609-2617, 1993. In addition, the so-called Midi Mice (The Jackson Laboratory, Stock No. 003259) contains a different mutation in the IGF-1 gene that results in a hypomorph exhibiting low adult body weight and other cardiovascular phenotypes. For additional information, see Lembo et al., J Clin Invest 98:2648-2655, 1996.

15 Critical and Optional Mutations or Modifications in the IGF Precursors

Critical Mutations The invention is based in part on the observation that an IGF precursor polypeptide that contains substantially its E-peptide remains bioactive and stable in the presence of serum. To ensure that the E-peptide is not cleaved by endogenous proteases targeting the dibasic protease site, in general either of the two N-terminal dibasic amino acids of the E-peptide
20 in the precursor is deleted, mutated, or otherwise masked. In the case of hIGF-1, these two amino acids are R71 and S72, while in the case of hIGF-2, these first two amino acids are R68 and D69.

A variety of modifications enables this prevention of cleavage:

- 25 (1) Deletion of one or both dibasic residues
- (2) Mutate one or both dibasic residues to a non-basic amino acid, such as alanine
- (3) Insert one or more non-basic amino acids between the dibasic residues
- (4) Place a glycosylation site near the dibasic residues sufficient to mask the protease site
- (5) Site-directed pegylation using replacement of either dibasic residue, or insertion near or
30 between the dibasic residues, with a non-natural amino acid, as described below.

In addition, residues K68 and K65 appear to play a role in IGF-1/E-peptide cleavage; accordingly, mutations or deletions of these residues can be incorporated into any tactic directed to the dibasic amino acids as described above.

5 *Mutations at the N-terminus of Mature IGF* In certain embodiments of the invention, the IGF precursor polypeptides have deletions or mutations of the first few N-terminal amino acids. In the case of IGF-1, any of the first three N-terminal amino acids can be deleted or mutated, whereas in the case of IGF-2, any of the first six N-terminal amino acids can be deleted or mutated. It has been observed that certain N-terminal amino acids are naturally cleaved in vivo,
10 and the introduction of these mutations or deletions minimizes the in vivo associations of the polypeptides of the invention with IGF binding proteins (IGFBPs). The interaction of IGF-1 and IGF-2 with the IGF-1 receptor is regulated by IGFBPs. All six IGFBPs have been shown to inhibit IGF action (particularly IGFBP5), but in some instances a stimulatory effect has been observed. At least 99% of the IGF in the circulation is normally bound to IGFBPs. The most
15 abundant IGFBP in the circulation after the neonatal period is IGFBP3 which can bind both IGF-1 and IGF-2 with similar affinities. The naturally occurring truncated IGF-1 (bearing deletion of G1, P2, and E3) binds to IGFBP3 with several times lower affinity than natural IGF-1. In addition, G3 is important for IGFBP binding, and G6 plays a similar role in the IGF-2 peptide.

20 Accordingly, in the case of the hIGF-1 precursor, any of G1, P2, or E3 can be deleted or mutated either alone or in combination. When a mutation is desired, a mutation to alanine can be introduced. In another example, in the case of hIGF-2 precursor, any of P4, S5, and E6 can be deleted or mutated either alone or in combination. When a mutation is desired, a mutation to alanine can be introduced.

25

Mutations at Residues 36 and 37 IGF-1 can be cleaved by serine proteases present in human serum. Mutation of either R36 or R37 to A can prevent cleavage of IGF-1 at this predicted cleavage site between R36 and R37. In the case of hIGF-2, R38 can be mutated or deleted to prevent this deleterious cleavage.

30

Use of Glycosylation The in vivo half-life of the polypeptides of the invention can be improved by the addition of N-linked glycosylation sites into either the IGF or the E-peptide portions of the precursor when expressed in mammalian or other eukaryotic cells capable of N-linked glycosylation. It has been shown in vitro that human IGF-1 Ea is glycosylated at N92 and N100, as these portions of Ea fits the consensus N-linked glycosylation sequence of N-X-S/T, where X can be any amino acid and the third amino acid of the triplet is either S or T. It is also know that the adjacent amino acid context of the consensus will affect how strongly the asparagine is glycosylated. Therefore, one strategy to introduce a glycosylation site into Eb or Ec is to insert Ea amino acids around the consensus sequence into roughly the same part of Eb or Ec. A particular implementation of this strategy is illustrated in the Examples below. In any event, any other consensus N-linked glycosylation site, including surrounding context amino acids, known to the skilled artisan can be inserted into a precursor polypeptide of the invention. In addition, O-linked glycosylation of a polypeptide of the invention can be accomplished by choosing the particular host used for production of the polypeptide. For example, use of certain yeast strains for IGF-1 expression results in the addition of oligosaccharides on a serines or threonines. See, e.g., US Patent No. 5,273,966.

Addition of Poly(ethylene glycol) Conjugation to poly(ethylene glycol) (PEG; pegylation) have proven to be beneficial in prolonging the half-life of therapeutic proteins drugs. It is expected that pegylation of the IGF precursor polypeptides of the invention may result in similar pharmaceutical advantages. Methods of pegylation of IGF-1 are well known in the art. See, for example, US Patent Application Publication 2006/0154865, which describes the beneficial properties of lysine-monopegylated IGF-1. Such lysine-monopegylation can be adapted for the precursor IGF polypeptides of the invention. In addition, pegylation can be achieved in any part of a polypeptide of the invention by the introduction of a nonnatural amino acid. Certain nonnatural amino acids can be introduced by the technology described in Deiters et al., J Am Chem Soc 125:11782-11783, 2003; Wang and Schultz, Science 301:964-967, 2003; Wang et al., Science 292:498-500, 2001; Zhang et al., Science 303:371-373, 2004 or in US Patent No. 7,083,970. Briefly, some of these expression systems involve site-directed mutagenesis to introduce a nonsense codon, such as an amber TAG, into the open reading frame encoding a polypeptide of the invention. Such expression vectors are then introduced into a host that can

utilize a tRNA specific for the introduced nonsense codon and charged with the nonnatural amino acid of choice. Particular nonnatural amino acids that are beneficial for purpose of conjugating moieties to the polypeptides of the invention include those with acetylene and azido side chains. The IGF precursor polypeptides containing these novel amino acids can then be
5 pegylated at these chosen sites in the protein. In addition, such pegylated IGF molecules without the E-peptide are also useful as therapeutics.

Multimers of E-Peptides In certain pharmacological contexts, it is beneficial to increase the size of a peptide or protein drug to ensure that the drug remains on one side of the blood- brain
10 barrier or the other. Since mature IGF molecules are relatively short peptides, even if the E-peptide remains attached, it can be beneficial to increase the size of the polypeptides of the invention. One means of doing so is to provide multimers of E-peptides at the C-terminus of the IGF precursor polypeptide, as illustrated in certain Examples described below.

C-Terminal Deletion of E-Peptides It is suspected that the free cysteine at position 81 of Eb may result in homodimerization or other effects that, when present in the polypeptides of the invention, might lead to lower activity drugs. Thus, deletion or mutation of C81 in Eb can
15 optimize drug activity. In a particular example, deletion of the last seven amino acids of Eb (i.e., amino acids 81-87) is beneficial.

Other Mutations or Modifications Additional mutations or modifications of IGF that can be incorporated into the IGF precursor polypeptides of the invention are described in US Patent No. 5,077,276; and US Patent Application Publication Nos. 2005/0287151, 2006/0211606, and
20 2006/0166328.

The invention should be construed, in addition to human IGF-1 and IGF-2, to include all known and unknown non-human animal precursor IGF-1 or IGF-2 sequences containing substantially its E-peptide wherein the normal cleavage of the E-peptide is avoided or reduced according to
25 modifications of the present invention.

The preferred type of IGF to be used depends upon the species of the subject being treated.
30

It is preferred that the IGF is species-matched, for example, when a cow is being treated, the preferred type of IGF is bovine IGF.

Although all forms of IGF are likely to have an effect in different subjects due to the high sequence homologies, species matching will avoid potential adverse immunological complications stemming from the induction of an immune response to an IGF from a different species.

In one embodiment of the invention, modified non-human animal precursor IGF-1 sequences are provided.

Preferred are precursor IGF-1 sequences containing substantially its E-peptide wherein the normal cleavage of the E-peptide is avoided or reduced according to modifications of the present invention from a vertebrate animal.

For example, such sequences include but are not limited to sequences from a mouse, rat, cow, pig, horse, sheep, goat, bird, dog, cat, fish and the like, from any source whether natural, synthetic, or recombinant.

In another embodiment of the invention, modified non-human animal precursor IGF-2 sequences are provided.

Preferred are precursor IGF-2 sequences containing substantially its E-peptide wherein the normal cleavage of the E-peptide is avoided or reduced according to modifications of the present invention from a vertebrate animal.

For example, such sequences include but are not limited to sequences from a mouse, rat, cow, pig, horse, sheep, goat, bird, dog, cat, fish and the like from any source, whether natural, synthetic, or recombinant.

Therapeutic Use of IGF Precursor Polypeptides

49

Indications The invention also includes the use of an IGF precursor polypeptide of the invention in the manufacture of a medicament for the treatment or prevention of a musculoskeletal disease. In addition, the invention includes use of IGF precursor polypeptides to increase muscle or bone mass in an individual, whether or not such an individual is at risk for or has a musculoskeletal disease.

In particular, the musculoskeletal disease can be muscle atrophy. There are many causes of muscle atrophy, including as a result of treatment with a glucocorticoid such as cortisol, dexamethasone, betamethasone, prednisone, methylprednisolone, or prednisolone. The muscle atrophy can also be a result of denervation due to nerve trauma or a result of degenerative, metabolic, or inflammatory neuropathy (e.g., Guillian-Barré syndrome, peripheral neuropathy, or exposure to environmental toxins or drugs). In addition, the muscle atrophy can be a result of an adult motor neuron disease, infantile spinal muscular atrophy, juvenile spinal muscular atrophy, autoimmune motor neuropathy with multifocal conduction block, paralysis due to stroke or spinal cord injury, skeletal immobilization due to trauma, prolonged bed rest, voluntary inactivity, involuntary inactivity, metabolic stress or nutritional insufficiency; cancer, AIDS, fasting, rhabdomyolysis, a thyroid gland disorder, diabetes, benign congenital hypotonia; central core disease, nemaline myopathy, myotubular (centronuclear) myopathy, burn injury, chronic obstructive pulmonary disease, liver disease, sepsis, renal failure, congestive heart failure, or ageing.

The musculoskeletal disease can also be a muscular dystrophy syndrome, such as Duchenne, Becker, myotonic, fascioscapulohumeral, Emery-Deifuss, oculopharyngeal, scapulohumeral, limb girdle, a congenital muscular dystrophy, or hereditary distal myopathy. The musculoskeletal disease can also be osteoporosis, a bone fracture, short stature, or dwarfism.

IGF-1 is suggested as a treatment for insulin-insensitive diabetes, since IGF-1 can also bind heterodimers of IGF-1 receptor and insulin receptor. Accordingly, the polypeptides of the invention can be used to treat diabetes.

IGF-1 is neurotrophic and increases survival of neurons. It has been suggested that IGF-1 can be used to treat instances of motor-neuron death such as seen in amyotrophic lateral sclerosis (ALS), brain atrophy, ageing, and dementia. Accordingly, the polypeptides of the invention can be used to treat conditions associated with neuronal death, such as ALS, brain atrophy, or dementia.

IGF-1 increases both white and red blood cell populations and has an additive effect to administration of erythropoietin. Accordingly, the polypeptides of the invention can be used to treat anemia.

Since IGF-1 and IGF-2 are ubiquitous and essential regulators of cell division and vertebrate growth, they may be advantageously used in a variety of veterinary methods to exogenously enhance or maintain growth in an animal. Some examples include, but are not limited to:

- (i) enhancing rate and/or extent of growth in an animal, for example, enhancing muscle growth in swine, cattle, poultry and fish;
- (ii) enhancing the efficiency of their conversion of feed into body tissue (lean to fat ratio), for example, in swine, cattle, sheep, poultry and fish; and
- (iii) enhancing milk production in lactating animals, for example, dairy cattle, sheep, goats.

Other veterinary therapeutic applications include, but are not limited to:

- (iv) treating animal wasting symptoms associated with cachexia, trauma or other consumption diseases, for example, in companion animals such as dogs, cats, and horses; and
- (v) treating lactating animals for improvement in neonatal health, for example, lactating sows for improvement in neonatal performance.

Methods of Administration The polypeptides of the invention can be delivered in a variety of ways, including the use of gene delivery vehicles. Methods known in the art for the therapeutic delivery of agents such as proteins or nucleic acids can be used for the therapeutic delivery of a polypeptide of the invention, e.g., cellular transfection, gene therapy, direct administration with a delivery vehicle, or pharmaceutically acceptable carrier, indirect delivery by providing recombinant cells containing a nucleic acid encoding the polypeptide.

5 Various delivery systems are known and can be used to administer the polypeptide of the invention, e.g., encapsulation in liposomes, microparticles, microcapsules, recombinant cells capable of expressing the protein, receptor-mediated endocytosis (see, e.g., Wu and Wu, J Biol Chem 262:4429-4432, 1987), construction of a nucleic acid as part of a retroviral, adeno-associated viral, adenoviral, poxviral (e.g., avipoxviral, particularly fowlpoxviral) or other vector, etc. Methods of introduction can be enteral or parenteral and include but are not limited to intradermal, intramuscular, intraperitoneal, intravenous, subcutaneous, pulmonary, intranasal, intraocular, epidural, and oral routes. The polypeptides can be administered by any convenient route, for example by infusion or bolus injection, by absorption through epithelial or mucocutaneous linings (e.g., oral mucosa, rectal and intestinal mucosa, etc.) and may be administered together with other biologically active agents. Administration can be systemic or local. In addition, it may be desirable to introduce the pharmaceutical compositions of the invention into the central nervous system by any suitable route, including intraventricular and intrathecal injection; intraventricular injection may be facilitated by an intraventricular catheter, for example, attached to a reservoir, such as an Ommaya reservoir. Pulmonary administration can also be employed, e.g., by use of an inhaler or nebulizer, and formulation with an aerosolizing agent.

20 In a specific embodiment, it may be desirable to administer the pharmaceutical compositions of the invention locally to the area in need of treatment; this may be achieved, for example, and not by way of limitation, by local infusion during surgery, topical application, e.g., by injection, by means of a catheter, or by means of an implant, the implant being of a porous, non-porous, or gelatinous material, including membranes, such as sialastic membranes, fibers, or commercial skin substitutes.

25 In another embodiment, the active agent can be delivered in a vesicle, in particular a liposome (see Langer, Science 249:1527-1533, 1990). In yet another embodiment, the active agent can be delivered in a controlled release system. In one embodiment, a pump may be used. In another embodiment, polymeric materials can be used (see Howard et al., J Neurosurg 71:105, 1989). In 30 another embodiment where the active agent of the invention is a nucleic acid encoding a polypeptide of the invention, the nucleic acid can be administered in vivo to promote expression

of its encoded protein, by constructing it as part of an appropriate nucleic acid expression vector and administering it so that it becomes intracellular, e.g., by use of a retroviral vector (see, for example, US Patent No. 4,980,286), or by direct injection, or by use of microparticle bombardment (e.g., a gene gun; Biolistic; Dupont), or coating with lipids or cell-surface
5 receptors or transfecting agents, or by administering it in linkage to a homeobox-like peptide which is known to enter the nucleus (see, e.g., Joliot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868, 1991), etc. Alternatively, a nucleic acid can be introduced intracellularly and incorporated within host cell DNA for expression, by homologous recombination.

- 10 *Cellular Transfection and Gene Therapy* The present invention encompasses the use of nucleic acids encoding polypeptides of the invention for transfection of cells in vitro and in vivo. These nucleic acids can be inserted into any of a number of well-known vectors for transfection of target cells and organisms. The nucleic acids are transfected into cells ex vivo and in vivo, through the interaction of the vector and the target cell. The compositions are administered (e.g.,
15 by injection into a muscle) to a subject in an amount sufficient to elicit a therapeutic response.

In another aspect, the invention provides a method of treating a target site, i.e., a target cell or tissue, in a human or other animal including transfecting a cell with a nucleic acid encoding a polypeptide of the invention, wherein the nucleic acid includes an inducible promoter operably
20 linked to the nucleic acid encoding the targeting fusion polypeptide. For gene therapy procedures in the treatment or prevention of human disease, see for example, Van Brunt Biotechnology 6:1149-1154, 1998.

Combination Therapies In numerous embodiments, the polypeptides of the present invention
25 can be administered in combination with one or more additional compounds or therapies. For example, multiple polypeptides can be co-administered in conjunction with one or more therapeutic compounds. The combination therapy may encompass simultaneous or alternating administration. In addition, the combination may encompass acute or chronic administration. The polypeptides of the invention can be administered in combination with anabolic agents such
30 as testosterone or specific androgen receptor modulators (SARMs). Additional anabolic agents include growth hormone (GH) or molecules that induce GH release. Ghrelin is particularly

53

useful in a combination therapy for cachexia, since Ghrelin can cause an increase in appetite. In a similar vein, the polypeptides of the invention can be combined with protein supplements to increase anabolism, or combined with physical therapy or exercise to increase body weight. Any molecule that inhibits myostatin is also a candidate for combination therapy.

5 *Pharmaceutical Compositions.* The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising a IGF precursor protein of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier. The term "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized
10 pharmacopeia for use in animals or humans. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the therapeutic is administered. Such pharmaceutical carriers can be sterile liquids, such as water and oils, including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin, such as peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil and the like. Suitable pharmaceutical excipients include starch, glucose, lactose, sucrose, gelatin, malt, rice, flour,
15 chalk, silica gel, sodium stearate, glycerol monostearate, talc, sodium chloride, dried skim milk, glycerol, propylene, glycol, water, ethanol and the like. The composition, if desired, can also contain minor amounts of wetting or emulsifying agents, or pH buffering agents. These compositions can take the form of solutions, suspensions, emulsion, tablets, pills, capsules, powders, sustained-release formulations and the like. The composition can be formulated as a
20 suppository, with traditional binders and carriers such as triglycerides. Oral formulation can include standard carriers such as pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, cellulose, magnesium carbonate, etc. Examples of suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin.

25 In some embodiments, the composition is formulated in accordance with routine procedures as a pharmaceutical composition adapted for intravenous administration to human beings. Where necessary, the composition may also include a solubilizing agent and a local anesthetic such as lidocaine to ease pain at the site of the injection. Where the composition is to be administered by
30 infusion, it can be dispensed with an infusion bottle containing sterile pharmaceutical grade water or saline. Where the composition is administered by injection, an ampoule of sterile water

84

for injection or saline can be provided so that the ingredients can be mixed prior to administration.

The polypeptides of the invention can be formulated as neutral or salt forms. Pharmaceutically acceptable salts include those formed with free amino groups such as those derived from hydrochloric, phosphoric, acetic, oxalic, tartaric acids, etc., and those formed with free carboxyl groups such as those derived from sodium, potassium, ammonium, calcium, ferric hydroxides, isopropylamine, triethylamine, 2-ethylamino ethanol, histidine, procaine, etc.

10 The amount of a polypeptide of the invention which will be effective in the treatment of a condition or disease can be determined by standard clinical techniques based on the present description. In addition, in vitro assays may optionally be employed to help identify optimal dosage ranges. The precise dose to be employed in the formulation will also depend on the route of administration, and the seriousness of the condition, and should be decided according to the judgment of the practitioner and each subject's circumstances. However, suitable dosage ranges for intravenous administration are generally about 20-5000 micrograms of active compound per kilogram body weight. Suitable dosage ranges for intranasal administration are generally about 0.01 µg/kg body weight to 1 mg/kg body weight. Effective doses may be extrapolated from dose-response curves derived from in vitro or animal model test systems. In particular, a possible dosage regimen can be about 60 to 120 µg/kg body weight, subcutaneous injection, twice daily.

Veterinary Uses

In addition to the aforementioned methods of administration in humans, there may be additional considerations for veterinary administration.

The dosage may differ when administered to a healthy animal versus those animals suffering from a disease. An assessment of the appropriate dosage can easily be made by those skilled in the art using assays known in the art, for example, the myoblast proliferation assay (Example 79) or the mammary epithelial tissue assay (Example 80) as described below. General assays to measure IGF are also known in the art, such as those in Example 81.

Those skilled in the art will recognize that some species of animal exhibit seasonal fertility influenced by the length of the photoperiod. Any embodiment of a veterinary method or use may optionally include starting the treatment method at a specific time within the animal's reproductive cycle in order to achieve the desired effect. Those skilled in the art will know that reproductive status and cycle can easily be determined, and, if desired, synchronized by the use of an appropriate regimen.

When used for veterinary indications, in addition to methods previously mentioned for human use, the IGF-1 or IGF-2 peptide of the present invention can also be used as an oral drench, or a supplement to oral or solid feeds for animals.

The invention is further described but not limited by the following Examples.

Examples

Example 1

A DNA expression vector encoding the hIGF-1-Ea precursor polypeptide containing the following modifications was constructed: deletion of G1, deletion of P2, and deletion of E3; mutation of R37 to A; and deletion of R71 and deletion of S72. These mutations are sometimes referred to as "3mut" throughout the present disclosure. This results in the following secreted protein sequence:

tlcgaelvdaqlqfvcgdrqfyfnkptgygssraapqtgvideccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlknasr
gsagnknyrm (SEQ ID NO:8)

Cos7 cells (available from ATCC) were maintained in DMEM containing 10% fetal bovine serum, 100U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin and plated at a density of 1×10^6 cells per 10-cm plate. These cell cultures were transfected with 8 µg of expression plasmid using Eugene (Roche) according to manufacturer's instructions. Twenty-four hours post-transfection, cells were washed once and cultured in serum-free medium for 48 hours. Supernatants were collected and stored at -80°C.

In order to assess polypeptide stability in human serum, supernatants collected from the Cos7 cells transfected with wild-type (wt) hIGF-1Ea, and hIGF-1Ea3mut were incubated for 16 hours at 37°C either in the absence or presence of 10% human serum (Sigma). Samples were separated by 18% SDS-PAGE, and immunoblotting was performed using goat polyclonal antibody to human IGF-1. The results in Fig. 1A indicate that, while the wt hIGF-1Ea was substantially degraded after incubation with serum for 16 hours, the hIGF-1Ea3mut was stabilized. Densitometry indicated that the ratio of uncleaved to cleaved IGF-1 was about 1:6.2, while the ratio for hIGF-1Ea3mut was about 1:0.68, showing that these mutations result in a stabilized polypeptide.

To confirm that the hIGF-1Ea3mut was able to signal through the IGF-1R, AKT phosphorylation of cells in contact with the polypeptide was measured. C2C12 were purchased from ATCC and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with high glucose (Invitrogen) containing 10% fetal bovine serum (AMIMED), 100U/ml penicillin (Invitrogen), 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen) and 2 mM glutamine (Invitrogen). For analysis of AKT phosphorylation, the C2C12 cells were plated at a density of 0.15×10^6 cells per well of a 6-well plate and were cultured in growth medium for 72 hours. Cells were starved for four hours in serum-free medium and then stimulated with different ligands at 37°C for 30 minutes. Cells were lysed with PhosphoSafe buffer (Cell Signaling) containing various protease inhibitors and cleared by centrifugation at 14,000 x g for 15 minutes at 4°C. AKT phosphorylation and total AKT levels were analyzed by ELISA using PathScan phospho AKT (Ser473) sandwich ELISA kit and PathScan AKT sandwich ELISA kit (Cell Signaling), respectively. The AKT phosphorylation results are summarized in Fig. 2A, which indicate that the hIGF-1Ea3mut was able to activate the IGF-1R cellular pathway to a similar extent as the long-R3-IGF-1 positive control reagent and the recombinant IGF-1. In addition, the data in Fig. 5 directly shows that hIGF-1Ea3mut led to AKT phosphorylation.

Next, to ensure that the receptor specificity of the hIGF-1Ea3mut remained with the IGF-1R, various ligands were added to cultures of NIH3T3 overexpressing either IGF-1R or insulin receptor (InsR). These cells were cultured under the same conditions as described above for Cos7 cells. For analysis of IGF-1R and InsR phosphorylation, NIH3T3-IGF1R and NIH3T3-

InsR cells were plated at a density of 0.2×10^6 cells per well of a 6-well plate and were cultured in growth medium for 24 hours. Cells were starved for 18 hours in serum-free medium and then stimulated with different ligands at 37°C for 10 minutes. Cells were lysed as described above for the AKT experiment, and IGF-1R and InsR phosphorylation levels were analyzed by ELISA using DuoSet IC human phosphor-IGF1R and -InsR ELISA kit (R&D Systems). The results summarized in Figs. 3A and 3B indicate that this IGF-1 precursor polypeptide retains specificity for the IGF-1 receptor and should bind to the related insulin receptor with low affinity.

Example 2

- 10 A DNA expression vector encoding the hIGF-1-Eb precursor polypeptide containing the following mutations was constructed: deletion of G1, deletion of P2, and deletion of E3; mutation of R37 to A; and deletion of R71 and deletion of S72 (i.e., the "3mut"). This results in the following secreted protein sequence:

15 tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssarapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnk
ntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmacrgkkgk (SEQ ID NO:9)

- The polypeptide was assayed in accordance with the procedures described in Example 1 above. Fig. 1B and use of densitometry indicated that the ratio of uncleaved to cleaved IGF-1 was about 1:9, while the ratio for hIGF-1Eb3mut was about 1:1, showing that these modifications result in a stabilized polypeptide. Fig. 2B indicates that the hIGF-1Eb3mut was able to activate the IGF-1R cellular pathway to a similar extent as the long-R3-IGF-1 positive control reagent and the recombinant IGF-1. In addition, the data in Fig. 5 directly shows that hIGF-1Eb3mut led to AKT phosphorylation. The results summarized in Figs. 3C and 3D indicate that this IGF-1 precursor polypeptide retains specificity for the IGF-1 receptor and should bind to the related insulin receptor with low affinity.

Example 3

- 30 A DNA expression vector encoding the hIGF-1-Ec precursor polypeptide containing the following mutations was constructed: deletion of G1, deletion of P2, and deletion of E3;

mutation of R37 to A; and deletion of R71 and deletion of S72 (i.e., the "3mut"). This results in the following secreted protein sequence:

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnkn
5 tksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:10)

The polypeptide was assayed in accordance with the procedures described in Example 1 above. Fig. 1C and use of densitometry indicated that the ratio of uncleaved to cleaved IGF-1 was about 1:5, while the ratio for hIGF-1Ec3mut was about 1:0.96, showing that these modifications result
10 in a stabilized polypeptide. Fig. 2D indicates that the hIGF-1Ec3mut was able to activate the IGF-1R cellular pathway to a similar extent as the long-R3-IGF-1 positive control reagent and the recombinant IGF-1. In addition, the data in Fig. 5 directly shows that hIGF-1Ec3mut led to AKT phosphorylation. The results summarized in Figs. 4A and 4B indicate that this IGF-1 precursor polypeptide retains specificity for the IGF-1 receptor and should bind to the related
15 insulin receptor with low affinity.

Example 4

A DNA expression vector encoding the hIGF-1-Eab chimeric precursor polypeptide containing the following modifications to the hIGF-1-Eb peptide was constructed: deletion of G1, deletion
20 of P2, and deletion of E3; mutation of R37 to A; deletion of R71 and deletion of S72 (i.e., the "3mut"); and insertion of Ea amino acids 93 to 102 between amino acids 95 and 96 of Eb. The insertion creates a putative N-linked glycosylation signal at N92. This results in the following secreted protein sequence:

25 tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnkn
nasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteasqirgkkkeqrreigsmnaecrgkkgk (SEQ ID NO:11)

The polypeptide was assayed in accordance with some of the procedures described in Example 1 above. Fig. 2C indicates that the hIGF-1Eab3mut was able to activate the IGF-1R cellular
30 pathway to a similar extent as the long-R3-IGF-1 positive control reagent and the recombinant

IGF-1. The results summarized in Figs. 4C and 4D indicate that this IGF-1 precursor polypeptide retains specificity for the IGF-1 receptor and does not activate the insulin receptor.

Example 5

- 5 A DNA expression vector encoding the hIGF-1-Eb multimer precursor polypeptide containing the following mutations was constructed: deletion of G1, deletion of P2, deletion of E3, deletion of R36, deletion of R37, deletion of R71, deletion of S72, deletion of the last seven C-terminal amino acids of Eb; and insertion to the C-terminus of this precursor of two additional Eb peptides both without the R71 and S72 and last seven C-terminal amino acids and a fourth and final Eb peptide without the R71 and S72. Fig. 6A shows a schematic drawing of this construct. This results in the following secreted protein sequence:

15 tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygsssapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnknt
ksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaersvraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeq
kegteaslqirgkkkeqrreigsmaersvraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqr
eigsmaersvraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaecrgkkgk
(SEQ ID NO:12)

- This polypeptide was subjected to an AKT phosphorylation assay as described in Example 1.
20 Fig. 5 indicates that this hIGF-1-Eb multimer was able to signal through the IGF-1R pathway.

Example 6

- A hIGF-1-Eb precursor polypeptide of the invention as shown schematically in Fig. 6B can be expressed. This construct contains the following modifications: deletion of G1, deletion of P2,
25 deletion of E3, deletion of R36, deletion of R37, deletion of R71, deletion of S72; and the insertion of Ea amino acids 93-102 between amino acids 95 and 96 of Eb, thereby creating an N-linked glycosylation site at position N92 and N100. This results in the following secreted protein sequence:

30 tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygsssapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnkna
srgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaecrgkkgk (SEQ ID NO:13)

Example 7

A hIGF-2-E precursor polypeptide of the invention having the following modifications can be expressed: deletion of P4, deletion of S5, and deletion of E6; mutation of R38 to A; and deletion of R68 and deletion of D69. This results in the following secreted protein sequence:

ayrtlcggelvdltlqfvcgdrfyfsrpsrvsrargiveeccfrscdlalletycatpaksevpptvlpdnfprypvgkffqydtwkq
stqrlrrglpallrarrghvlakeleafreakhrplialptqdpahggappemasnrk (SEQ ID NO:14)

10 Example 8

A hIGF-1-Ea precursor polypeptide of the invention having the following mutations can be expressed: deletion of G1 and deletion of P2; mutation of E3 to X where X is a nonnatural amino acid that is pegylated; mutation of R37 to A; and deletion of R71 and deletion of S72. This results in the following secreted protein sequence:

15 Xtlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssaapqtgideccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlkna
rgsagnknyrm (SEQ ID NO:15)

Examples 9-78 (Δ = deletion)

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

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssaapqtgideccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlknas
rgsagnknyrm (SEQ ID NO:16)

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

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssaapqtgideccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkevhlknas
rgsagnknyrm (SEQ ID NO:17)

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

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlnasr
gsagnknyrm (SEQ ID NO:18)

11) hIGF-1-Ea: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$

5

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlnas
rgsagnknyrm (SEQ ID NO:19)

12) hIGF-1-Ea: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta S72$

10

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkevhlnas
rgsagnknyrm (SEQ ID NO:20)

13) hIGF-1-Ea: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$, $\Delta R37$; $\Delta R71$

15

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlnasr
gsagnknyrm (SEQ ID NO:21)

14) hIGF-1-Ea: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$, $\Delta R37$; $\Delta S72$

20

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkevhlnasr
gsagnknyrm (SEQ ID NO:22)

15) hIGF-1-Ea: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; $\Delta R37$; $\Delta R71$, $\Delta S72$

25

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlnasrg
sagnknyrm (SEQ ID NO:23)

16) hIGF-1-Eb: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R36A; $\Delta R71$

30

tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksasvraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaecrgkkgk (SEQ ID NO:24)

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

5

tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaecrgkkgk (SEQ ID NO:25)

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

10

tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksasvraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaecrgkkgk (SEQ ID NO:26)

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

15

tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaecrgkkgk (SEQ ID NO:27)

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

20

tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnk
ntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaecrgkkgk (SEQ ID NO:28)

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

25

tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksasvraqrhtdmpktqkyqppstnk
ntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaecrgkkgk (SEQ ID NO:29)

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

30

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstnk
ntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:30)

23) hIGF-1-Eb: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$, $\Delta R37$; $\Delta R71$, $\Delta S72$

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnk
tksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:31)

24) hIGF-1-Ec: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R36A; $\Delta R71$

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:32)

25) hIGF-1-Ec: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R36A; $\Delta S72$

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:33)

26) hIGF-1-Ec: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R36A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnk
ntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:34)

27) hIGF-1-Ec: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E2$; R37A; $\Delta R71$

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:35)

28) hIGF-1-Ec: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta S72$

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:36)

29) hIGF-1-Ec: Δ G1, Δ P2, Δ E3; R37A; Δ R71, Δ S72

5

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
ntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:37)

30) hIGF-1-Ec: Δ G1, Δ P2, Δ E3, Δ R37, Δ R71

10

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksasvraqrhtdmpktqkyqppstn
ntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:38)

31) hIGF-1-Ec: Δ G1, Δ P2, Δ E3, Δ R37, Δ S72

15

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstn
ntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:39)

32) hIGF-1-Eab: Δ G1, Δ P2, Δ E3; R36A; Δ R71; insertion of Ea aa 93-102 between aa 95 and 96
of Eb (i.e., "Eab")

20

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksasvraqrhtdmpktqkyqppstn
knasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:40)

25 33) hIGF-1-Eab: Δ G1, Δ P2, Δ E3; R37A; Δ R71

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksasvraqrhtdmpktqkyqppstn
knasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:41)

30 34) hIGF-1-Eab: Δ G1, Δ P2, Δ E3, Δ R37, Δ R71

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksasvraqrhtdmpktqkyqppstnk
nasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslrqgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:42)

35) hIGF-1-Eab: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R36A; $\Delta S72$

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstn
knasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslrqgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:43)

36) hIGF-1-Eab: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta S72$

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstn
knasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslrqgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:44)

37) hIGF-1-Eab: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$, $\Delta R37$, $\Delta S72$

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstnk
nasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslrqgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:45)

38) hIGF-1-Eab: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R36A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnk
nasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslrqgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:46)

39) hIGF-1-Eab: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$, $\Delta R37$, $\Delta R71$, $\Delta S72$

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnk
asrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslrqgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:47)

40) hIGF-1-Ea: $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

gtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlkna
srgsagnknyrm (SEQ ID NO:48)

41) hIGF-1-Eb: $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

gtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmacrgkkgk (SEQ ID NO:49)

42) hIGF-1-Eb multimer: ($\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A)-3xEb($\Delta R71$, $\Delta S72$, ΔC -term 7 aa)-Eb($\Delta R71$,
 $\Delta S72$)

tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnk
ntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmacrgkkgk
kegteaslqirgkkkeqrreigsmacrgkkgk
gsmacrgkkgk (SEQ ID NO:50)

43) hIGF-1-Eb multimer: ($\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A)-3xEb($\Delta R71$, $\Delta S72$, ΔC -term 7 aa)-Eb($\Delta R71$,
 $\Delta S72$)

gtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmacrgkkgk
qkegteaslqirgkkkeqrreigsmacrgkkgk
eigsmacrgkkgk (SEQ ID NO:51)

44) hIGF-1-Ec: $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

gtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:52)

45) hIGF-1-Ea: ΔE3; R37A; ΔR71, ΔS72

gptlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlkn
asrgsagnknym (SEQ ID NO:53)

5

46) hIGF-1-Eb: ΔE3; R37A; ΔR71, ΔS72

gptlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppst
nkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsnaecrgkkgk (SEQ ID NO:54)

10

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

15

tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnk
ntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeq
kegteaslqirgkkkeqrreigsnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrrei
gsnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsnaecrgkkgk (SEQ
ID NO:55)

20

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

25

gptlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppst
nkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpg
geqkegteaslqirgkkkeqrreigsnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeq
rreigsnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsnaecrgkkgk
(SEQ ID NO:56)

49) hIGF-1-Ec: ΔE3; R37A; ΔR71, ΔS72

30

gptlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppst
nkntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:57)

50) hIGF-1-Ea: $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

gptlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlkn
5 asrgsagnknym (SEQ ID NO:58)

51) hIGF-1-Eb: $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

gptlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppst
10 nkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:59)

52) hIGF-1-Ec: $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

gptlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppst
15 nkntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:60)

53) hIGF-1-Eab: $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

gptlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppst
20 nknsrgsagnknntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:61)

54) hIGF-1-Eb multimer: ($\Delta E3$; R37A)-3xEb($\Delta R71$, $\Delta S72$, ΔC -term 7 aa)-Eb($\Delta R71$, $\Delta S72$)

gptlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppst
25 nkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpg
geqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeq
reigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk
(SEQ ID NO:62)

30 55) hIGF-1-Ea: E3A; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

gpatlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlk
nasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:63)

56) hIGF-1-Eb: E3A; R37A; ΔR71, ΔS72

5 gpatlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqpps
tnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteasqlirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:64)

57) hIGF-1-Ec: E3A; R37A; ΔR71, ΔS72

10 gpatlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqpps
tnkntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:65)

58) hIGF-1-Eab: E3A; R37A; ΔR71, ΔS72

15 gpatlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqpps
tnknasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteasqlirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEQ ID NO:66)

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

20 gpatlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqpps
tnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteasqlirgkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpg
geqkegteasqlirgkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteasqlirgkkkeq
rreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteasqlirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk

25 (SEQ ID NO:67)

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

30 gtlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlkna
srgsagnknyrm (SEQ ID NO:68)

61) hIGF-1-Eb: $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

gtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgideccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmacrgkkgk (SEQ ID NO:69)

62) hIGF-1-Ec: $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

gtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgideccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:181)

63) hIGF-1-Eab: $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

gtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgideccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
knasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmacrgkkgk (SEQ ID NO:70)

64) hIGF-1-Eb multimer: ($\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A)-3xEb($\Delta R71$, $\Delta S72$, ΔC -term 7 aa)-Eb($\Delta R71$, $\Delta S72$)

gtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgideccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmacrgkkgk
qkegteaslqirgkkkeqrreigsmacrgkkgk
eigsmacrgkkgk
(SEQ ID NO:71)

65) hIGF-1-Eb: $\Delta G1$, $\Delta P2$; E3X; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

Xtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgideccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmacrgkkgk (SEQ ID NO:72)

66) hIGF-1-Ec: $\Delta G1$, $\Delta P2$; E3X; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

Xtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:73)

67) hIGF-1-Eab: $\Delta G1$, $\Delta P2$; E3X; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

5

Xtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
knasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteasqirgkkkeqrreigsmaecrgkkgk (SEQ ID NO:74)

68) hIGF-1-Eb multimer: ($\Delta G1$, $\Delta P2$; E3X; R37A)-3xEb($\Delta R71$, $\Delta S72$, ΔC -term 7 aa)-Eb($\Delta R71$,
10 $\Delta S72$)

Xtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteasqirgkkkeqrreigsmaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpgge
qkegteasqirgkkkeqrreigsmaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteasqirgkkkeqr
15 eigsmaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteasqirgkkkeqrreigsmaecrgkkgk
(SEQ ID NO:75)

69) hIGF-1-Ea: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$; S72X

20 tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksXvraqrhtdmpktqkevhlkna
srgsagnknyrm (SEQ ID NO:76)

70) hIGF-1-Eb: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$; S72X

25 tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksXvraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteasqirgkkkeqrreigsmaecrgkkgk (SEQ ID NO:77)

71) hIGF-1-Ec: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$; S72X

30 tlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksXvraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgstfeerk (SEQ ID NO:78)

72) hIGF-1-Eab: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$; S72X

5 tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfinkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksXvraqrhtdmpktqkyqppstn
knasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaecrgkkgk (SEQ ID NO:79)

73) hIGF-1-Eb multimer: ($\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A)-Eb($\Delta R71$; S72X; ΔC -term 7 aa)-2xEb($\Delta R71$, $\Delta S72$, ΔC -term 7 aa)-Eb($\Delta R71$, $\Delta S72$)

10 tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfinkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksXsavraqrhtdmpktqkyqppstn
kntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpgge
qkegteaslqirgkkkeqrreigsmaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrr
eigsmaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaecrgkkgk
(SEQ ID NO:80)

15

74) hIGF-1-Ea: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$; N92X

tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfinkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlkXas
rgsagnknyrm (SEQ ID NO:81)

20

75) hIGF-1-Eb: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$; C142X

tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfinkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnk
ntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaeXrgkkgk (SEQ ID NO:82)

25

76) hIGF-1-Eab: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$; C151X

tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfinkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnk
nasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsmaeXrgkkgk (SEQ ID NO:83)

30

78) hIGF-1-Eb multimer (Δ G1, Δ P2, Δ E3; R37A)-3xEb(Δ R71, Δ S72, Δ C-term 7 aa)-Eb(Δ R71, Δ S72; C71X)

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfknkptgygssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnk
 5 ntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeq
 kegteaslqirgkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrrei
 gsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaeXrgkkgk (SEQ
 ID NO:84)

10 Example 79: Myoblast Proliferation Assay

The myoblast proliferation assay provides a reliable in vitro indicator of IGF activity and is used as a model for factors affecting embryonic myoblasts and adult satellite cells. Factors active in this system behave similarly in primary cultures of myoblasts. The enhancement of myoblast proliferation in vitro by a peptide of this invention indicates its activity in causing increased
 15 myoblast proliferation and, therefore, an increase in ultimate myofiber number in utero. In addition, similar enhancement of myoblast proliferation indicates that peptides of this invention can be used to enhance adult muscle hypertrophy, e.g. via stimulation of satellite muscle cell proliferation.

20 Example 80: Mammary Epithelial Tissue Assay

In lactating animals, the amount of mammary epithelial tissue is a limiting factor in milk production, as these are the cells which produce and secrete milk. Employing in vitro systems, epithelial cells obtained from mammary glands of animals can be stimulated by the modified IGF-1 or IGF-2 of the present invention to proliferate and produce increased quantities of milk
 25 constituents. It can further be demonstrated that mammary epithelial cells stimulated to proliferate in one such in vitro cell system can be reimplanted in cleared mammary fat pads and be stimulated to proliferate and/or produce milk in lactating female animals.

Example 81: Measurement of IGF-1 or IGF-2 in Blood or Other Body Fluids

30 The effective amount of the peptide administered parenterally per dose can be measured by a dose-response curve. For example, modified IGF peptides of the invention can be measured in

the blood or body fluids of the subject to be treated to determine the dosing. Alternatively, one can administer increasing amounts of the peptide to the subject and check the serum levels of the subject for modified IGF-1 and IGF-2. The amount of peptide to be employed can be calculated on a molar basis based on these serum levels of modified IGF-1 or IGF-2.

5

One method for determining appropriate dosing of the peptide entails measuring an IGF peptide of the invention in a biological fluid such as a body or blood fluid. Measuring such levels can be done by any means, including RIA and ELISA. After measuring IGF levels, the fluid is contacted with the peptide using single or multiple doses. After this contacting step, the IGF levels are re-measured in the fluid. If the fluid IGF levels have fallen by an amount sufficient to produce the desired efficacy for which the molecule is to be administered, then the dose of the molecule can be adjusted to produce maximal efficacy. This method may be carried out in vitro or in vivo. Preferably, this method is carried out in vivo, i.e., after the fluid is extracted from a subject and the IGF levels measured, the peptide herein is administered to the mammal using single or multiple doses (that is, the contacting step is achieved by administration to an animal), and then the IGF levels are re-measured from fluid extracted from the animal.

10

15

Another method for determining dosing is to use antibodies to the peptide or another detection method for the peptide in the LIFA format.

20

Example 82: In Vivo Pharmacokinetics of hIGF-1-Ec 3mut

Adult male mice (n = 3/group) received an intravenous (i.v.) bolus injection of rhIGF-1 at 1 mg/kg, and hIGF-1-Ec 3mut (described in Example 3) at 1.55 mg/kg. Serial blood specimens were collected at 5, 15, 30 and 60 minutes after administration of test material. Serum concentrations of rhIGF-1 and hIGF-1-Ec 3mut were determined by ELISA. This assay is specific for hIGF-1.

25

30

Equimolar doses of rhIGF-1 and hIGF-1-Ec 3mut were administered i.v. in mice. The results show significantly higher levels of the hIGF-1-Ec 3mut protein as compared to rhIGF-1 at all examined time points, indicating that the hIGF-1-Ec 3mut is metabolically more stable than the 70 amino acid-long IGF-1.

1. A polypeptide comprising a human IGF-1 precursor protein, wherein the cleavage of the E-peptide from IGF-1 by a protease is reduced by modification of the precursor protein.

2. The polypeptide of claim 1, wherein the precursor protein comprises the Ea peptide.

3. The polypeptide of claim 1, wherein the precursor protein comprises the Eb peptide.

4. The polypeptide of claim 3, wherein the last seven C-terminal amino acids of Eb are deleted.

5. The polypeptide of claim 1, wherein the precursor protein comprises the Ec peptide.

6. The polypeptide of any preceding claim, wherein G1 of the precursor protein is deleted or mutated.

7. The polypeptide of any preceding claim, wherein P2 of the precursor protein is deleted or mutated.

8. The polypeptide of any preceding claim, wherein E3 of the precursor protein is deleted or mutated.

9. The polypeptide of any preceding claim, wherein R36 of the precursor protein is deleted or mutated.

10. The polypeptide of any preceding claim, wherein R36 is mutated to alanine.

11. The polypeptide of any preceding claim, wherein R37 of the precursor protein is deleted or mutated.

12. The polypeptide of any preceding claim, wherein R37 is mutated to alanine.
13. The polypeptide of any preceding claim, further comprising the N-linked
5 glycosylation consensus sequence NXS/T.
14. The polypeptide of claim 3, further comprising amino acids 93-102 of Ea inserted between amino acids N95 and T96 of the Eb.
- 10 15. The polypeptide of any preceding claim, further comprising an oligosaccharide covalently linked to an amino acid side chain of the precursor protein.
16. The polypeptide of claim 15, wherein the oligosaccharide is covalently linked to an arginine side chain of the precursor protein.
- 15 17. The polypeptide of any preceding claim, wherein a residue of the precursor protein is replaced by a non-natural amino acid.
18. The polypeptide of claim 17, wherein the non-natural amino acid comprises an
20 acetylene or azido group.
19. The polypeptide of any preceding claim, further comprising a poly(ethylene glycol) moiety covalently attached to a side-chain of the precursor protein.
- 25 20. The polypeptide of any preceding claim, further comprising an additional E-peptide linked to the C-terminus of the precursor protein.
21. A polypeptide comprising, from N-terminus to C-terminus,
an IGF-1 precursor protein comprising a first Eb peptide, wherein
30 G1, P1, and E1 are deleted,
R36 and R37 are deleted,

R71 and S72 are deleted, and
the last seven C-terminal amino acids of the first Eb peptide are
deleted;

a second Eb peptide, wherein R71, S72, and the last seven C-terminal
5 amino acids of the second Eb peptide are deleted;

a third Eb peptide, wherein R71, S72, and the last seven C-terminal amino
acids of the third Eb peptide are deleted; and

a fourth Eb peptide, wherein R71 and S72 are deleted.

10 22. The polypeptide of any of claims 1 to 20, wherein R71 or S72 of the precursor
protein is deleted or mutated.

23. A polypeptide comprising a human IGF-2 precursor protein, wherein the cleavage
of the E-peptide from IGF-2 by a protease is reduced by modification of the precursor protein.

15

24. The polypeptide of claim 23, wherein R68 or D69 of the precursor protein is
deleted or mutated.

25. A method of treating a musculoskeletal disease, diabetes, neuronal cell death, or
20 anemia, the method comprising administering a therapeutically effective amount of a polypeptide
of any preceding claim to a subject.

26. The use of the polypeptide of any of claims 1 to 24 for the manufacture of a
medicament for the treatment of a musculoskeletal disease, diabetes, neuronal cell death, or
25 anemia.

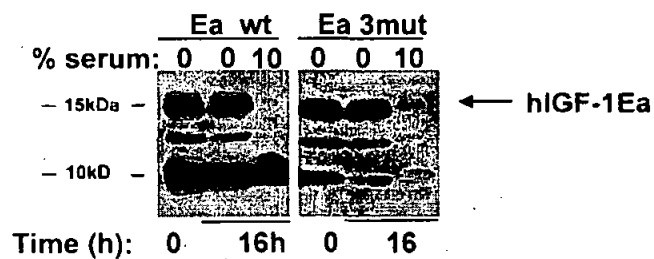
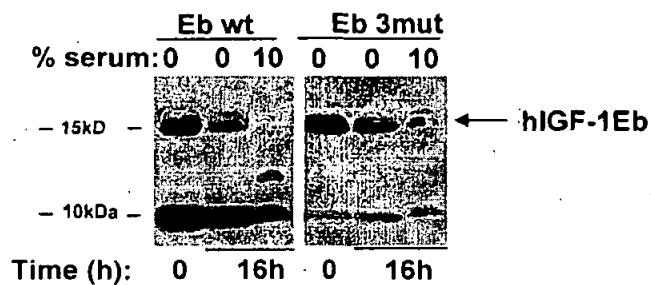
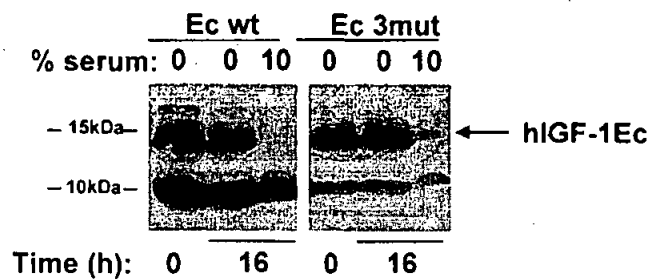
Fig. 1A**Fig. 1B****Fig. 1C**

Fig. 2A

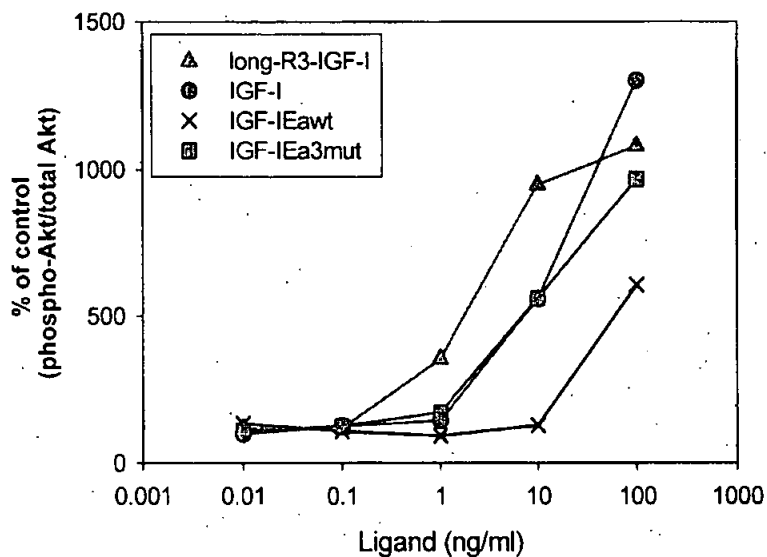


Fig. 2B

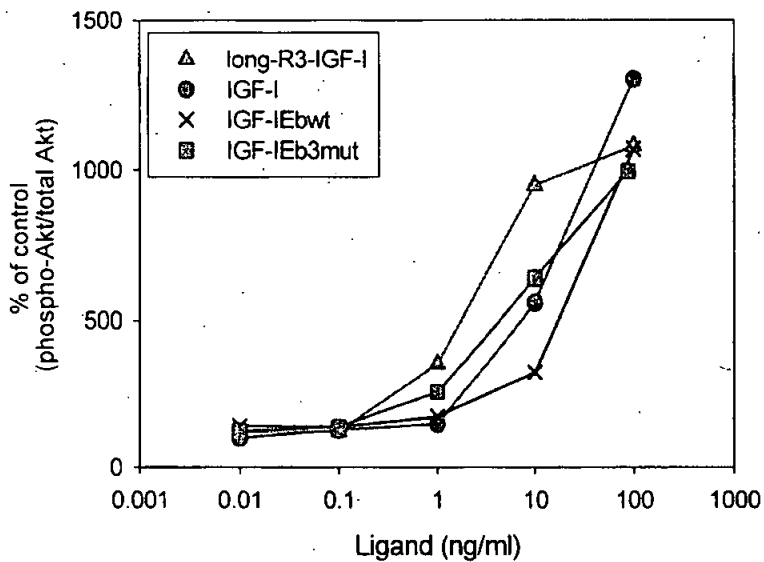


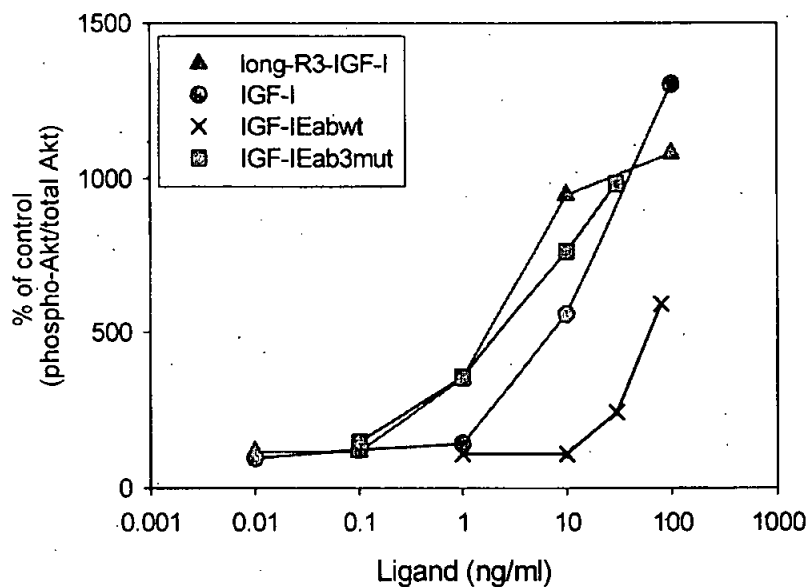
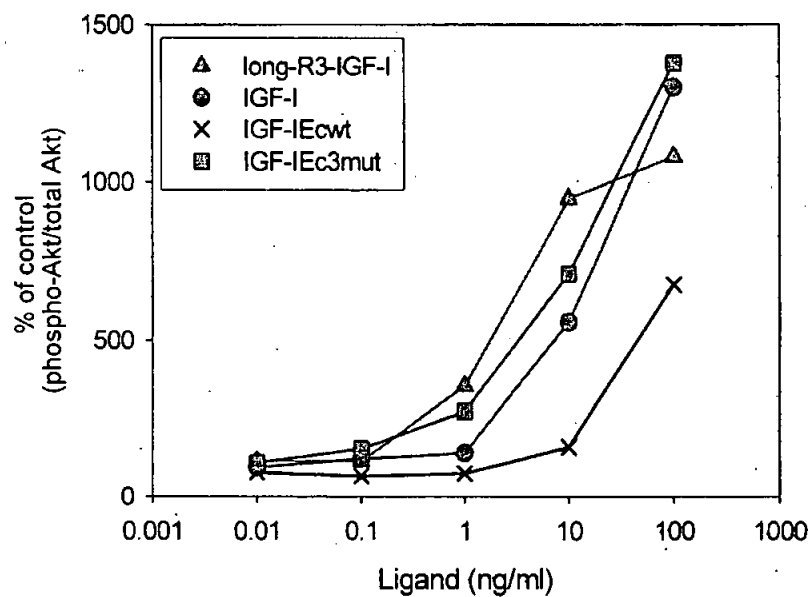
Fig. 2C**Fig. 2D**

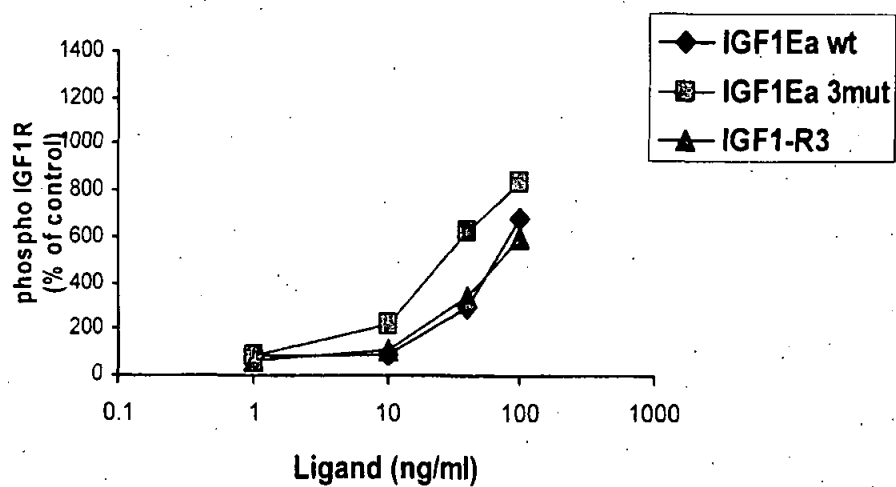
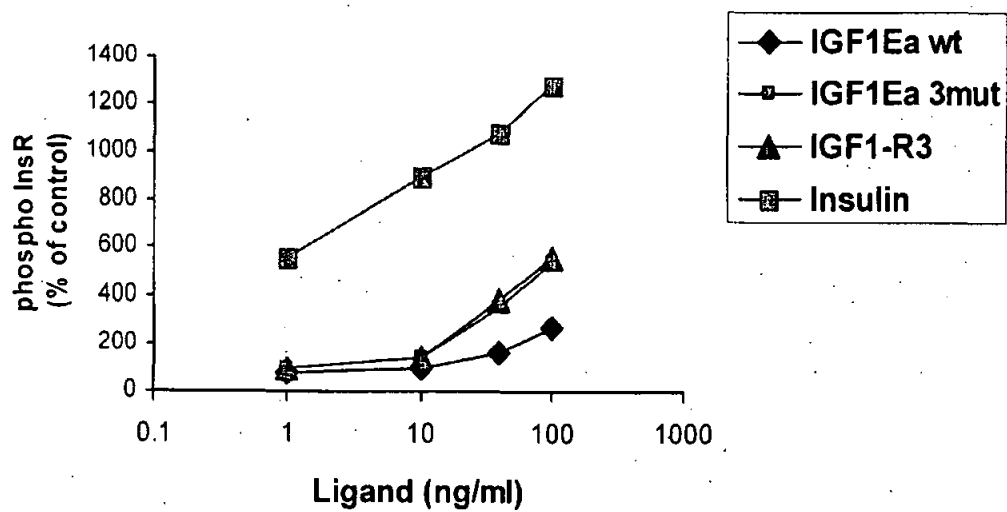
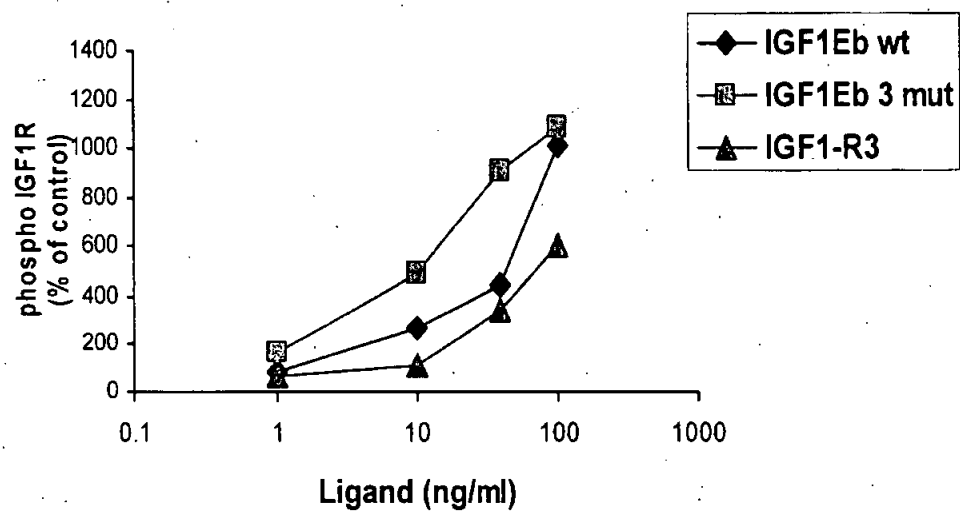
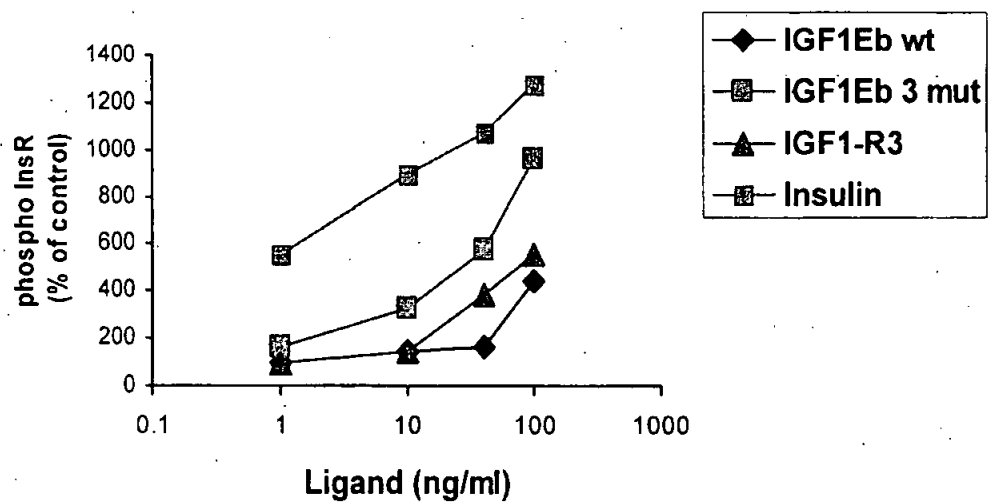
Fig. 3A**Fig. 3B**

Fig. 3C**Fig. 3D**

6/20

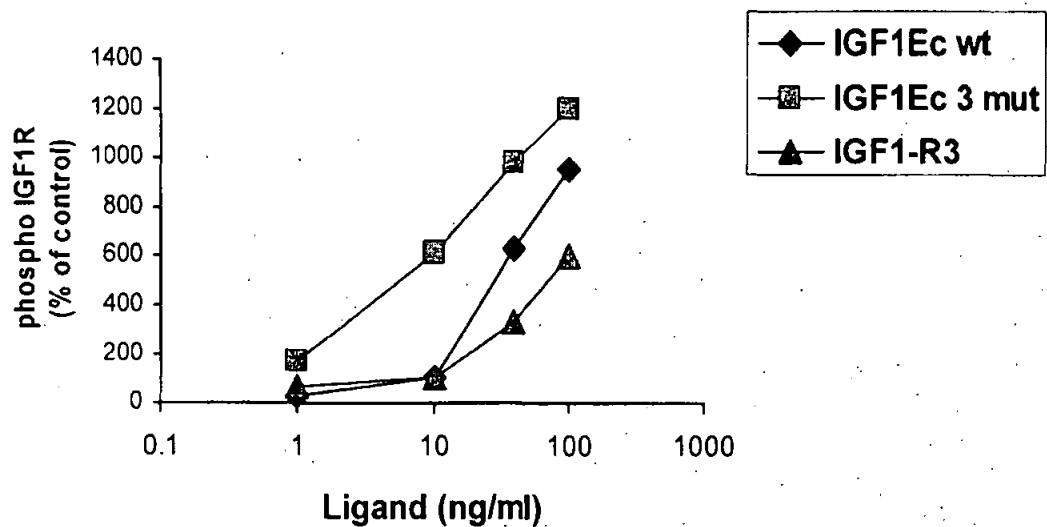
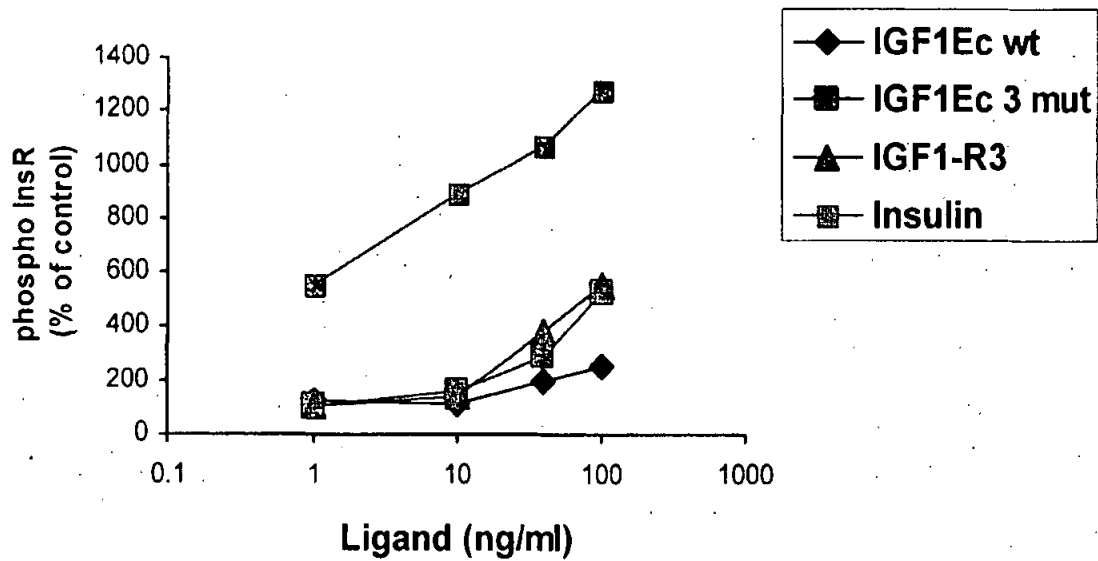
Fig. 4A**Fig. 4B**

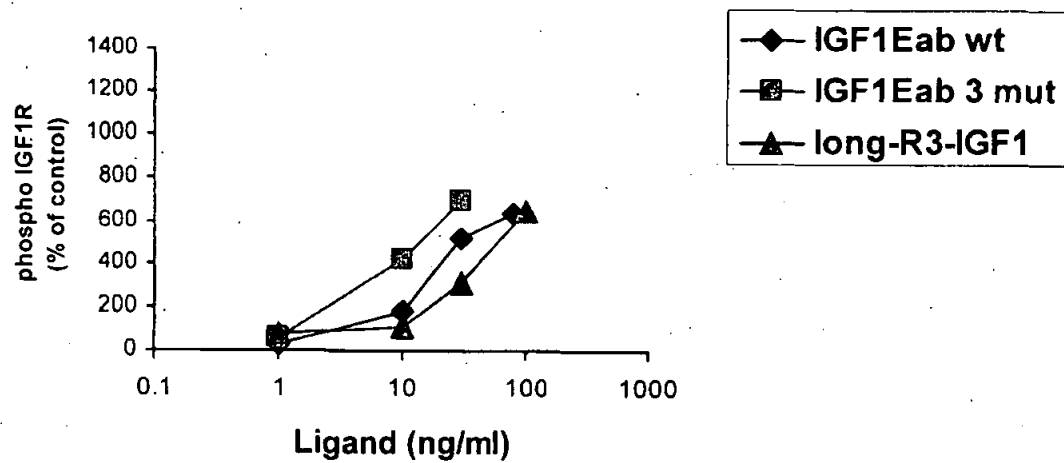
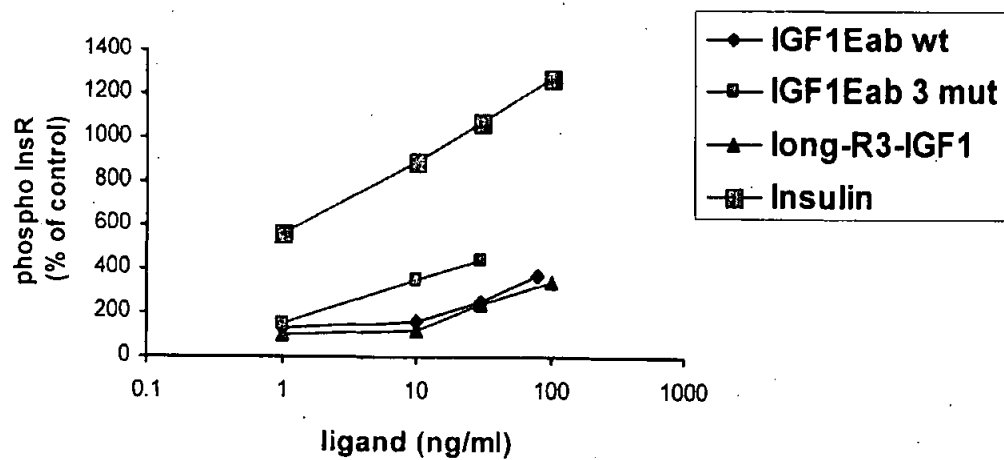
Fig. 4C**Fig. 4D**

Fig. 5

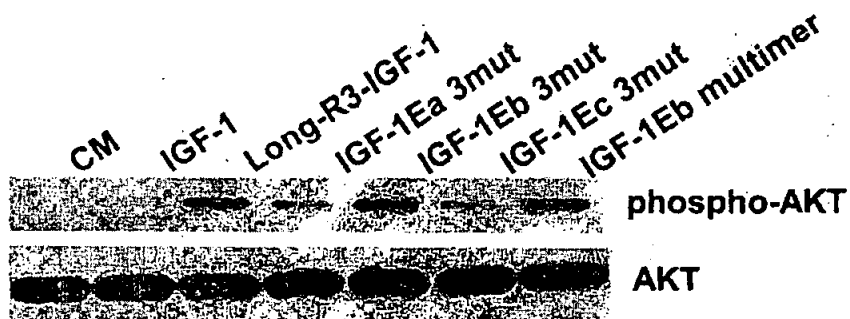


Fig. 6A

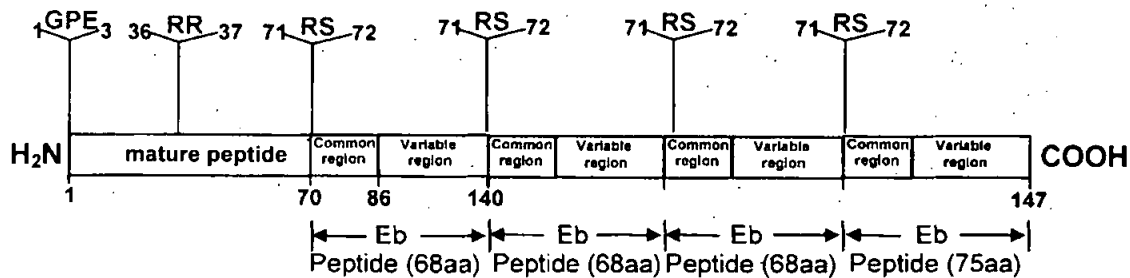
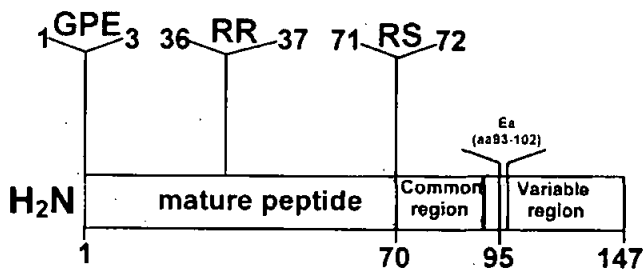


Fig. 6B



9/20

Fig. 7A

Majority	SEQ ID NO					
	50	60	70	80	90	100 110
Human IGF-1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA 1					
Human IA EAW97695.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA 1					
Human IB P05019	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA 1					
Pig ref NP_999421.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA 1					
Pig CAA35527	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA 1					
Pig class1 ABG88023.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA 1					
Pig class2 ABG88024.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA 1					
Cow Hereford ref NP_001071296.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA 1					
Cow CAA33746.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA 1					
Sheep ref NP_001009774.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA 1					
Sheep ABB02295.1	-----LVDAQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 85					
Goat BAB77524.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 86					
Goat P51457	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 87					
Dog P33712	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 87					
Dog Iso1B XP_866946.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1					
Dog Iso2 XP_853117.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1					
Dog Iso3 XP_866935.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1					
Equine AAB47485.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1					
Rhesus macaque XP_001094129.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1					
chimpanzee XP_001156459.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1					
Tiger Q6GUL6	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1					
RedPanda Q6IVA5	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1					
GiantPanda Q6JLX1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1					
RedDeer ABL98032.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 88					
Rabbit AAB48032.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 89					
Rabbit Q95222	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 90					
Guinea pig P17647	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 90					
Rat ref NP_849197.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 91					
Rat CAA29436.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 91					
Mouse Iso1 ref NP_034642.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 92					
Mouse Iso2 ref NP_908941.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 93					
Mouse AAL34535.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 93					
Mouse Iso2b AAX61180.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 93					
chicken NP_001004384.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 94					
Turkey AAC26006.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 94					
Japanesequail AAF67202.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 94					
Japanesequail P51462	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 94					
Goose ABF57993.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 94					
Duck P33712	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 94					
Duck ABA02291.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1					
Salmon AAA67268.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 94					
Salmon AAA67267.1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 94					
GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 95	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 95					
GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 96	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 96					
GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 97	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 97					
GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 98	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 98					
GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 99	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 99					
GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 100	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 100					
GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 101	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 101					
GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 102	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 102					
GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 103	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 103					
GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 104	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 104					
GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 105	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 105					
GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 106	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 106					
GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 107	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 107					
GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 108	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 108					
GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1	GPETLCGAELVDLQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAAKSA 1					

Fig. 7B

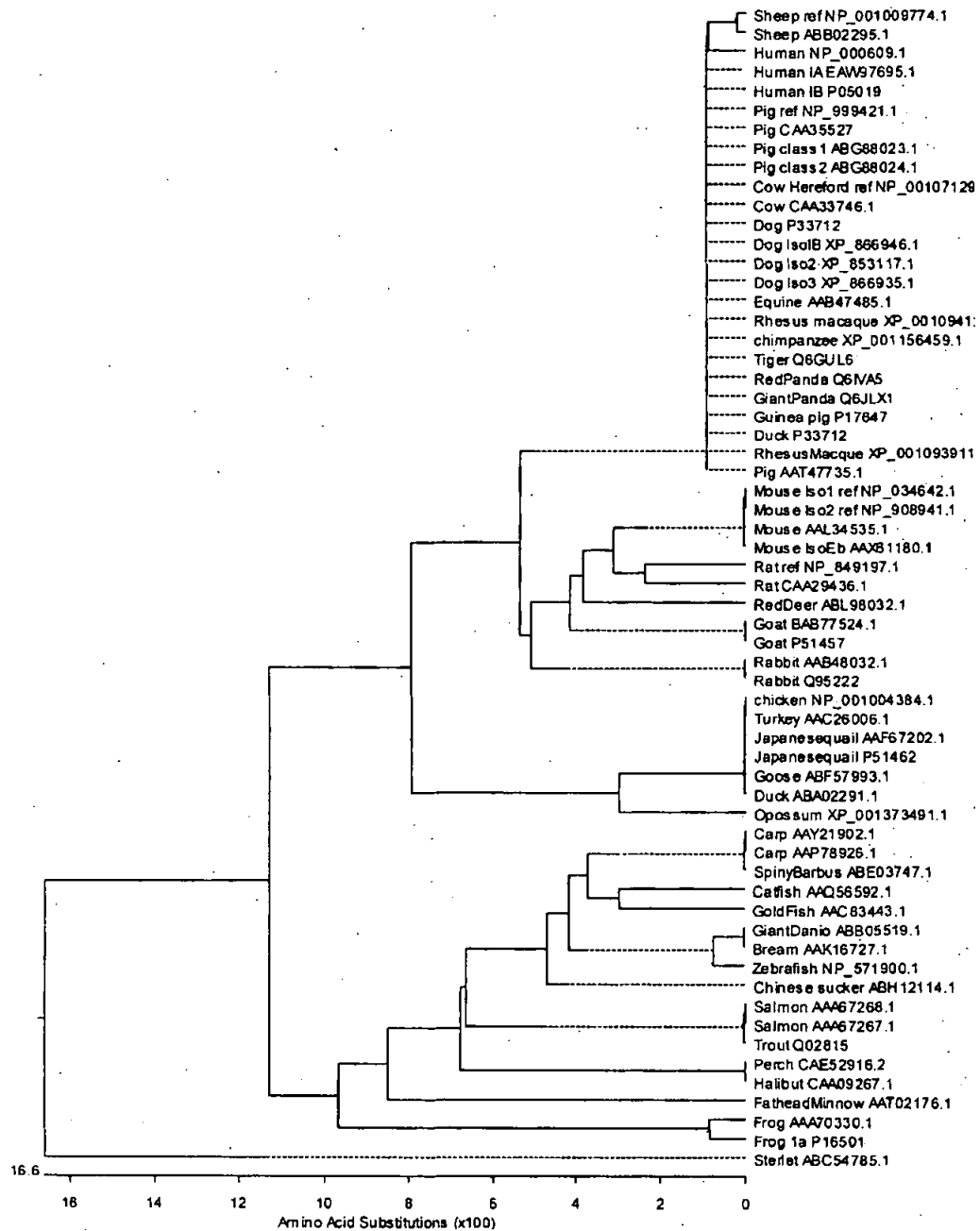


Fig. 8A

Majority	SEQ ID NO		
	10	20	30
	-----+-----+-----+-----		
	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSTGNKNYRM 109		
Human Ea	RSVRAQRHTDMPKTKQEVHLKNASRGSGAGNKNYRM 2		
Pig ref NP_999421.1	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSSGNKNYRM 109		
Pig CAA35527	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSSGNKNYRM 109		
Pig class1 ABG88023.1	RSVRAQRHTDMPKARKEVHLKNTSRGSSGNKNYRM 110		
Pig class2 ABG88024.1	RSVRAQRHTDMPKARKEVHLKNTSRGSSGNKNYRM 110		
Cow Hereford ref NP_001071296.1	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 111		
Cow CAA33746.1	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 111		
Sheep ref NP_001009774.1	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 111		
Sheep ABB02295.1	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 111		
Goat BAB77524.1	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 111		
Goat P51457	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 111		
Dog P33712	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNASRGSGAGNKNYRM 112		
Dog Iso2 XP_853117.1	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNASRGSGAGNKNYRM 113		
Dog Iso3 XP_866935.1	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNASRGSGAGNKNYRM 113		
Equine AAB47485.1	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 111		
Rhesus macaque XP_001094129.1	RSVRAQRHTDMPKTKQEVHLKNASRGSGAGNKNYRM 2		
Tiger Q6GUL6	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNASRGSGAGNKNYRM 113		
RedPanda Q6IVA5	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNASRGSGAGNKNYRM 113		
GiantPanda Q6JLX1	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNASRGSGAGNKNYRM 113		
RedDeer ABL98032.1	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 111		
Rabbit AAB48032.1	RSVRAQRHTDMPKTKQEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 114		
Guinea pig P17647	RSVRAQRHTDMPKTKQEVHLKNASRGSGAGNKNYRM 2		
Rat ref NP_849197.1	RSIRAQRHTDMPKTKQEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 115		
Rat CAA29436.1	RSIRAQRHTDMPKTKQEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 115		
Mouse AAL34535.1	RSIRAQRHTDMPKTKQEVHLKNTSRGSAGNKNYRM 115		
chicken NP_001004384.1	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGNTGNRNYRM 116		
Turkey AAC26006.1	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGNTGNRNYRM 117		
Japanesequail AAF67202.1	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGNTGNRNYRM 116		
Japanesequail P51462	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGNTGNRNYRM 116		
Goose ABF57993.1	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGNTGN 118		
Duck P33712	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNASRGSGAGNKNYRM 112		
Salmon AAA67268.1	RSVRAQRHTDMPRTPKVEHQKNSSRGNTGGRNYRM 119		
Salmon AAA67267.1	RSVRAQRHTDMPRTPKVEHQKNSSRGNTGGRNYRM 119		
Sterlet ABC54785.1	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHKNSSRGNTGNRNYRI 120		
Perch CAE52916.2	RSVRAQRHTDMPRTPKVEHQKNSSRGNTGGRNYRM 121		
Trout Q02815	RSVRAQRHTDMPRTPKVEHQKNSSRGNTGGRNYRM 119		
Halibut CAA09267.1	RSVRAQRHTDMPRTPKVEHQKNSSRGNTGGRNYRM 122		
Catfish AAQ56592.1	RSVREQRHTDTPKTPKEVHQKNSSRGNTGGRNYRM 123		
Carp AAY21902.1	RSIRAQRHTDSPKTAKEVHQKNSSRGNTGGRNYRM 124		
Carp AAP78926.1	RSVRAQRHTDSPRTAKEVHQKNSSRGNTGGRNYRI 125		
GiantDanio ABB05519.1	RSLRAQRHTDIPRTAKEVHQKNSSRGNTGGRNYRM 126		
Zebrafish NP_571900.1	RSLRAQRHTDIPRTPKVEVHQKNSSRGNTGGRNYRM 127		
Chinese sucker ABH12114.1	RSLRAQRHTDIPRTPKDVHQKNSSRGNTGGRNYRM 128		
SpinyBarbus ABE03747.1	RSLRAQRHTDSPRTAKEVHQKNSSRGNTGGRNYRI 129		
FatheadMinnow AAT02176.1	RSLRAQRHTDIPRTAKEVHQKNSSRGITGGRNYRM 130		
GoldFish AAC83443.1	RSLRAQRHTDGTRTAKEVHQKNSSRGNTGGRNYRM 131		
Frog AAA70330.1	RSVRAQRHTDMPKAQKEVHPKNTSRGNTGSRGFRM 132		
Bream AAK16727.1	RSLRAQRHTDIPRTAKEVHQKNSSRGNTGGRNYRI 133		
Frog la P16501	RSVRTQRHTDMPKAQKEVHPKNTSRGNTGSRGFRM 134		

12/20

Fig. 8B

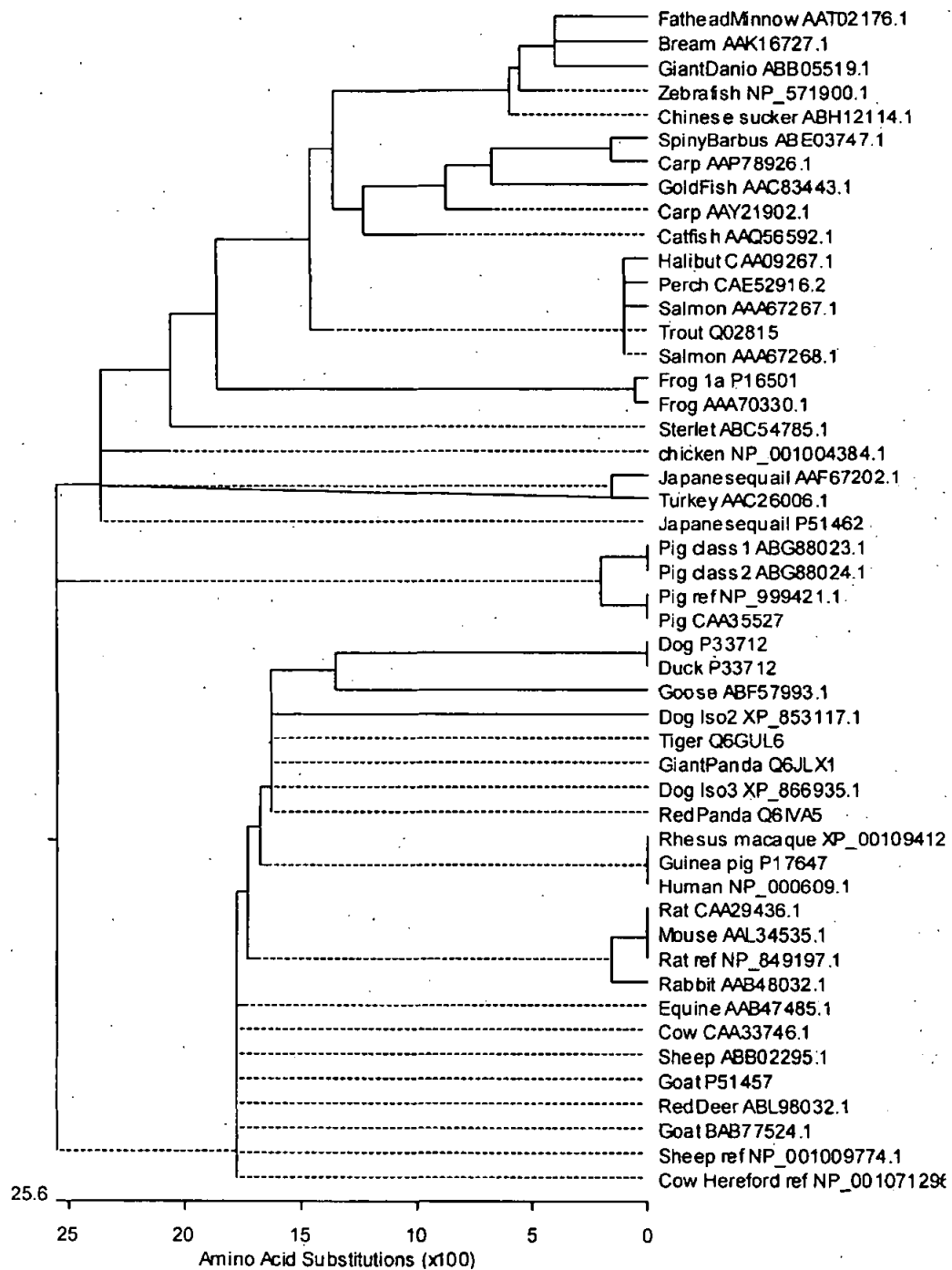


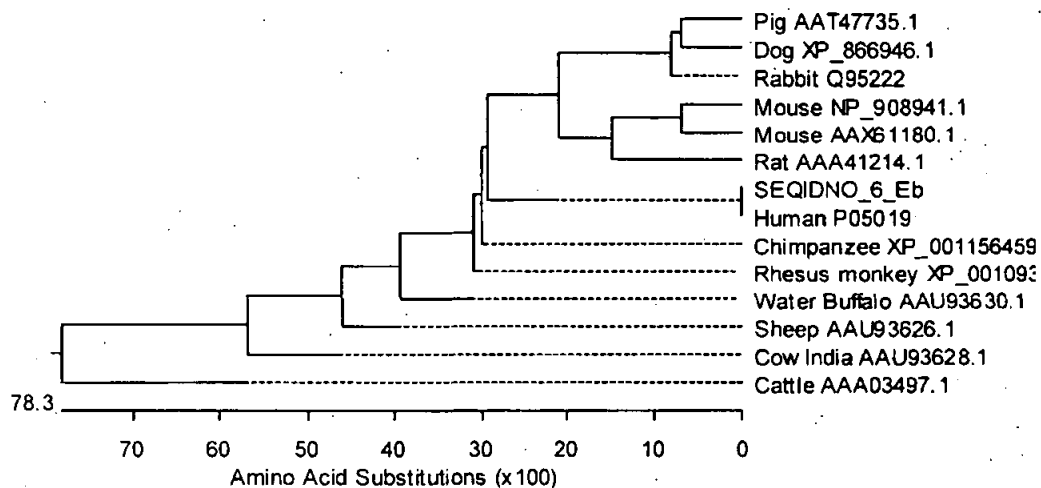
Fig. 9B

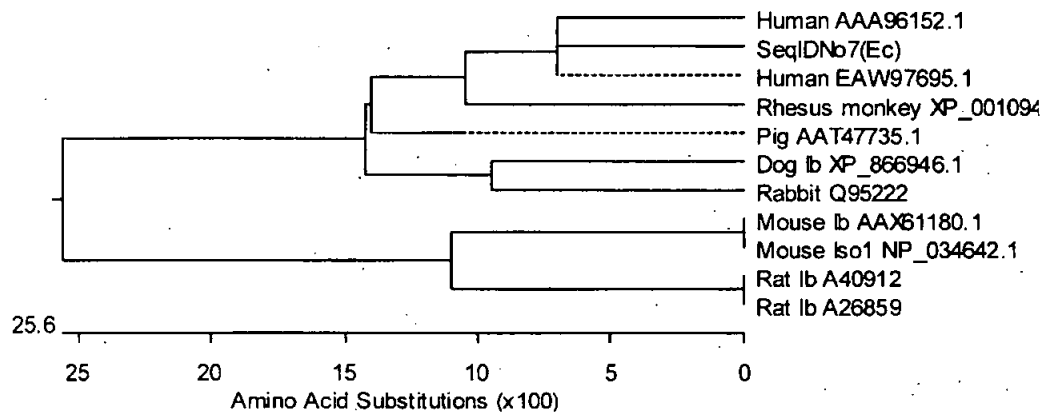
Fig. 10B

Fig. 11A

Majority

	AYRPSSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFS	----	RPAS-RVNRRS--	RGVIEECCFRSCDLALLETYCATPAK
	10	20	30	40 50 60
Human IGF-2	AYRPSSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRP	----	AS----	RVSRRS--RGVIEECCFRSCDLALLETYCATPAK
Human NP_000603.1	AYRPSSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRP	----	AS----	RVSRRS--RGVIEECCFRSCDLALLETYCATPAK
Pig NP_999048.1	AYRPSSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFS	----	RPAS-RVNRRS--	RGVIEECCFRSCDLALLETYCATPAK
Cattle NP_776512.2	AYRPSSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFS	----	RPSS-RINRRS--	RGVIEECCFRSCDLALLETYCATPAK
Sheep NP_001009311.1	AYRPSSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFS	----	RPSS-RINRRS--	RGVIEECCFRSCDLALLETYCAAPAK
Dog Iso1 XP_540785.2	AYRPSSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFS	----	RPAS-RVTRRS--	RGVIEECCFRSCDLALLETYCATPAK
Dog Iso2 XP_851137.1	AYRPSSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFS	----	SRPAS-RVTRRS--	RGVIEECCFRSCDLALLETYCATPAK
Dog Iso3 XP_863200.1	AYRPSSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFS	----	SRPAS-RVTRRS--	RGVIEECCFRSCDLALLETYCATPAK
RedJungleFowl XP_421026.2	AYGTAETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFS	----	RPVG-RNNRRN--	RGVIEECCFRSCDLALLETYCAKSVK
Rat NP_113699.1	AYRPSSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFS	----	RPSS-RANRRS--	RGVIEECCFRSCDLALLETYCATPAK
Mouse NP_034644.1	AYGPGETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFS	----	RPSS-RANRRS--	RGVIEECCFRSCDLALLETYCATPAK
Chimpanzee XP_001153640.1	AYRPSSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSKA	----	STPAAPPIITRPL--	RRVQCRCRCGGCPADLRDAASAPRRR
Zebrafish Iso1 XP_001338042.1	EVASAETLCGGELVDALQFVCEDRGFYFS	----	RPTSRNSRNSRNSQNRGIVIEECCFSSNCNLALLETQYCAKPAK	
Zebrafish Iso2a NP_001001815.1	EVASAETLCGGELVDALQFVCEDRGFYFS	----	RPTSRNSRNSRNSQNRGIVIEECCFSSNCNLALLETQYCAKPAK	
Zebrafish Iso2b NP_571508.1	NVTAGETLCGGELVDTLQFVCGEDGFYIS	----	RPN-RSNSRRPQ--	RGVIEECCFRSCELHLLQYCAKPVK

Majority

	PTVLDPDNFPRYPVGKFFQYDTW	-----	KQSAQRLRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR--HRPLI
	70	80	90 100 110 120 130
Human IGF-2	SERDVSTP-----	PTVLDPDNFPRYPVGKFFQYDTW	KQSTQRLRGLPALLRARRGHVLAKELEAFREAKR--HRPLI
Human NP_000603.1	SERDVSTP-----	PTVLDPDNFPRYPVGKFFQYDTW	KQSTQRLRGLPALLRARRGHVLAKELEAFREAKR--HRPLI
Pig NP_999048.1	SERDVSTP-----	PTVLDPDNFPRYPVGKFFQYDTW	KQSAQRLRGLPALLRARRGRMLAKELEAVREAKR--HRPLI
Cattle NP_776512.2	SERDVSTP-----	PTVLDPDDVTAYPVGKFFQYDIW	KQSTQRLRGLPALLRARRGRMLAKELEAREAKS--HRPLI
Sheep NP_001009311.1	SERDVSTP-----	PTVLDPDDVTAYPVGKFFQSDTW	KQSTQRLRGLPALLRARRGRMLAKELEAREAKS--HRPLI
Dog Iso1 XP_540785.2	SERDVSTP-----	PTVLDPDNFPRYPVGKFFQYDTW	KQSAQRLRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR--HRPLI
Dog Iso2 XP_851137.1	SERDVSTP-----	PTVLDPDNFPRYPVGKFFQYDTW	KQSAQRLRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR--HRPLI
Dog Iso3 XP_863200.1	SERDVSTP-----	PTVLDPDNFPRYPVGKFFQYDTW	KQSAQRLRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR--HRPLI
RedJungleFowl XP_421026.2	SERDLATSATLACL	PALNKESFQKPSHAKYSKYNVWQKSSQRLQREVPGILRARRYRWQAEGLQAAEEARAHHRPLI	
Rat NP_113699.1	SERDVSTP-----	QAVLPDDFPRYPVGKFFQYDTW	RQSAGRLRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR--HRPLI
Mouse NP_034644.1	SERDVSTP-----	QAVLPDDFPRYPVGKFFQYDTW	RQSAGRLRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR--HRPLI
Chimpanzee XP_001153640.1	SERHLLTS	PPFSDNLPFRYPVGKFFQYDTW	KQSTQRLRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR--HRPLI
Zebrafish Iso1 XP_001338042.1	SERDVSTSLQVI	PVPMPALQEVVPRKHVTVKYSKYDVWQKAAQRLRGI	PAILRAKKFRRQAEERIKAQEQLLH--HRPLI
Zebrafish Iso2a NP_001001815.1	SERDVSTSLQVI	PVPMPALQEVVPRKHVTVKYSKYDVWQKAAQRLRGI	PAILRAKKFRRQAEERIKAQEQLLH--HRPLI
Zebrafish Iso2b NP_571508.1	SERDVSTSLQVFPVSQALHKDT	----	INVKYSKYEVWQKAAQRLRAGVPSILLARKFRRQEKIQDEEQTSE--HRPLM

SEQ_ID_NO

Majority

	ALPTQDPA-HGGASPEASNSRK---	156
	140	150
Human IGF-2	ALPTQDPA-HGGAPPEMASNRKAYR	7
Human NP_000603.1	ALPTQDPA-HGGAPPEMASNSRK	157
Pig NP_999048.1	ARPTDPAHGGASPEASGSHRK	158
Cattle NP_776512.2	ALPTQDPAHGGASPEASSKD	159
Sheep NP_001009311.1	ALPTQDPATHGGASPEASSD	160
Dog Iso1 XP_540785.2	ALPTHPATHGGASPEASGNQK	161
Dog Iso2 XP_851137.1	ALPTHPATHGGASPEASGNQK	162
Dog Iso3 XP_863200.1	ALPTHPATHGGASPEASGNQK	163
RedJungleFowl XP_421026.2	SLPSORPP-APRASPEATGPOE	164
Rat NP_113699.1	VLPKQDPA-HGGASSEMSSNHQ	165
Mouse NP_034644.1	VLPKQDPA-HGGASSEMSSNHQ	166
Chimpanzee XP_001153640.1	ALPTQDPA-HGGAPPEMASNSRK	167
Zebrafish Iso1 XP_001338042.1	TLPSKLP--ILLPTENYVSHK	168
Zebrafish Iso2a NP_001001815.1	TLPSKLP--ILLPTENYVSHK	168
Zebrafish Iso2b NP_571508.1	TLPNRQPA--IVPHQVISTSRK	169

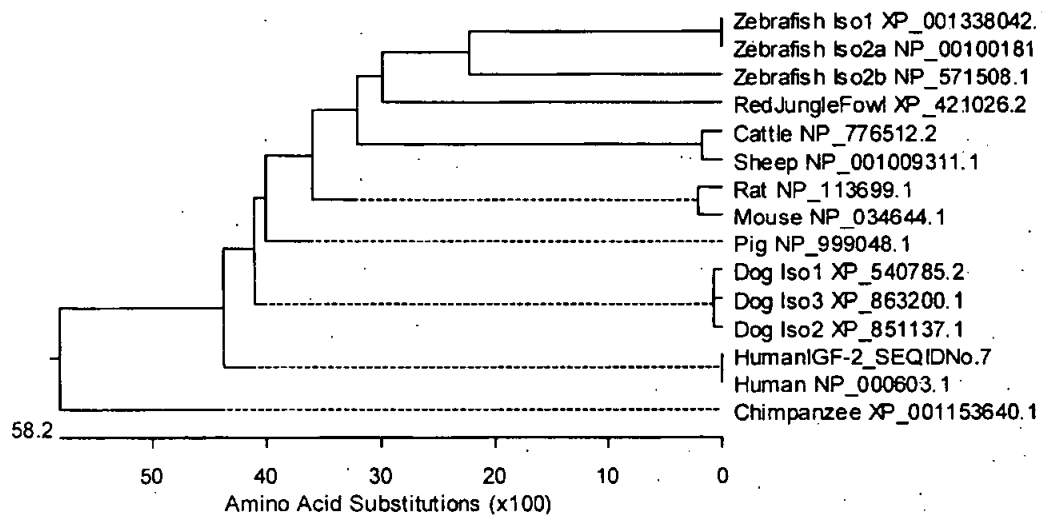
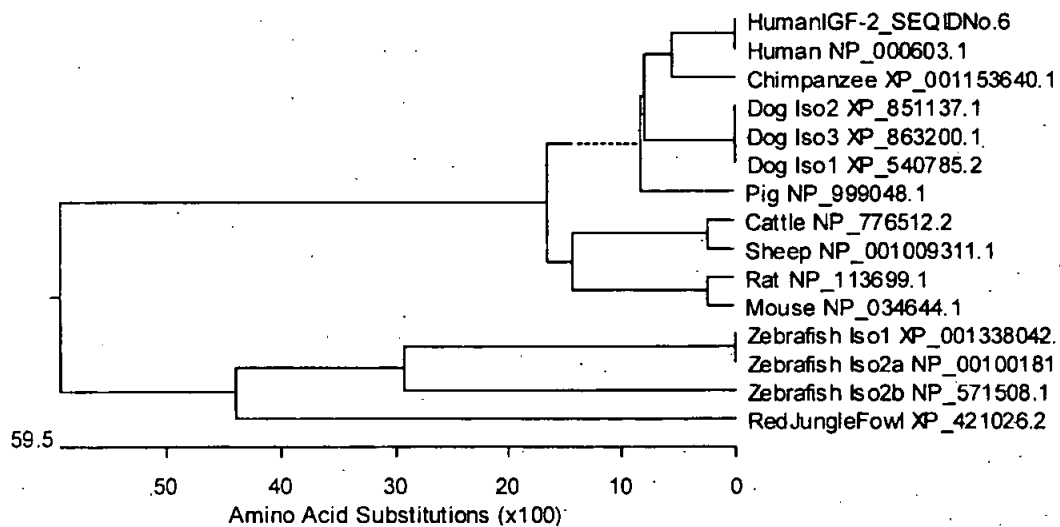
Fig. 11B

Fig. 12A

Majority	RDVSTP-----PTVLPDNFPFYPVGKFFQYDTW-KQSAQRLRRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR-HRPLIAL
	70 80 90 100 110 120 130
Human IGF-2	RDVSTP-----PTVLPDNFPFYPVGKFFQYDTW-KQSTQRLRRGLPALLRARRGHVLAKELEAFREAKR-HRPLIAL
Human NP_000603.1	RDVSTP-----PTVLPDNFPFYPVGKFFQYDTW-KQSTQRLRRGLPALLRARRGHVLAKELEAFREAKR-HRPLIAL
Pig NP_999048.1	RDVSTP-----PTVLPDNFPFYPVGKFFQYDTW-KQSAQRLRRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR-HRPLTAR
Cattle NP_776512.2	RDVSAS-----TTVLPDDVTAYPVGKFFQYDIW-KQSTQRLRRGLPAFLRARRGRMLAKELEALREAKS-HRPLIAL
Sheep NP_001009311.1	RDVSAS-----TTVLPDDVTAYPVGKFFQSDTW-KQSTQRLRRGLPAFLRARRGRMLAKELEALREAKS-HRPLIAL
Dog Iso1 XP_540785.2	RDVSTP-----PTVLPDNFPFYPVGKFFQYDTW-KQSAQRLRRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR-HRPLIAL
Dog Iso2 XP_851137.1	RDVSTP-----PTVLPDNFPFYPVGKFFQYDTW-KQSAQRLRRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR-HRPLIAL
Dog Iso3 XP_863200.1	RDVSTP-----PTVLPDNFPFYPVGKFFQYDTW-KQSAQRLRRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR-HRPLIAL
RedJungleFowl XP_421026.2	ROLSATSLAGL---PALNKESFQKPSHAKYSKYNVQKSSQRLQREVPGILRARRYRWQAEGLQAAEEARAMHRLISL
Rat NP_113699.1	RDVSTS-----QAVLPDDFPFYPVGKFFKFDTW-RQSAGRLRRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR-HRPLIVL
Mouse NP_034644.1	RDVSTS-----QAVLPDDFPFYPVGKFFQYDTW-RQSAGRLRRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR-HRPLIVL
Chimpanzee XP_001153640.1	RHLLTS-----PFPSQDNFPFYPVGKFFQYDTW-KQSTQRLRRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR-HRPLIAL
Zebrafish Iso1 XP_001338042.1	RDVSATSLQVIFVMPALKQEVPRKHVTVKYSKYDVMQRKAAQRLRRGI PAI LRAKKFRQQAERIKAQEQLLH-HRPLITL
Zebrafish Iso2a NP_001001815.1	RDVSATSLQVIFVMPALKQEVPRKHVTVKYSKYDVMQRKAAQRLRRGI PAI LRAKKFRQQAERIKAQEQLLH-HRPLITL
Zebrafish Iso2b NP_571508.1	RDVSSTSLQVFPVSQALHKDT----INVKYSKYEVWQKAAQRLRRGVPSILLARKKFRQMEKIQDEEQTFS-HRPLMTL

SEQ ID NO

Majority	PTQDPA-HGGASPEASSNRK 170
	140 150
Human IGF-2	PTQDPA-HGGAPPEMASNRK 6
Human NP_000603.1	PTQDPA-HGGAPPEMASNRK 6
Pig NP_999048.1	PTRDPAHGGASPEASGHRK 171
Cattle NP_776512.2	PTQDPATHGGASKASSD 172
Sheep NP_001009311.1	PTQDPATHGGASSEASSD 173
Dog Iso1 XP_540785.2	PTHDPATHGGASPEASGNQK 174
Dog Iso2 XP_851137.1	PTHDPATHGGASPEASGNQK 174
Dog Iso3 XP_863200.1	PTHDPATHGGASPEASGNQK 174
RedJungleFowl XP_421026.2	PSQRPP-APRASPEATGPQE 175
Rat NP_113699.1	PPKQPA-HGGASSEMSSNHQ 176
Mouse NP_034644.1	PPKQPA-HGGASSEMSSNHQ 177
Chimpanzee XP_001153640.1	PTQDPA-HGGAPPEMASNRK 178
Zebrafish Iso1 XP_001338042.1	PSKLPP--ILLPTENYVSHK 179
Zebrafish Iso2a NP_001001815.1	PSKLPP--ILLPTENYVSHK 179
Zebrafish Iso2b NP_571508.1	PNRQPA--IVPHVQISTSRK 180

Fig. 12B

POLIPÉPTIDOS DE FACTOR DE CRECIMIENTO DE TIPO INSULINA
ESTABILIZADA

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5

Los factores de crecimiento de tipo insulina (IGFs) son parte de un sistema complejo que las células utilizan para comunicarse con su ambiente fisiológico. Este sistema complejo (por lo general denominado como el eje de factor de crecimiento de tipo insulina) consiste de dos receptores de célula-superficie (IGF-IR e IGF-2R), y enzimas de degradación IGFBP asociadas (proteasas). Este sistema es importante no solo para la regulación de fisiología normal sino también para un número de estados patológicos (Glass, Nat Cell Biol 5:89-90, 2003).

15 Se ha mostrado que el eje IGF juega papeles importantes en la promoción de proliferación de célula y la inhibición de muerte de célula (apoptosis). El IGF-1 principalmente es secretado por el hígado como resultado de la estimulación por la hormona de crecimiento humana (hGH). Casi cada célula en el cuerpo humano es afectada por IGF-1, especialmente células en músculos, cartilagos, 20 huesos, hígado, riñón, nervios, piel y pulmones. Además de los efectos de tipo insulina, el IGF-1 también puede regular el crecimiento de célula. Los IGF-1 y IGF-2 son regulados por una familia de productos de gen conocidos como las proteínas de unión del IGF. Estas proteínas ayudan a modular la acción del IGF en 25

formas complejas que involucran tanto la acción de inhibición de IGF evitando la unión a los receptores de IGF como a la acción promotora de IGF a través de la ayuda al suministro a los receptores e incrementar la vida media del IGF en la corriente sanguínea.

5 Existen por lo menos seis proteínas de unión caracterizadas (IGFBP-6).

En su forma madura, el IGF-1 humano (gpetjcgaelvdaqlqfvcg drgyfynkptgygssrrapqtgivedccfrscdlrrremycaplkpaks; SEC ID NO: 1), también denominado somatomedina, es una proteína pequeña de 70
10 aminoácidos que mostrado estimular el crecimiento de una amplia escala de células en el cultivo. La proteína madura es inicialmente codificada por tres ARNs de variante de empalme conocidos. El marco de lectura abierto de cada ARNm codifica una proteína precursora conteniendo los 70 aminoácidos de IGF-1 y péptido E particular en el término C, dependiendo del ARNm de IGF-1
15 particular. Estos péptidos E han sido denominados los péptidos Ea (rsvraqrhtdmpktqkevhiknasrgsagnknyrm; SEC ID NO:2, Eb (rsvraqrhtdmpktqkyqqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrr eigsrnaecrgkkgk; SEC ID NO:3), y Ec (rsvraqrhtdmpktqkyqqppstnknt
20 ksqrrkgstfeerk; SEC ID NO: 4) y varían de 35 a 87 aminoácidos en longitud y abarcan una región de secuencia común en el término N y una región de secuencia variable en el término C. Por ejemplo, el marco de lectura abierto de tipo silvestre para el IGF-1-Ea codifica un polipéptido de 105 aminoácidos (gpetlcgaelvdaqlqfvcgdrgyf
25 fnkptgygssrrapqtgivedccfrscdlrrremycaplkpaks)

rsvraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm; SEC ID NO:5). En una
 expresión fisiológica, los péptidos E son cortados del precursor a
 través de proteasas endógenas para producir el IGF-1 de 70
 aminoácidos maduro conocido por ser bioactivo. En ciertos
 5 contextos, se sabe que de uno a tres de los aminoácidos N-
 terminales de IGF-1 se separan bajo condiciones fisiológicas,
 produciendo IGF-1 activo teniendo de entre 67-70 aminoácidos. La
 expresión y procesamiento del gen IGF-2 se caracteriza por atributos
 similares excepto que solo un péptido E (rdvstpptvlpdnfprypvgkffqyd
 10 twkqstqrlrrglpallrrarrghvlakeleafreakhrplialptqdpahggappemasnrk;
 SEC ID NO:6) para IGF-2 ha sido identificado para el precursor de
 156 aminoácidos (ayrpsetlcggelvdltlqfvcgdrfyfsrpsrsvrrsrgiv
 eecfscdlalletycatpakserdvstpptvlpdnfprypvgkffqydtwkqstqrlrrglpallra
 rrghvlakeleafreakhrplialptqdpahggappemasnrk; SEC ID NO:7).
 15 Parece que tanto IGF-1 como IGF-2 son pobres candidatos a
 fármacos, ya que estas proteínas son rápidamente degradadas por
 proteasas endógenas en el suero de pacientes. Una estrategia que
 ha sido contemplada es estabilizar IGF-1 como un fármaco formando
 un complejo con una de sus proteínas de unión.

20

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La invención se basa en el descubrimiento de que una proteína
 de precursor IGF-1 o IGF-2 que contiene substancialmente su
 25 péptido E es bioactiva y se estabiliza en presencia de suero, dando

como resultado un polipéptido de IGF-1 o IGF-2 que es útil como un
farmacéutico. En las composiciones de la invención, el corte o
escisión del péptido E a partir del IGF-1 es evitado, por ejemplo;
mutando o eliminando ya sea la arginina en la posición 1 o la serina
5 en la posición 2 de los péptidos E (que corresponde a las posiciones
71 y 71 en el IGF-1 precursor de tipo silvestre). En IGF-2, el corte o
escisión es evitado, por ejemplo, mutando o eliminando ya sea 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 IGF-2
10 precursor de tipo silvestre). Otras modificaciones de una proteína de
precursor IGF pueden evitarse o reducir este corte o escisión.

Además, otras modificaciones de la secuencia de aminoácido
de precursor IGF-1 pueden conferir beneficios farmacéuticos
adicionales. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención pueden
15 exhibir afinidad incrementada para el receptor IGF-1 o habilidad de
unión reducida a una proteína de unión IGF-1 o IGF-2 inhibidora.

Por claridad y consistencia, la numeración de residuos de
aminoácidos en el precursor IGF-1 o IGF-2 o proteínas maduras a
través de esta solicitud y en las reivindicaciones se basa en la
20 numeración de secuencia de proteína de precursor de tipo silvestre
sin el péptido de señal.

Por consiguiente, la invención incluye un polipéptido que
contiene una proteína de precursor IGF-1 humana, en donde la
escisión o corte del péptido E a partir de IGF-1 a través de una
25 proteasa se reduce mediante la modificación de la proteína de

precursor. El péptido E puede ser el péptido Ea, Eb o Ec. En el término N del precursor, los aminoácidos G1, P2 o E3 de la proteína de precursor pueden ser eliminados o mutados, como lo puede el R36 (por ejemplo, R36A (y R37 (por ejemplo R37A).

5 La proteína de precursor además puede incluir la secuencia de consenso de glicosilación N-enlazada NXS/T, por ejemplo, a través de la inserción de los aminoácidos 93-102 de Ea entre los aminoácidos N95 y T96 de Eb. En general, la proteína de precursor puede incluir un oligosacárido covalentemente unido a una cadena
10 lateral de aminoácido de la proteína de precursor, tal como una cadena lateral de arginina de la proteína de precursor.

Además, un residuo de la proteína de precursor puede ser reemplazado por un aminoácido no natural (por ejemplo, uno que incluye un grupo acetileno o azido). Dichos aminoácidos no naturales
15 pueden facilitar el enlazamiento de una porción de glicol polietilénico a una cadena lateral de la proteína de precursor, a través de estrategias de pegilación de proteína típicas, que son bien conocidas en la técnica.

La proteína de precursor además puede incluir uno o más
20 péptidos E adicionales enlazados al término C de la proteína de precursor. Por ejemplo, un polipéptido puede incluir, del término N al término C, (1) una proteína de precursor IGF-1 teniendo un primer péptido Eb, en donde G1, P1 y E1 son eliminados, ya sea R36 o R37 o ambos, son mutados, R71 y S72 son eliminados, y los últimos siete
25 aminoácidos C-terminales del primer péptido Eb son eliminados; (2)

un segundo péptido Eb, en donde R71, S72, y los últimos siete aminoácidos C-terminales del segundo péptido Eb son eliminados; (3) un tercer péptido Eb, en donde R71, S72, y los últimos siete aminoácidos C-terminales del tercer péptido Eb son eliminados; y (4)
5 un cuarto péptido Eb, en donde R71 y S72 son eliminados.

Un medio efectivo para prevenir la escisión o corte del Péptido E a partir del IGF-1 es la eliminación o mutación de R71 o S72.

Similarmente, la invención incluye una proteína de precursor IGF-2 humana, en donde la escisión del péptido E a partir del IGF-2a
10 través de una proteasa se reduce por la modificación de la proteína de precursor. En particular, la eliminación o mutación de R68 o D69 puede ser un medio efectivo para evitar la digestión de la proteasa de la proteína de precursor IGF-2.

Además, cualquier péptido E de IGF-1 puede ser combinado
15 con un IGF-2 y cualquier péptido E de IGF-2 puede ser combinado con IGF-1 para proporcionar los beneficios descritos aquí.

La invención además incluye un método para el tratamiento de una enfermedad músculo-esquelética, diabetes, muerte celular neuronal, administrando una cantidad terapéuticamente efectiva de
20 un polipéptido de la invención. Asimismo, la invención incluye el uso de un polipéptido de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad músculo-esquelética, diabetes, muerte celular neuronal, o anemia.

En otra modalidad, la invención incluye un IGF-1 pegilado sin
25 un péptido E pero que tienen introducido en él un aminoácido no

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

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

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

Todas las referencias o documentos citados se incorporan aquí por referencia.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A-1C son tinciones Western de polipéptidos de la invención y precursor IGF-1 de tipo silvestre después de cero ó 16 horas de incubación en presencia o ausencia de 10% de suero humano a 37°C. Se transfectaron vectores de expresión que codifican varias construcciones IGF-1 en células Cos, y se obtuvo el medio de cultivo acondicionado. El "3mut" se refiere a un precursor del péptido E teniendo los siguientes tres grupos de modificaciones:

eliminación de G1, P2 y E3; mutación de Arg 37 a Ala (R37A); y la eliminación de R71 y S72. La Figura 1A muestra los resultados de tinción Western (utilizando el anticuerpo para IGF-1) para el tipo silvestre y el precursor 3mut conteniendo Ea. La Figura 1B muestra los resultados de tinción Western (utilizando el anticuerpo para hIGF-1) para el tipo silvestre y el precursor 3mut conteniendo Eb. La Figura 1C muestra los resultados de tinción Western (utilizando el anticuerpo para hIGF-1) para el tipo silvestre y el precursor 3mut conteniendo Ec.

Las Figuras 2A-2D son gráficas lineales mostrando la actividad biológica de varios polipéptidos ("ligandos"). La actividad biológica se midió a través de la estimulación de mioblastos C2C12 con polipéptidos Cos7-expresados. Las células C2C12 estimuladas después fueron analizadas para cantidades relativas de AKT total y AKT fosforilado. El R3-IGF-1 largo es un reactivo comercialmente disponible (Sigma Product No. I-1271) que consiste de la secuencia de aminoácido de IGF-1 humano maduro, con una mutación E3R y un polipéptido de extensión N-terminal de 13 aminoácidos. 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 una construcción 3mut en donde los aminoácidos 92 a 102 de Ea fueron insertados entre los aminoácidos 95 y 96 de Eb. La Figura 2D muestra la actividad de IGF-1-Ec3mut.

Las Figuras 3A-3D y 4A-4D son gráficas lineales que muestran si los polipéptidos del precursor IGF-1 de la invención mantienen

selectividad al receptor apropiado analizando la fosforilación del receptor en respuesta a la unión de ligando. Las Figuras 3A y 3B prueban la selectividad de receptor de IGF-1-Ea3mut contra el receptor IGF-1 (Figura 3A) y el receptor de insulina (Figura 3B). Las Figuras 3C y 3D prueban la selectividad de receptor de IGF-1-Eb3mut contra el receptor IGF-1 (Figura 3C) y el receptor de insulina (Figura 3D). Las Figuras 4A y 4B prueban la selectividad de receptor de IGF-1-Ec3mut contra el receptor IGF-1 (Figura 4A) y el receptor de insulina (Figura 4B). Las Figuras 4C y 4D prueban la selectividad de receptor de IGF-1-Eab3mut contra el receptor IGF-1 (Figura 4C) y el receptor de insulina (Figura 4D). "IGF-R3" se refiere a R3-IGF-1 largo descrito anteriormente. El polipéptido listado como "IGF1Eab" se refiere a una construcción en donde los aminoácidos 93 a 102 de Ea fueron insertados entre los aminoácidos 95 y 96 de Eb.

La Figura 5 es una tinción Western que muestra la fosforilación de AKT relativa después de la estimulación de miotubos C2C12 (como resultado de 3 a 4 días de diferenciación de miocitos C2C12) a través de diferentes ligandos. El multímero IGF-1Eb se refiere a la construcción esquemáticamente mostrada en la Figura 6A.

Las Figuras 6A y 6B son representaciones esquemáticas de dos de los polipéptidos de la invención. La Figura 6A muestra un polipéptido de precursor IGF-1-Eb con cuatro grupos de modificaciones: eliminación de G1, P2 y E3; mutación de R37 a A; eliminación de R71 y S72; y eliminación de los últimos siete aminoácidos C-terminales. Además, el polipéptido es alargado a

través de la adición de dos más péptidos Eb (pero sin R71 y S72 y sin los últimos siete aminoácidos C-terminales) y la adición de un péptido Eb final (pero sin R71 y S72) en el término C del polipéptido. Esta construcción por lo regular es denominada como el multímero IGF-1-Eb. La Figura 6B muestra un polipéptido de precursor IGF-1-Eab con cuatro grupos de modificaciones: eliminación de G1, P2 y E3; mutación de R37 a A; eliminación de R71 a S72; e inserción de los aminoácidos 93 a 102 de Ea entre los aminoácidos 95 y 96 de Eb.

La Figura 7A es una alineación de secuencia de IGF-1 humano (SEC ID No:1) con el IGF-1 de animal correspondiente. Todas las especies de animal se analizaron y se les proporcionaron números de acceso de Genbank correspondientes para la secuencia. G1, P3, E3 se conservaron en todas las especies analizadas, excepto Sterlet (en donde S reemplaza a P2). R36 y R37 se conservaron en todas las especies analizadas.

La Figura 7B es una gráfica que muestra la filogenia de las secuencias de aminoácido analizadas comparada con IGF-1 humano (SEC ID NO:1). Abajo de árbol está una escala indicando el número de "Substituciones de Aminoácido" por 100 residuos para secuencias de proteína. La fórmula de distancia de Kimura se utiliza para calcular valores de distancia, derivados del número de incompatibilidades sin hueco y corregidos para substituciones mudas. Los valores calculados son el número medio de diferencias por sitio y caen entre cero y 1. El cero representa identidad completa

y el 1 representa sin identidad. La escala de árbol filogenético utiliza estos valores multiplicados por 100.

La Figura 8A es una alineación de secuencia del péptido Ea humano (SEC ID NO:2) con varios péptidos Ea de animal. Se proporcionan todas las especies de animal analizadas y sus números de acceso de GenBak correspondientes para la secuencia. R71 y S72 se conservan en todas las especies analizadas.

La Figura 8B es una gráfica que muestra la filogenia de las secuencias de aminoácido analizadas comparada con la del péptido IGF-1 Ea humano (SEC ID NO:2).

La Figura 9A es una alineación de secuencia para el péptido Eb humano (SEC ID NO:3) con varios péptidos Eb de animal. Se proporcionan todas las especies de animal analizadas y sus números de acceso de Genbank correspondientes para la secuencia. R71 y S72 se conservan en todas las especies analizadas.

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

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

La Figura 10B es una gráfica que muestra la filogenia e las secuencias de aminoácido analizadas comparadas con el péptido

IGF-1 Ec humano (SEC ID NO:4).

La Figura 11A es una alineación de secuencia del IGF-2 humano (SEC ID NO:7) con IGF-2 de animal correspondiente. Se proporcionan todas las especies de animales analizadas y sus
5 números de acceso de Genbank correspondientes para la secuencia. R68 se conserva en todas las especies analizadas; D9 se conserva, excepto para el chimpancé, en donde una histidina reside en esa posición.

La Figura 11B es una gráfica que muestra la filogenia de las
10 secuencias de aminoácido analizadas comparada con IGF-2 humano (SEC ID NO:7).

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

La Figura 12B es una gráfica que muestra la filogenia de las
20 secuencias de aminoácidos analizadas comparado con el péptido IGF-2 E humano (SEC ID NO:6).

DESCRIPCION DETALLADA DE INVENCION

La invención se refiere a nuevos polipéptidos de precursor IGF-1 e IGF-2 conteniendo substancialmente un péptido E que ha sido modificado para prevenir, reducir, o evitar la escisión de proteasa típica responsable de la liberación del IGF-1 o IGF-2 activo a partir de sus péptidos E. La utilidad de los polipéptidos de la invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que dichos polipéptidos de precursor son biológicamente activos, estables y benéficos como farmacéuticos.

Clasificación para Polipéptidos de Precursor IGF Activos

La utilidad de cualquier polipéptido de la invención puede ser analizada utilizando los siguientes ensayos.

15

Estabilidad. Un polipéptido de la invención debe tener suficiente estabilidad en presencia de proteasas endógenas, tales como en suero humano, para ser un fármaco efectivo. Para evaluar la estabilidad, un vector de expresión que codifica el polipéptido puede ser transfectado a células Cos7 (ATCC) en un medio DMEM conteniendo 10% de suero de bovino fetal, 100 U/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomycin. El medio de cultivo conteniendo polipéptidos secretados, puede ser aplicado a otro análisis, o en forma alternativa, el vector de expresión puede codificar fácilmente etiquetas disponibles, tales como una etiqueta de hexa-histidina, en

25

el polipéptido para facilitar la purificación eficiente de los polipéptidos expresados en los cultivos de Cos7. Sin embargo, la muestra de polipéptido preparada se incubó en suero humano normal (Sigma) o en PBS durante varios tiempos (por ejemplo, 0, 1, 5, 10 y 5 16 horas), se sometió a electroforesis de gel de poli(acrilamida), se tiñó en nitrocelulosa, y las proteínas pertinentes se visualizaron utilizando un anticuerpo primario contra IGF-1 o IGF-2 humano y un anticuerpo secundario, por ejemplo, conjugado a peroxidasa de rábano. Cualquier número técnicas de tinción y detección similares, 10 algunas utilizando colorantes fluorescentes o aún radionúclidos, puede ser utilizado. La intensidad de la banda de precursor contra la intensidad de la banda de IGF-1 o IGF-2 debe indicar el grado al cual el polipéptido de precursor es cortado bajo varias condiciones. Un polipéptido de la invención que se expone a suero humano 15 durante 16 horas a 37°C puede exhibir una relación de precursor no cortado a IGF madura cortado de aproximadamente 1:2 a 1:01, por ejemplo, aproximadamente de 1:1 a 1:0.5, en particular una relación de aproximadamente 1:1 o una relación de aproximadamente 1:0.5. Típicamente, el precursor debe exhibir una relación de por lo menos 20 1:1.

Fosforilación de AKT. Un polipéptido de la invención debe mantener la habilidad de señalar a través del receptor IGF-1. (Tanto IGF-1 como IGF-2 señalan a través del receptor IGF-1). Para determinar esta habilidad de señalización, se puede valorar si un 25 objetivo intracelular corriente abajo, AKT, es fosforilado en

respuesta a la unión de ligando en la superficie de la célula. Para el análisis de fosforilación AKT, los mioblastos C2C12 se privaron de medio libre de suero y después se estimularon con diferentes ligandos. Las células se lisaron y se limpiaron a través de centrifugación. La fosforilación AKT y los niveles totales de AKT se analizaron a través de ELISA utilizando el equipo ELISA de emparedado de fosfo AKT (Ser473) PathScan y el equipo ELISA de emparedado de AKT PathScan (Cell Signaling), respectivamente.

10 **Carácter Específico del Recepto IGF-1.** Un polipéptido de la invención de preferencia mantiene el carácter específico para el receptor IGF-1 y se debe unir al receptor de insulina relacionado con baja afinidad. Para valorar el carácter específico, se agregaron muestras de polipéptido a células NIH3T3 privadas de suero, sobre-
15 expresando el receptor IGF-1 o el receptor de insulina, y el nivel de fosforilación del receptor IGF-1 o fosforilación de receptor de insulina se determinó a través de lisis de las células y sometiendo los lisatos a ELISA utilizando el equipo ELISA del receptor fósforo-IGF-1 humano y receptor de insulina DuoSet IC (R&D Systems).

20

Prueba In Vitro 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 ya conduce a hipertrofia muscular, se pueden someter animales tratados
25 y no tratados, a ejercicio y determinar si los animales que reciben el

polipéptido desarrollan músculos más grandes que los animales no tratados.

Modelos de Ejercicio

5 Un modelo conocido en la técnica se basa en el uso de un voluntario que corre una rueda con cargas de usuario variables (ver, por ejemplo, Am J Physiol Heart Circ Physiol 289:H455-H465, 2005). La rueda de caja de voluntario elimina agravios físicos y fisiológicos que son comunes en modelos de ejercicio forzado, y, por lo tanto,
10 son más apropiados para evaluar fármacos candidatos y que se utilizan en individuos relativamente saludables para quienes es deseable la masa muscular.

Se puede utilizar cualquier raza de ratón adecuada. Por ejemplo, se pueden asignar aleatoriamente ratones C57B1/6J machos
15 a grupos experimental (por ejemplo, que reciben el polipéptido del precursor IGF) y de control. Los animales se alojaron individualmente en una jaula conteniendo una rueda de ejercicio; los animales de control sedentarios se alojaron en jaulas idénticas sin la rueda. Las ruedas de ejercicio se describen por Allen y otros, J Appl
20 Physiol 90:1900-1908, 2001. En resumen, el sistema consiste de una rueda con un diámetro de 11.5 cm con una superficie para correr de 5.0 cm (modelo 6208, Petsmart, Phoenix, AZ) equipado con un contador magnético digital (modelo BC 600, Sigma Sport, Olney, IL) que se activa a través de la rotación de la rueda. Además, cada
25 rueda está diseñada por ingeniería con un mecanismo de resistencia

que permite el ajuste de la carga. Esto se logra uniendo una línea, de acabado de acero inoxidable, a la parte superior de la jaula y envolviendo el cable alrededor de una polea inmóvil que está asegurada a la rueda de la jaula en el eje de rotación para no
5 contribuir a la carga de la rueda. El cable otra vez se asegura a la parte superior de la jaula con resorte y tornillo. Este diseño permite hacer ajustes finos a la carga de la rueda, la cual finalmente se distribuye a través de la rotación de la rueda. Los valores de ejercicio diarios para tiempo y distancia de carrera se registran para
10 cada animal ejercitado a través de la duración del período de ejercicio. A todos los animales se les dio agua y comida dura estándar para roedor, como se desee. La carrera voluntaria (exposición a la rueda de la jaula) puede empezar a una edad promedio de 12 semanas para todos los grupos. Cada grupo continúa
15 corriendo bajo resistencia variable, dependiendo del grupo experimental, durante 50 días hasta que los animales tienen una edad de aproximadamente 19 semanas. La carga sobre la rueda se determinó colgando pesos conocidos en la rueda hasta que la rueda se desplazó ligeramente. Todos los grupos de ejercicio comienzan
20 sin ninguna carga en la rueda de la jaula durante la primera semana. Sin embargo, la condición de "sin carga" es en realidad de 2 g, la cual se determina como la carga necesaria para mantener la inercia de la rueda y la carga friccional. Considerando un período de aclimatación de rueda durante 1 semana, las cargas de rueda pueden
25 ser cambiadas a intervalos de una semana, excepto para cargas más

alta, las cuales pueden ser cambiadas después de 2 semanas. El rango de cargas puede ser cualquiera de 2 g hasta 12 g. Los animales con ejercicio y los de control sedentarios se sacrificaron (eutanasia) a través de dislocación cervical bajo anestesia inhalada, inmediatamente después del término del periodo específico de ejercicio. Se midió la masa corporal, y músculos específicos se ejercitaron rápidamente, se lavaron y se congelaron para ensayos histológicos o bioquímicos para un futuro.

También están disponibles modelos de hipertrofia de ejercicio alternativos, para aquellos expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, el modelo de ejercicio de rueda de molino descrito por Lerman y otros, J Appl Physiol 92:2245-2255, 2002.

Modelo de Inyección de Clenbuterol

El clenbuterol es un agonista β_2 -adrenérgico con propiedades promotoras de crecimiento que ocasionan un incremento documentado en la masa muscular. El mecanismo preciso de la acción del clenbuterol permanece turbio, aunque se ha propuesto una reducción en la degradación de la proteína del músculo. Clínicamente, el clenbuterol se usa como un fármaco anti-asma, pero parece ser muy mal usado como un agente de construcción de cuerpo para incrementar la masa muscular tanto en seres humanos como en animales de muestra.

A cinco ratones se les dio diariamente una inyección de clenbuterol (3 mg/kg, subcutánea (s.c.)) durante 3, 7, ó 14 días para

inducir hipertrofia muscular. Los ratones inyectados con PBS sirvieron como control negativo. Los animales se verificaron diariamente (inspección visual) para cualesquiera reacciones adversas (es decir, pelaje desgredado, letárgico) al tratamiento. El
5 tratamiento con clenbuterol tiene el potencial de hacer ratones más atemorizados o agresivos, por lo que los ratones deben ser especialmente verificados en cuanto a peleas si están alojados en grupos. Los ratones se mueven y pueden comer y beber normalmente. Los ratones se inspeccionaron diariamente hasta que
10 fueron sacrificados (eutanasia) en el día 3, 7 ó 14, y el tejido se recogió para otro análisis.

Prueba In Vivo en Modelos de Atrofia Muscular. En varios modelos de atrofia músculo-esquelética, un polipéptido del precursor
15 IGF de la invención puede ser probado para la habilidad para mantener la masa muscular bajo condiciones que generalmente reducen la masa muscular. Con los modelos ilustrativos descritos más adelante, el experto en la técnica puede fácilmente diseñar e implementar experimentos controlados involucrando la administración
20 y el uso de polipéptidos del precursor IGF para determinar si dichos polipéptidos pueden incrementar la masa muscular.

Por ejemplo, los ratones C57B16/2 machos se compraron en The Jackson Laboratories. Los ratones se compraron de manera que
tuvieran una edad de aproximadamente 9 semanas al inicio de cada
25 experimento. Generalmente, los ratones se alojaron en jaulas

microaislantes con comida normal para roedor. Al inicio de cada experimento, los ratones se pesaron. Al final de cada experimento, los ratones generalmente se sacrificaron (eutanasia) a través de inhalación de CO₂ seguido por dislocación cervical, y los tejidos musculares se cosecharon para procesamiento adicional. Los ratones se pesaron para proporcionar el "peso corporal final". Los músculos esqueléticos que pueden ser cosechados son músculo tibial anterior, digitorum longus extensor, sóleo, y músculos gastrocnemio (músculo de pantorrilla). Otros tejidos cosechados ocasionalmente son: corazón, hígado, bazo, riñones, testículos y cerebro. Todos los músculos y tejidos son completamente disectados (cortados en pequeños pedazos) y pesados en una pesa capaz de medir a 0.0001 g. Después, los tejidos son congelados en nitrógeno líquido para extracción posterior de ARN y proteína, o congelados y embebidos en OCT sobre un disco de corcho. Los músculos congelados sobre un disco de corcho, para un crio-seccionamiento posterior, se sumergieron en isopentano frío a un lodo espeso a través de nitrógeno líquido. Todas las muestras se almacenaron a -80°C.

20 Tratamiento de Dexametasona

Un método farmacológico para inducir el lavado de músculo en ratones es una inyección intraperitoneal diaria con dexametasona a 20 mg/kg. La dexametasona es un miembro sintético de la clase de glucocorticoide de hormonas. Actúa como un anti-inflamatorio e inmunosupresor, con una potencia de aproximadamente 40 veces

aquella de la hidrocortisona. La dexametasona se utiliza para tratar muchas condiciones inflamatorias y autoinmunes, por ejemplo, artritis reumatoide. También se da a pacientes con cáncer que experimentan quimioterapia, para contrarrestar ciertos efectos laterales de su tratamiento anti-tumoral. La dexametasona ocasiona atrofia muscular tanto en ratones como en pacientes seres humanos.

Los ratones se inyectaron intraperitonealmente (ip) con dexametasona durante 3, 7 ó 14 días. En los sujetos de día terminal se sacrificaron (eutanasia) utilizando CO₂ y se cosecharon los músculos de las patas. Los animales se verificaron diariamente (inspección visual) para cualesquiera reacciones adversas (es decir, pelaje desgredado, letárgico) al tratamiento. Los ratones usualmente se mueven, y pueden comer y beber agua normalmente. Los ratones inyectados con PBS son el control negativo.

15

Inmovilización con Yeso

El desuso físico de varios grupos de músculos da como resultado atrofia de esos músculos. La sujeción de la articulación del tobillo ("talón inmovilizado" o enyesado) ha probado ser una forma altamente útil y reproducible para inducir inmovilización física de la musculatura de la extremidad trasera de rata y ratón.

Los ratones se anestesiaron con isofluorano para inmovilización. Las articulaciones del tobillo y rodilla se fijaron a 90 grados con un material de yeso de peso ligero (VET-LITE) alrededor de las articulaciones. El material se sumergió en agua caliente y

25

después se envolvió alrededor de la extremidad, dejando los dedos de la pata y articulación de la cadera, libres. Las articulaciones se mantienen a posiciones de 90° hasta que el material de yeso se seca. La extremidad contra-lateral sirve como control. Los ratones
5 después se dejaron recuperar de la anestesia y se alojaron en jaulas de micro-aislamiento normales. No se ha observado que la colocación de yeso ocasione tensión excesiva, y los animales se movieron libremente en la jaula para comer y tomar agua. Los ratones, sin embargo, se verificaron diariamente para cualquier
10 evento adverso que afectara el peso del cuerpo, actividad e irritaciones.

Una vez que se aplica el yeso a un ratón, el animal es verificado diariamente para asegurarse de que el yeso permanece en su lugar, ya puede presentarse el mascado. Los animales pueden
15 moverse, tomar agua y comer después de la recuperación de la anestesia, y no requieren de reposo especial, estar en la jaula u otra asistencia.

Desnerviación

20 En general, los ratones se anestesiaron con gas isofluorano para la desnerviación. Utilizando procedimientos quirúrgicos asépticos (tres lavados de betadina con un lavado final con etanol), el nervio ciático derecho se aisló en el muslo medio y un corte de 2 a 5 mm. La extremidad contra-lateral sirvió como control.

25 Más específicamente, la incisión en la piel se cerró con un

sujetador de sutura, y los animales se inyectaron con una dosis individual de buprenorfina que permitió su recuperación de la anestesia. Después de tres, siete o catorce días de la cirugía, los animales fueron sacrificados (eutanasia) a través de inhalación de CO₂ seguido por dislocación cervical, y se removieron los músculos (gastrocnemio complejo, tibial anterior, digitorum longus extensor, sóleo) para análisis histológicos y bioquímicos.

Dado que el nervio ciático se cortó transversalmente, la extremidad afectada queda inmóvil para inducir atrofia músculo esquelética de los músculos involucrados. El animal. De otra manera, puede moverse, beber agua, y comer después de la recuperación de la anestesia y no requiere de reposo especial, estar en jaula u otra asistencia. Sin embargo, los animales se verificaron inmediatamente después de la cirugía y durante la recuperación (1-2 horas). Además, los sitios de incisión y salud en general del animal se verificaron durante 3 días después de la cirugía. El sujetador de sutura se removió a los 7 a 10 días después de la cirugía.

Modelos Genéticos

También se pueden utilizar ratones transgénicos genéticamente manipulados como moldeos de atrofia muscular. Por ejemplo, los así llamados Mini Ratones (The Jackson Laboratory, existencia No. 003258) contienen una mutación de ataque en el gen IGF-1 que da como resultado un crecimiento pos-natal anormalmente reducido, así como bajo peso corporal y tamaño. Para información adicional, ver

Powell-Braxton y otros, Genes Dev 7:2609-2617, 1993. Además, los así llamados Mini Ratones (The Jackson Laboratory, existencia No. 003259) contiene una mutación diferente en el gen IGF-1 que da como resultado un hipomorfo exhibiendo bajo peso corporal en adultos y otros fenotipos cardiovasculares. Para información adicional, ver Lembo y otros, J Clin Invest 98:2648-2655, 1996.

Mutaciones o Modificaciones Críticas y Opcionales en los Precursores IGF

10 **Mutaciones Críticas.** La invención se basa en parte en la observación de que un polipéptido de precursor IGF que contiene substancialmente su péptido E, permanece bioactivo y estable en presencia de suero. Para asegurar que el péptido E no se corta a través de proteasas endógenas que tienen como objetivo el sitio de proteasa dibásica, en general cualquiera de los dos aminoácidos dibásicos N-terminal del péptido E en el precursor es eliminado, mutado, o de otra manera enmascarado. En el caso de hIGF-1, estos dos aminoácidos son R71 y S72, mientras en el caso de hIGF-2, estos dos primeros aminoácidos son R68 y D69.

20 Una variedad de modificaciones permite la prevención de escisión:

- (1) Eliminación de uno o ambos residuos dibásicos
- (2) Mutar uno o ambos residuos dibásicos a un aminoácido no básico, tal como alanina
- 25 (3) Insertar uno o más aminoácidos no básicos entre los residuos

dibásicos

(4) Colocar un sitio de glicosilación cerca de los residuos dibásicos suficientes para enmascarar el sitio de proteasa

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

Además, los residuos K68 y K65 parece que juegan un papel importante en la escisión de IGF-1/péptido E; por consiguiente, las mutaciones o eliminaciones de estos residuos pueden ser
10 incorporadas en cualquiera de los aminoácidos tácticos dirigidos a los aminoácidos dibásicos, como se describió anteriormente.

Mutaciones en el Término N de IGF Maduro. En ciertas modalidades de la invención, los polipéptidos de precursor IGF
15 tienen eliminaciones o mutaciones de los primeros pocos aminoácidos N-terminales. En el caso de IGF-1, cualquiera de los tres primeros aminoácidos N-terminales puede ser eliminado o mutado, mientras que en el caso de IGF-2, cualquiera de los primeros seis aminoácidos N-terminales puede ser eliminado o
20 mutado. Se ha observado que ciertos aminoácidos N-terminales son naturalmente cortados in vivo, y la introducción de estas mutaciones o eliminaciones reduce al mínimo las asociaciones in vivo de los polipéptidos de la invención con proteínas de unión IGF (IGFBPs). La interacción de IGF-1 e IGF-2 con el receptor de IGF-1 se regula a
25 través de IGFBPs. Los seis IGFBPs han mostrado inhibir la acción de

IGF (particularmente, IGFBP5), pero en algunos casos se ha observado un efecto estimulante. Por lo menos un 99% del IGF en la circulación está normalmente unido a IGFBPs. El IGFBP más abundante en la circulación después de período neonatal es IGFBP3, el cual puede unir tanto IGF-1 como IGF-2 con afinidades similares. El IGF-1 truncado de existencia natural (llevando eliminación de G1, P2 y E3) se une a IGFBP3 con varias veces más baja afinidad que el IGF-1 natural. Además, G3 es importante para la unión de IGFBP, y G6 juega un papel similar en el péptido IGF-2.

Por consiguiente, en el caso del precursor hIGF-1, cualquiera de G1, P2 o E3 puede ser eliminado o mutado ya sea solo o en combinación. Cuando se desea una mutación, se puede introducir una mutación a alanina. En otro ejemplo, en el caso del precursor hIGF-2, cualquiera de P4, S5 y E6 puede ser eliminado o mutado ya sea solo o en combinación. Cuando se desea una mutación, se pueden introducir una mutación a alanina.

Mutaciones en los Residuos 36 y 37. El IGF-1 puede ser cortado a través de proteasas de serina presentes en el suero humano. La mutación ya sea de R36 o R37 a A puede evitar la escisión de IGF-1 en este sitio de escisión pronosticado entre R36 y R37. En el caso de hIGF-2, R28 puede ser mutado o eliminado para prevenir esta escisión destructiva.

Uso de Glicosilación. La vida media in vivo de los polipéptidos de la

presente invención puede ser mejorada a través de la adición de sitios de glicosilación N-enlazados ya sea al IGF o a las porciones del péptido E del precursor cuando se expresa en células de mamífero u otras células eucarióticas capaces de glicosilación N-enlazada. Se ha mostrado in vitro que el IGF-1 Ea humano es glicosilado en N92 y N100, ya que estas porciones de Ea adecuan la secuencia de glicosilación N-enlazada de consenso de N-X-S/T, en donde X puede ser cualquier aminoácido y el tercer aminoácido del triplete es ya sea S o T. también se sabe que el contexto de aminoácido adyacente del consenso afectará que tan fuerte se glicosila 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 en aproximadamente la misma parte de Eb o Ec. Una implementación particular de esta estrategia se ilustra en los Ejemplos más adelante. En cualquier caso, cualquier sitio de glicosilación N-enlazado de consenso, incluyendo aminoácidos de contexto circundantes, conocido por aquellos expertos en la técnica, puede ser insertado en un polipéptido precursor de la invención. Además, la glicosilación O-enlazada de un polipéptido de la invención puede ser lograda eligiendo el huésped particular usado para la producción del polipéptido. Por ejemplo, el uso de ciertas cepas de levadura para la expresión de IGF-1 da como resultado la adición de oligosacáridos en una serina o treonina. Ver, por ejemplo, la patente de E.U.A. No. 5,272,966.

Adición de Glicol Polietilénico. La conjugación a glicol polietilénico (PEG; pegilación) ha probado ser benéfica para prolongar la vida media de fármacos de proteínas terapéuticos. Se espera que la pegilación de los polipéptidos del precursor IGF de la invención pueda dar como resultado ventajas farmacéuticas similares. En la técnica, se conocen muy bien métodos de pegilación de IGF-1. ver, por ejemplo, la publicación de Solicitud de Patente de E.U.A. 2006/0154865, que describe las propiedades benéficas de IGF-1 monopegilada con lisina. Dicha monopegilación con lisina puede ser adaptada para los polipéptidos del precursor IGF de la invención. Además, la pegilación puede lograrse en cualquier parte de un polipéptido de la invención a través de la introducción de un aminoácido no natural. Ciertos aminoácidos no naturales pueden ser introducidos a través de la tecnología descrita por Deiters y otros, J Am Chem Soc 125:11782-11783, 2003; Wang y Schultz, Science 301:964-967, 2003; Wang y otros, Science 292:498-500, 2001; Zhang y otros, Science 303:371-372, 2004 o en la patente de E.U.A. No. 7,083,970. En resumen, algunos de estos sistemas de expresión involucran mutagénesis dirigida al sitio para introducir un codón de no sentido, tal como TAG ámbar, en el marco de lectura abierto que codifica un polipéptido de la invención. Dichos vectores de expresión después son introducidos en un huésped que puede utilizar ARNt específico para el codón de no sentido introducido y cargado con el aminoácido no natural de elección. Los aminoácidos no naturales particulares que son benéficos para propósitos de conjugar porciones

a los polipéptidos de la invención, incluyen aquellos con cadenas laterales de acetileno y azido. Los polipéptidos del precursor IGF que contienen estos aminoácidos novedosos después pueden ser pegilados en estos sitios de elección en la proteína. Además, dichas
5 moléculas IGF pegiladas sin los péptidos E también son útiles como terapéuticos.

Mutaciones de Péptidos E. En ciertos contextos farmacológicos, es benéfico incrementar el tamaño de un fármaco de péptido o proteína
10 para asegurar que el fármaco permanece sobre el lado de la barrera hemato-encefálica o el otro. Ya que las moléculas de IGF maduras 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 e proporcionar multímeros
15 de péptidos E en el término C del polipéptido de precursor IGF, como se ilustra en ciertos de los Ejemplos descritos más adelante.

Eliminación C-Terminal de Péptidos E. Se sospecha que la cisteína libre en la posición 81 de Eb puede dar como resultado la
20 homodimerización u otros efectos que, cuando están presentes en los polipéptidos de la invención, puede conducir a fármacos de actividad inferior. De esta manera, la eliminación o mutación de C81 en Eb puede optimizar la actividad del fármaco. En un ejemplo particular, la eliminación de por los menos siete aminoácidos de Eb
25 (es decir, los aminoácidos 81-87) es benéfica.

Otras Mutaciones o Modificaciones. Las mutaciones o modificaciones adicionales de IGF que se pueden incorporar en los polipéptidos del precursor IGF de la invención se describen en la patente de E.U.A. No. 5,077,276; y las Publicaciones de Solicitud de
5 Patente de E.U.A. Nos. 2005/0287151, 2006/0211606, y 2006/0166328.

La invención debe ser construida, además de IGF-1 e IGF-2 humanos, para incluir todas las secuencias de IGF-1 o IGF-2 precursor de animal que no es un ser humano conocidas y
10 desconocidas, que contienen substancialmente su péptido E, en donde la escisión normal del péptido E es evitada o reducida de acuerdo con las modificaciones de la presente invención.

El tipo preferido de IGF que se utilizará depende de la especie del sujeto que va a ser tratado.

15 Se prefiere que el IGF sea de una especie coincidente, por ejemplo, cuando se va a tratar una vaca, el tipo preferido de IGF es IGF de bovino.

Aunque todas las formas de IGF probablemente tienen un efecto en diferentes sujetos debido a las altas homologías de
20 secuencia, las especies coincidentes evitarán complicaciones inmunológicas adversas potenciales que descienden de la inducción de una respuesta inmune a un IGF de una especie diferente.

En una modalidad de la invención, se proporcionan secuencias de IGF-1 precursor de animal, que no es un ser humano,
25 modificadas.

Se prefieren las secuencia del precursor IGF-1 que contienen su péptido E, en donde la escisión normal del péptido E es evitada o reducida de acuerdo con las modificaciones de la presente invención de un animal vertebrado.

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

En otra modalidad de la invención, se proporcionan secuencias de precursor IGF-2 de animal, que no es un ser humano, modificadas.

Se prefieren secuencias de precursor IGF-2, que contienen substancialmente su péptido E, en donde la escisión normal del péptido E es evitada o reducida de acuerdo con modificaciones de la presente invención de un animal vertebrado.

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

20

Uso Terapéutico de Polipéptidos del Precursor IGF

Indicaciones. La invención también incluye el uso de un polipéptido del precursor IGF de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad

25 músculo-esquelético. Además, la invención incluye el uso de

polipéptidos del precursor IGF para incrementar la masa muscular u ósea en un individuo, si dicho individuo está o no en riesgo de o tener una enfermedad músculo-esquelética.

En particular, la enfermedad músculo-esquelética puede ser
5 atrofia muscular. Existen muchas causas de la atrofia muscular, incluyendo como resultado de un tratamiento con glucocorticoides, tales como cortisol, dexametasona, betametasona, prednisona, metilprednisolona, o prednisolona. La atrofia muscular también puede ser el resultado de desnerviación debido a trauma nervioso o como
10 resultado de neuropatía degenerativa, metabólica o inflamatoria (por ejemplo, síndrome de Guillian-Barré, neuropatía periférica, o exposición a toxinas o fármacos ambientales). Además, la atrofia muscular puede ser el resultado de una enfermedad de neuronas motoras en adultos, atrofia muscular espinal infantil, atrofia muscular
15 espinal juvenil, neuropatía de motor autoinmune con bloqueo conductor multifocal, parálisis debido a ataque o daño de médula espinal, inmovilización del esqueleto debido a trauma, reposo prolongado en cama, inactividad voluntaria, inactividad involuntaria, tensión metabólica o insuficiencia nutricional, cáncer, SIDA, ayuno,
20 rabdomiolisis, un trastorno de la glándula tiroides, diabetes, hipotonía congénita benigna, enfermedad del núcleo central, miopatía de nemaleno, miopatía miotubular (centronuclear), daño por quemaduras, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad del hígado, sepsis, falla renal, falla cardíaca congestiva, o
25 envejecimiento.

La enfermedad músculo-esquelética también puede ser un síndrome de distrofia muscular, tal como Duchenne, Becker, miotónica, facioescalpopulmonar, Emery-Deifuss, oculofanríngea, escalpulohumeral, arco de extremidad, una distrofia muscular
5 congénita, o miopatía distal hereditaria. La enfermedad músculo-esquelética también puede ser osteoporosis, una fractura de hueso, talla corta, o enanismo.

El IGF-1 se sugiere como un tratamiento para diabetes insensible a insulina, ya que IGF-1 también puede unir heterodímeros
10 del receptor de IGF-1 y receptor de insulina. Por consiguiente, los polipéptidos de la invención pueden ser usados para tratar diabetes.

El IGF-1 es neurotrófico e incrementa la supervivencia de neuronas. Se ha sugerido que IGF-1 sea utilizado para tratar casos de muerte de motor-neurona tal como se ve en esclerosis lateral
15 amiotrófica (ALS), atrofia cerebral, envejecimiento y demencia. Por consiguiente, los polipéptidos de la invención pueden ser utilizados para tratar condiciones asociadas con muerte neuronal, tal como ALS, atrofia cerebral, o demencia.

El IGF-1 incrementa las poblaciones tanto de glóbulos blancos
20 como de rojos y tiene un efecto aditivo a la administración de eritropoyetina. Por consiguiente, los polipéptidos de la invención pueden ser utilizados para tratar demencia.

Ya que IGF-1 e IGF-2 son reguladores ubicuos y esenciales de la división celular y crecimiento de vertebrados, ventajosamente
25 pueden ser utilizados en una variedad de métodos veterinarios para

mejorar exógenamente o mantener el crecimiento en un animal. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a:

(i) mejorar la velocidad y/o grado de crecimiento en un animal, por ejemplo, mejorando el crecimiento de músculo en cerdos, ganado, aves de corral y peces;

(ii) mejorar la eficiencia de su conversión de alimento en el tejido del cuerpo (relación de magro a grasa), por ejemplo, en cerdos, ganado, ovejas, aves de corral y peces; y

(iii) mejorar la producción de leche en animales lactantes, por ejemplo, vacas lecheras, ovejas, cabras.

Otras aplicaciones terapéuticas veterinarias incluyen, pero no se limitan a:

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

(v) tratar animales lactantes para mejorar la salud neonatal; por ejemplo, cerdas lactantes, para mejorar el rendimiento neonatal.

Métodos de Administración. Los polipéptidos de la invención pueden ser suministrados en una variedad de formas, incluyendo el uso de vehículos de suministro de gen. 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 e gen, administración directa con un

vehículo de suministro, o vehículo farmacéuticamente aceptable, suministro indirecto proporcionando células recombinantes que contienen un ácido nucleico que codifica el polipéptido.

Se varios sistemas de suministro y se pueden utilizar para
5 administrar el polipéptido de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar la proteína, endocitosis mediada por receptor (ver, por ejemplo, Wu y Wu, J Biol Chem 262:4429-4432, 1987), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral,
10 viral adeno-asociado, adenoviral, viruela viral (por ejemplo, viruela de aves viral, particularmente viruela de aves de corral viral) u otro vector, etc. Los métodos para la introducción pueden ser enterales o parenterales e incluyen, pero no se limitan a, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, intranasal,
15 intraocular, epidural, y rutas orales. Los polipéptidos pueden ser administrados a través de cualquier ruta conveniente, por ejemplo, a través de infusión o inyección de bolo, a través de absorción mediante forros epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto
20 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 a través de cualquier ruta adecuada, incluyendo inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede ser
25 facilitada a través de un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a

un depósito, tal como un depósito de Ommaya. También se puede emplear la administración pulmonar, por ejemplo, a través del uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de aerosolización.

5 En una modalidad específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente al área que necesita el tratamiento; esto puede lograrse, por ejemplo, y no en forma de limitación, a través de infusión local durante cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, a través de inyección, a través de un
10 catéter, o a través de un implante, el implante siendo un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas tales como membranas sialásticas, fibras, o substitutos comerciales de piel.

 En otra modalidad, el agente activo puede ser suministrado en una vesícula, en particular un liposoma (ver, Langer, Science
15 249:1527-1533, 1990). En otra modalidad más, el agente activo puede ser suministrado en un sistema de liberación controlada. En una modalidad, se puede utilizar una bomba. En otra modalidad, se pueden utilizar materiales poliméricos (ver, Howard et al., J
Neurosurg 71:105, 1989). En otra modalidad, en donde el agente
20 activo de la invención es un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención, el ácido nucleico puede ser administrado in vivo para promover la expresión de su proteína codificada, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido
nucleico apropiado y administrándolo de manera que se vuelve
25 intracelular, por ejemplo, a través del uso de un vector retroviral

(ver, por ejemplo, patente de E.U.A. No. 4,980,286), o a través de inyección directa, o a través del uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de gen; Biolistic, DuPont), o cubriendo con lípidos o receptores de superficie de célula o agentes de transfección, o administrándolo en unión a un péptido de tipo homeocaja (homeobox) que es conocido por entrar al núcleo (ver, por ejemplo, Joliot y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868, 1991), etc. Alternativamente, un ácido nucleico puede ser introducido intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para expresión, a través de recombinación homóloga.

Transfección Celular y Terapia de Gen. La presente invención abarca el uso de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la invención para la transfección de células in vitro e in vivo. Estos ácidos nucleicos pueden ser insertados en cualquier número de vectores bien conocidos para la transfección de células y organismos objetivo. Los ácidos nucleicos son transfectados en células ex vivo e in vivo, a través de la interacción del vector y la célula objetivo. Las composiciones se administran (por ejemplo, a través de inyección a un músculo) a un sujeto en una cantidad suficiente para producir 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 ser 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 de gen en el tratamiento o
prevención de enfermedad de seres humanos, ver por ejemplo, Van
5 Brunt Biotechnology 6:1149-1154, 1998.

Terapias de Combinación. En numerosas modalidades, los
polipéptidos de la presente invención pueden ser administrados en
combinación con uno o más compuestos o terapias adicionales. Por
10 ejemplo, se pueden co-administrar múltiples polipéptidos junto con
uno o más compuestos terapéuticos. La terapia de combinación
puede abarcar administración simultánea o alterna. Además, la
combinación puede abarcar administración aguda o crónica. Los
polipéptidos de la invención pueden ser administrados en
15 combinación con agentes anabólicos tales como testosterona o
moduladores de receptor de andrógeno específicos (SARMs). Otros
agentes anabólicos adicionales incluyen hormona de crecimiento
(GH) o moléculas que inducen la liberación de GH. La Ghrelin
(hormona producida por células del estómago) es particularmente útil
20 en una terapia de combinación para caquexia, ya que la Ghrelin
puede ocasionar un incremento en el apetito. En una vena similar,
los polipéptidos de la invención pueden ser combinados con
suplementos proteínicos para incrementar el anabolismo, o
combinarse con terapia física o ejercicio para incrementar el peso
25 del cuerpo. Cualquier molécula que inhiba miostatina también es un

candidato para terapia de combinación.

Composiciones Farmacéuticas. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una
5 proteína de precursor IGF de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o Estatal o listado en U.S. Pharmacopeia u otra
10 farmacopea generalmente reconocida para usarse en animales o seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, auxiliar, excipiente, o portador, con el cual se administra el terapéutico. Dichos vehículos o portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de
15 cacahuate, aceite de soya, aceite mineral, aceite de ajonjolí y similares. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, greda, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerol, propileno,
20 glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsificantes, o agentes reguladores de pH. Estas composiciones pueden tener la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación
25 sostenida, y similares. La composición puede ser formulada como un

supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos estándares tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón; estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin.

En algunas modalidades, la composición se formula de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Cuando es necesario, la composición también puede incluir un agente solubilización y un anestésico local tal como lidocaina para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Cuando la composición va a ser administrada a través de infusión, ésta puede ser surtida con una botella de infusión conteniendo agua o salina de grado farmacéutico estéril. Cuando la composición se administra a través de inyección se puede proporcionar una ampolla de agua o salina estéril para inyección, de manera que los ingredientes pueden ser mezclados antes de la administración.

Los polipéptidos de la invención pueden ser formulados como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con grupos amino libres tales como aquellos derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellos formados con grupos carboxilo libres tales como aquellos derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio,

calcio, férrico, 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 puede ser
5 determinada a través de técnicas clínicas estándares basándose en la presente descripción. Además, opcionalmente se pueden emplear ensayos in vitro para ayudar a identificar escalas óptimas de dosis. La dosis precisa que será empleada en la formulación también dependerá de la ruta de administración, y la seriedad de la
10 condición, y debe ser decidida de acuerdo con el juicio del practicante y circunstancias de cada sujeto. Sin embargo, las escalas adecuadas de dosis para administración intravenosa son en general de aproximadamente 20-5000 microgramos del compuesto activo por kilogramo del peso del cuerpo. Las escalas adecuadas de
15 dosis para administración intranasal son en general de aproximadamente 0.01 pg/kg del peso del cuerpo a 1 mg/kg del peso del cuerpo. Las dosis efectivas pueden ser extrapoladas a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba de modelo de animal o in vitro. En particular, un posible régimen de
20 dosis puede ser de aproximadamente 60 a 120 µg/kg del peso del cuerpo, de inyección subcutánea, dos veces al día.

Usos Veterinarios

Además de los métodos antes mencionados de administración
25 en seres humanos, existen consideraciones adicionales para la

administración veterinaria.

La dosis puede diferir cuando se administra a un animal saludable contra aquellos animales que padecen una enfermedad. Una evaluación de la dosis apropiada se puede hacer fácilmente por
5 aquellos expertos en la técnica utilizando ensayos conocidos e el campo, por ejemplo, el ensayo de proliferación de mioblasto (Ejemplo 79) o el ensayo de tejido epitelial mamario (Ejemplo 80) como se describe más adelante. En la técnica, también son conocidos ensayos generales para medir el IGF, tales como aquellos del
10 Ejemplo 81.

Aquellos expertos en la técnica reconocerán que algunas especies de animal exhiben fertilidad de temporada influenciada por la duración del fotoperíodo. Cualquier modalidad de un método o uso veterinario opcionalmente puede incluir empezar el método de
15 tratamiento en un tiempo específico dentro del ciclo reproductivo del animal con el fin de obtener el efecto deseado. Aquellos expertos en la técnica conocerán que el estado y ciclo reproductivos pueden ser fácilmente determinados, y, si se desea, sincronizarse a través del uso de un régimen apropiado.

20 Cuando se usan para indicaciones veterinarias, además de los métodos previamente mencionados para uso humano, el péptido IGF-1 o IGF-2 de la presente invención también puede ser utilizado como una dosis purgativa oral, o suplemento para alimentos orales o sólidos para animales.

25 La invención además se describe, pero no se limita a través de

los siguientes Ejemplos.

EJEMPLOS

5

EJEMPLO 1

Se construyó un vector de expresión de ADN que codifica el polipéptido de precursor hIGF-1-Ea conteniendo las siguientes modificaciones: eliminación de G1, eliminación de P2 y eliminación de E3; mutación de R37 a A; y eliminación de R71 y eliminación de S72. Estas mutaciones son algunas veces denominadas como "3mut" a través de la presente descripción. Esto da como resultado la siguiente secuencia de proteína secretada:

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfynkptgygssrsraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaks
15 vraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknym (SEC ID NO:8)

Se mantuvieron células Cos7 (disponibles de ATCC) en medio DMEM conteniendo 10% de suero de bovino fetal, 100 U/ml penicilina, y 100 µg/ml estreptomicina y se colocaron en placas a una densidad de 1×10^6 células por placa de 10 cm. Estos cultivos de células fueron transfectados con 8 µg de plásmido de expresión utilizando Fungene (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 24 horas de la transfección, las células se lavaron una vez y se cultivaron en un medio libre de suero durante
25 48 horas. Los sobrenadantes se recogieron y se almacenaron a -

80°C.

Con el fin de evaluar la estabilidad del polipéptido en el suero humano, los sobrenadantes recogidos de las células Cos7 transfectados con hIGF-1Ea de tipo silvestre (wt), y hIGF-1Ea3mut, se incubaron durante 16 horas a 37°C ya sea en ausencia o presencia de 10% de suero humano (Sigma). Las muestras se separaron a través de 18% de SDS-PAGE, y se realizó la inmunotinción utilizando anticuerpo policlonal de cabra para IGF-1 humano. Los resultados en la Figura 1A indican que, aunque hIGF-1Ea de tipo silvestre fue substancialmente degradado después de la incubación con suero durante 16 horas, el hIGF-1Ea3mut se estabilizó. La densitometría indicó que la relación de IGF-1 no cortado a cortado fue de aproximadamente 1:6.2, mientras que la relación para hIGF-1Ea3mut fue de aproximadamente 1:0.68, mostrando que estas mutaciones dan como resultado un polipéptido estabilizado.

Para confirmar que hIGF-1Ea3mut fue capaz de dar señal a través del IGF-IR, se midió la fosforilación de AKT de células en contacto con el polipéptido. C2C12 se compró en ATCC y se mantuvo en un medio de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM) con alta concentración de azúcar (Invitrogen) conteniendo 10% de suero de bovino fetal (AMIMED), 100 U/ml penicilina (Invitrogen), 100 µg/ml estreptomycin (Invitrogen) y 2 mM glutamina (Invitrogen). Para análisis fosforilación de AKT, las células C2C12 se colocaron en placas a una densidad de 0.15×10^6 células por cavidad de una

placa de 6 cavidades y se cultivaron en un medio de crecimiento durante 72 horas. Las células se privaron de alimento durante cuatro horas en un medio libre de suero y después se estimularon con diferentes ligandos a 37°C durante 30 minutos. Las células se lisaron con regulador de pH PhosphoSafe (Cell Signaling) conteniendo
5 varios inhibidores de proteasa y se lavaron a través de centrifugación a 14,000 x g durante 15 minutos a 14°C. La fosforilación de AKT y los niveles totales de AKT se analizaron a través de ELISA utilizando el equipo de ELISA de emparedado
10 PathScan phospho AKT (Ser473) y el equipo de ELISA de emparedado PathScan AKT (Cell Singnalling), respectivamente. Los resultados de la fosforilación de AKT se resumen en la Figura 2A, los cuales indican que hIGF-1Ea3mut fue capaz de activar la trayectoria celular de IGF-1R a un grado similar al reactivo de control positivo
15 largo-R3-IGF-1 y el IGF-1 recombinante. Además, los datos en la Figura 5 directamente muestran que hIGF-1Ea3mut conduce a la fosforilación de AKT.

Después, para asegurar que el carácter específico de receptor del hIGF-1Ea3mut permaneció con el IGF-1R, se agregaron varios
20 ligandos a los cultivos de NIH3T3 sobre-expresando ya sea IGR-1R o receptor de insulina (InsR). Estas células se cultivaron bajo las mismas condiciones como las descritas anteriormente para las células Cos7. Para el análisis de la fosforilación IGF-1R e InsR, se colocaron en placas células NIH3T3-IGF1R y NIH3T3-InsR a una
25 densidad de 0.2×10^6 células por cavidad de una placa de 6

cavidades y se cultivaron en un medio de crecimiento durante 24 horas. Las células se privaron de alimento durante 48 horas en un medio libre de suero y después se estimularon con diferentes ligandos a 37°C durante 10 minutos. Las células se lisaron como se describió anteriormente para el experimento de AKT, y se analizaron los niveles de fosforilación de IGF-1R e InsR a través de ELISA utilizando el equipo DuoSet IC human phosphor-IGF1R y -InsR ELISA (R&D Systems). Los resultados resumidos en las Figuras 3A y 3B indican que este polipéptido del precursor IGF-1 retiene el carácter específico para el receptor IGF-1 y se debe unir al receptor de insulina relacionado con baja afinidad.

EJEMPLO 2

Se construyó un vector de expresión de ADN que codifica el polipéptido del precursor hIGF-1-Eb conteniendo las siguientes mutaciones: eliminación de G1, eliminación de P2, y eliminación de E3; mutación de R37 a A; y eliminación de R71 y eliminación de S72 (es decir, el "3mut"). Esto da como resultado la siguiente secuencia de proteína secretada:

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygsssarapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigrnaecrgkkgk (SEC ID NO:9)

El polipéptido se analizó de acuerdo con los procedimientos

descritos en el Ejemplo 1 anterior. La Figura 1B y el uso de densitometría indicaron que la relación de IGF-1 no cortado y cortado fue de aproximadamente 1:9, mientras que la relación para hIGF-1Eb3mut fue de aproximadamente 1:1, mostrando que estas modificaciones dan como resultado un polipéptido estabilizado. La Figura 2B indica que el hIGF-1Eb3mut fue capaz de activar la trayectoria celular de IGF-1R a un grado similar como el reactivo de control positivo R3-IGF-1-largo y el IGF-1 recombinante. Además, los datos en la Figura 5 directamente muestran que hIGF-1Eb3mut conduce a la fosforilación de AKT. Los resultados resumidos en las Figuras 3C y 3D indican que este polipéptido del precursor IGF-1 retiene el carácter específico para el receptor de IGF-1 y se debe unir al receptor de insulina relacionado con baja afinidad.

15

EJEMPLO 3

Se construyó un vector de expresión de ADN que codifica el polipéptido del precursor hIGF-1-Ec conteniendo las siguientes mutaciones: eliminación de G1, eliminación de P2 y eliminación de E3; mutación de R37 a A; y eliminación de R71 y eliminación de S72 (es decir, el "3mut"). Esto da como resultado la siguiente secuencia de proteína secretada:

20

tlcgaelvdalqfvcgdrgrfyfnkptgygssrapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaksav
raqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgstfeerk (SEC ID NO:10)

25

El polipéptido se analizó de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 anterior. La Figura 1C y el uso de densitometría indicaron que la relación de IGF-1 no cortado y cortado fue de aproximadamente 1:5, mientras que la relación para hIGF-1Ec3mut fue de aproximadamente 1:0.96, mostrando que estas modificaciones dan como resultado un polipéptido estabilizado. La Figura 2D indica que el hIGF-1Ec3mut fue capaz de activar la trayectoria celular de IGF-1R a un grado similar como el reactivo de control positivo R3-IGF-1-largo y el IGF-1 recombinante. Además, los datos en la Figura 5 directamente muestran que hIGF-1Ec3mut conduce a la fosforilación de AKT. Los resultados resumidos en las Figuras 4A y 4B indican que este polipéptido del precursor IGF-1 retiene el carácter específico para el receptor de IGF-1 y se debe unir al receptor de insulina relacionado con baja afinidad.

EJEMPLO 4

Se construyó un vector de expresión de ADN que codifica el polipéptido del precursor quimérico hIGF-1-Eab conteniendo las siguientes modificaciones: eliminación de G1, eliminación de P2, y eliminación de E3; mutación de R37 a A; eliminación de R71 y eliminación de S72 (es decir, el "3mut"); e inserción de aminoácidos Ea 93 a 102 entre los aminoácidos 95 a 96 de Eb. La inserción crea una señal de glicosilación N-enlazada putativa en N92. Esto da como resultado la siguiente secuencia de proteína secretada:

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfknkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaks
vraqrhtdmpktqkyqppstnknsargsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirg
kkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:11)

5 El polipéptido se analizó de acuerdo con algunos de los
procedimientos descritos en el Ejemplo 1 anterior. La Figura 2C
indica que el hIGF-1-Eab3mut fue capaz de activar la trayectoria de
IGF-1R celular a un grado similar como el reactivo de control positivo
R3-IGF-1-largo y el IGF-1 recombinante. Los resultados resumidos
10 en las Figuras 4C y 4D indican que este polipéptido del precursor
IGF-1 retiene el carácter específico para el receptor IGF-1 y no
activa el receptor de insulina.

EJEMPLO 5

15 Se construyó un vector de expresión de ADN que codifica el
polipéptido del precursor multímero hIGF-1-Eb conteniendo las
siguientes modificaciones: eliminación de G1, eliminación de P2,
eliminación de E3, eliminación de R36, eliminación de R37,
eliminación de R71, eliminación de S72, eliminación de los últimos
20 siete aminoácidos C-terminales de Eb; y la inserción al término C de
este precursor de dos péptidos Eb adicionales tanto sin el R71 como
el S72 y los últimos siete aminoácidos C-terminales y un cuarto y
último péptido Eb sin el R71 y S72. La Figura 6A muestra una
ilustración esquemática de esta construcción. Esto da como
25 resultado la siguiente secuencia de proteína secretada:

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfynkptgygssapqgtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavr
aqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrn
aersvraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqr
eigsrnaersvraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgk
5 kkeqrreigsrnaersvraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteas
lqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:12)

Este polipéptido se sometió a un ensayo de fosforilación de
AKT como se describió en el Ejemplo 1. La Figura 5 indica que este
10 multímero hIGF-1-Eb fue capaz de dar señal a través de la
trayectoria de IGF-1R.

EJEMPLO 6

Se puede expresar un polipéptido del precursor hIGF-1-Eb de la
15 invención como se muestra esquemáticamente en la Figura 6B. Esta
construcción contiene las siguientes modificaciones: eliminación de
G1, eliminación de P2, eliminación de E3, eliminación de R36,
eliminación de R37, eliminación de R71, eliminación de S72; y la
inserción de Ea aminoácidos 93-102 entre los aminoácidos 95 y 96
20 de Eb, creando así un sitio de glicosilación N-enlazado en la
posición N92 y N100. Esto da como resultado la siguiente secuencia
de proteína secretada:

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfynkptgygssapqgtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavr
25 aqrhtdmpktqkyqppstnknasrgsagnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkk

keqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:13)

EJEMPLO 7

Se puede expresar un polipéptido del precursor hIGF-2-E de la invención teniendo las siguientes modificaciones: eliminación de P4, eliminación de S5, y eliminación de E6; mutación de R38 a A; y eliminación de R68 y eliminación de D69. Esto da como resultado la siguiente secuencia de proteína secretada: .

ayrtlcggelvdltlqfvcgdrgyfsrpsarvsrasrgiveeccfrscdlalletycatpaksevspptvlpdnfprypvgkffqydtwkqstqrlrrglpallrarrghvlakeleafreakhrhrplialptqdpahggappemasnrk (SEC ID NO:14)

EJEMPLO 8

Se puede expresar un polipéptido del precursor hIGF-2-Ea de la invención teniendo las siguientes mutaciones: eliminación de G1, y eliminación de P2; mutación de E3 a X, en donde X es un aminoácido no natural que es pegilado; mutación de R37 a A; y eliminación de R71 y eliminación de S72. Esto da como resultado la siguiente secuencia de proteína secretada:

Xtlcgaelvdalqfvcgdrgyfynkptgygsssrappqtgividccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknym (SEC ID NO:15)

Ejemplos 9-78 (Δ = eliminación)

9) hIGF-1-Ea: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R36A; $\Delta R71$

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygsssarapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaks
5 svraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEC ID NO:16)

10) hIGF-1-Ea: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R36A; $\Delta S72$

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygsssarapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaks
10 rvraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEC ID NO:17)

10) hIGF-1-Ea: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R36A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygsssarapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaks
15 vraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEC ID NO:18)

11) hIGF-1-Ea: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaks
20 svraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEC ID NO:19)

12) hIGF-1-Ea: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta S72$

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaks
25 rvraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEC ID NO:20)

13) hIGF-1-Ea: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$, $\Delta R37$; $\Delta R71$

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksas
vraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEC ID NO:21)

5

14) hIGF-1-Ea: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$, $\Delta R37$; $\Delta S72$

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksar
vraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEC ID NO:22)

10

15) hIGF-1-Ea: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; $\Delta R37$; $\Delta R71$, $\Delta S72$

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav
raqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEC ID NO:23)

15

16) hIGF-1-Eb: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R36A; $\Delta R71$



tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksas
svraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreig
20 srnaecrgkkgk (SEC ID NO:24)

17) hIGF-1-Eb: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R36A; $\Delta S72$

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksas
25 rvraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigs

rnaecrgkkgk (SEC ID NO:25)

18) hIGF-1-Eb: Δ G1, Δ P2, Δ E3; R37A; Δ R71

5 tlcgaelvda lqfvcgdr gfyfnkptgygsssr aapqtg ivdeccfr scdlrrl emycaplkp aksa
svraqrht dmpktqkyqpp stnkntksqrrkgw pkthpgge qkegteas lqirgkkkeqrreig
srnaecrgkkgk (SEC ID NO:26)

10 19) hIGF-1-Eb: Δ G1, Δ P2, Δ E3; R37A; Δ S72

tlcgaelvda lqfvcgdr gfyfnkptgygsssr aapqtg ivdeccfr scdlrrl emycaplkp aksa
rvraqrht dmpktqkyqpp stnkntksqrrkgw pkthpgge qkegteas lqirgkkkeqrreigs
rnaecrgkkgk (SEC ID NO:27)

15 20) hIGF-1-Eb: Δ G1, Δ P2, Δ E3; R37A; Δ R71, Δ S72

tlcgaelvda lqfvcgdr gfyfnkptgygsssr aapqtg ivdeccfr scdlrrl emycaplkp aksa
vraqrht dmpktqkyqpp stnkntksqrrkgw pkthpgge qkegteas lqirgkkkeqrreigsr
naecrgkkgk (SEC ID NO:28)

20

21) hIGF-1-Eb: Δ G1, Δ P2, Δ E3, Δ R37; Δ R71

tlcgaelvda lqfvcgdr gfyfnkptgygsssr aapqtg ivdeccfr scdlrrl emycaplkp aksa
vraqrht dmpktqkyqpp stnkntksqrrkgw pkthpgge qkegteas lqirgkkkeqrreigsr
25 naecrgkkgk (SEC ID NO:29)

22) hIGF-1-Eb: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$, $\Delta R37$; $\Delta S72$

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksar
vraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsr

5 naecrgkkgk (SEC ID NO:30)

23) hIGF-1-Eb: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$, $\Delta R37$; $\Delta R71$, $\Delta S72$

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav
10 raqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrn
aecrgkkgk (SEC ID NO:31)

24) hIGF-1-Ec: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R36A; $\Delta R71$

15 tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav
svraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgstfeerk (SEC ID NO:32)

25) hIGF-1-Ec: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R36A; $\Delta S72$

20 tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav
rvraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgstfeerk (SEC ID NO:33)

26) hIGF-1-Ec: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R36A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

25 tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav

vraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgstfeerk (SEC ID NO:34)

27) hIGF-1-Ec: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E2$; R37A; $\Delta R71$

5 tlcgaelvda1qfvcgdrfyfnkptgygssssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksas
vraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgstfeerk (SEC ID NO:35)

28) hIGF-1-Ec: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta S72$

10 tlcgaelvda1qfvcgdrfyfnkptgygssssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksas
rvraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgstfeerk (SEC ID NO:36)

29) hIGF-1-Ec: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

15 tlcgaelvda1qfvcgdrfyfnkptgygssssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksas
vraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgstfeerk (SEC ID NO:37)

30) hIGF-1-Ec: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$, $\Delta R37$, $\Delta R71$

20 tlcgaelvda1qfvcgdrfyfnkptgygssssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksas
vraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgstfeerk (SEC ID NO:38)

31) hIGF-1-Ec: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$, $\Delta R37$, $\Delta S72$

25 tlcgaelvda1qfvcgdrfyfnkptgygssssrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksas

vraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgstfeerk (SEC ID NO:39)

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

5

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygsssarapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksasvraqrhtdmpktqkyqppstnknsargsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:40)

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

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygsssrappqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksasvraqrhtdmpktqkyqppstnknsargsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:41)

15

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

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygsssrappqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksasvraqrhtdmpktqkyqppstnknsargsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:42)

20

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

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygsssarapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarvraqrhtdmpktqkyqppstnknsargsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirg

25

kkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:43)

36) hIGF-1-Eab: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta S72$

5 tlcgaelvda lqfvcgdr gfyfnkptgygsssr aapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksa
rvraqrhtdmpktqkyqppstnk nasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirg
kkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:44)

37) hIGF-1-Eab: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$, $\Delta R37$, $\Delta S72$

10

tlcgaelvda lqfvcgdr gfyfnkptgygsssr aapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksar
vraqrhtdmpktqkyqppstnk nasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirg
kkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:45)

15 38) hIGF-1-Eab: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R36A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

tlcgaelvda lqfvcgdr gfyfnkptgygsssr aapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksa
vraqrhtdmpktqkyqppstnk nasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirg
kkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:46)

20

39) hIGF-1-Eab: $\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$, $\Delta R37$, $\Delta R71$, $\Delta S72$

tlcgaelvda lqfvcgdr gfyfnkptgygsssr aapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav
raqrhtdmpktqkyqppstnk nasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgk

25 kkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:47)

40) hIGF-1-Ea: $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

gtlcgaelvdaqlqfvcgdrgyfynkptgygssssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaks
avraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEC ID NO:48)

5

41) hIGF-1-Eb: $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

gtlcgaelvdaqlqfvcgdrgyfynkptgygssssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaks
avraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreig

10 srnaecrgkkgk (SEC ID NO:49)

42) hIGF-1-Eb multimer: ($\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A)-3xEb($\Delta R71$, $\Delta S72$,
 ΔC -término 7 aa)-Eb($\Delta R71$, $\Delta S72$)

15 tlcgaelvdaqlqfvcgdrgyfynkptgygssssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaks
vraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsr
naevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrre
igsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkke
qrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirg
20 kkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:50)

43) hIGF-1-Eb multimer: ($\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A)-3xEb($\Delta R71$, $\Delta S72$, ΔC -
término 7 aa)-Eb($\Delta R71$, $\Delta S72$)

25 gtlcgaelvdaqlqfvcgdrgyfynkptgygssssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaks

avraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteasqirgkkkeqrreig
 srnaevraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteasqirgkkkeqr
 reigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteasqirgkk
 keqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteasqi
 5 rgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:51)

44) hIGF-1-Ec: $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

gtlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpaks
 10 avraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgstfeerk (SEC ID NO:52)

45) hIGF-1-Ea: $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

gptlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpa
 15 ksavraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEC ID NO:53)

46) hIGF-1-Eb: $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

gptlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssssraapqtgivedccfrscdlrrlemycaplkpa
 20 ksavraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteasqirgkkkeqrre
 igsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:54)

47) hIGF-1-Eb multimer: ($\Delta G1$, $\Delta P2$, $\Delta E3$; R37A)-3xEb($\Delta R71$, $\Delta S72$,
 ΔC -término 7 aa)-Eb($\Delta R71$, $\Delta S72$)

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaks
 vraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsr
 naevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrre
 igsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkke
 5 qrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirg
 kkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:55)

48) hIGF-1-Eb multímero: (Δ E3; R37A)-3xEb(Δ R71, Δ S72, Δ C-
 término 7 aa)-Eb(Δ R71, Δ S72)

10

gptlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpa
 ksavraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrre
 igsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkke
 qrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirg
 15 kkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteasl
 qirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:56)

49) hIGF-1-Ec: Δ E3; R37A; Δ R71, Δ S72

20 gptlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpa
 ksavraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgstfeerk (SEC ID NO:57)

50) hIGF-1-Ea: Δ E3; R37A; Δ R71, Δ S72

25 gptlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpa

ksavraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEC ID NO:58)

51) hIGF-1-Eb: $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

5 gptlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpa
ksavraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrre
igsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:59)

52) hIGF-1-Ec: $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

10

gptlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpa
ksavraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgstfeerk (SEC ID NO:60)

53) hIGF-1-Eab: $\Delta E3$; R37A; $\Delta R71$, $\Delta S72$

15

gptlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpa
ksavraqrhtdmpktqkyqppstnknsrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslq
irgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:61)

20 54) hIGF-1-Eb multímero: ($\Delta E3$; R37A)-3xEb($\Delta R71$, $\Delta S72$, ΔC -
término 7 aa)-Eb($\Delta R71$, $\Delta S72$)

gptlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpa
ksavraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrre
25 igsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkke

qrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirg
 kkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteasl
 qirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:62)

5 55) hIGF-1-Ea: E3A; R37A; Δ R71, Δ S72

gpatlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkp
 aksavraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEC ID NO:63)

10 56) hIGF-1-Eb: E3A; R37A; Δ R71, Δ S72

gpatlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkp
 aksavraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrr
 eigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:64)

15

57) hIGF-1-Ec: E3A; R37A; Δ R71, Δ S72

gpatlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkp
 aksavraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgstfeerk (SEC ID NO:65)

20

58) hIGF-1-Eab: E3A; R37A; Δ R71, Δ S72

gpatlcgaelvdaqlfvcgdrfyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkp
 aksavraqrhtdmpktqkyqppstnknasrgsagnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteasl

25 qirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:66)

59) hIGF-1-Eb multímero: (E3A; R37A)-3xEb(Δ R71, Δ S72, Δ C-término
7 aa)-Eb(Δ R71, Δ S72)

gpatlcgaelvda lqfvcgdr gfyfnkptgygsssr aapqtg ivdeccfrscdlrrl emycaplkp
5 aksavraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteas lqirgkkkeqrr
eigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteas lqirgkkk
eqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteas lqir
gkkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegte
slqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:67)

10

60) hIGF-1-Ea: Δ P2, Δ E3; R37A; Δ R71, Δ S72

gtlcgaelvda lqfvcgdr gfyfnkptgygsssr aapqtg ivdeccfrscdlrrl emycaplkpaks
avraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEC ID NO:68)

15

61) hIGF-1-Eb: Δ P2, Δ E3; R37A; Δ R71, Δ S72

gtlcgaelvda lqfvcgdr gfyfnkptgygsssr aapqtg ivdeccfrscdlrrl emycaplkpaks
avraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteas lqirgkkkeqrreig
20 srnaecrgkkgk (SEC ID NO:69)

62) hIGF-1-Ec: Δ P2, Δ E3; R37A; Δ R71, Δ S72

gtlcgaelvda lqfvcgdr gfyfnkptgygsssr aapqtg ivdeccfrscdlrrl emycaplkpaks
25 avraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgstfeerk (SEC ID NO:69)

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

gtlcgaelvda1qfvcgdrqfyfnkptgygssssraapqtg1vdeccfrscdlrrlemycaplkpaks
avraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqir
5 gkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:70)

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

10 gtlcgaelvda1qfvcgdrqfyfnkptgygssssraapqtg1vdeccfrscdlrrlemycaplkpaks
avraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreig
srnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqr
reigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkk
keqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqi
15 rgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:71)

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

Xtlcgaelvda1qfvcgdrqfyfnkptgygssssraapqtg1vdeccfrscdlrrlemycaplkpak
20 savraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrrei
gsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:72)

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

25 Xtlcgaelvda1qfvcgdrqfyfnkptgygssssraapqtg1vdeccfrscdlrrlemycaplkpak

savraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgstfeerk (SEC ID NO:73)

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

5 Xtlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpak
savraqrhtdmpktqkyqppstnknasrgsagnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteaslqi
rgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:74)

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

Xtlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpak
savraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrrei
gsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkke
15 qrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirg
kkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteasl
qirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:75)

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

20

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaks
Xvraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEC ID NO:76)

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

25 tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaks

Xvraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreig
srnaecrgkkgk (SEC ID NO:77)

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

5

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaks
Xvraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgstfeerk (SEC ID NO:78)

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

10

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaks
Xvraqrhtdmpktqkyqppstnknasrgsagnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteaslqir
gkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:79)

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

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpakX
20 savraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrrei
gsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkke
qrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirg
kkkeqrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpkthpggeqkegteasl
qirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk (SEC ID NO:80)

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

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaks
vraqrhtdmpktqkevhlkXasrgsagnknyrm (SEC ID NO:81)

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

5

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaks
vraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsr
naeXrgkkkgk (SEC ID NO:82)

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

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaks
vraqrhtdmpktqkyqppstnknsasrgsagnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirg
kkkeqrreigsrnaeXrgkkkgk (SEC ID NO:83)

15

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

20

tlcgaelvdalqfvcgdrgyfnkptgygssraapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaks
vraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsr
naevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrre
igsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkke
qrreigsrnaevraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirg
kkkeqrreigsrnaeXrgkkkgk (SEC ID NO:84)

25

EJEMPLO 79**Ensayo de Proliferación de Mioblasto**

El ensayo de proliferación de mioblasto proporciona un
5 indicador confiable in vitro de la actividad de IGF y se utiliza como
un modelo para factores que afectan mioblastos embriónicos y
células de satélite adultas. Los factores activos en este sistema se
comportan similarmente en cultivos primarios de mioblastos. El
mejoramiento de la proliferación del mioblasto in vitro a través de un
10 péptido de esta invención indica su actividad para ocasionar una
proliferación incrementada de mioblastos y, por lo tanto, un
incremento en el número final de miofibras en el útero. Además, un
mejoramiento similar de la proliferación de mioblastos indica que se
pueden utilizar los péptidos de esta invención para mejorar
15 hipertrofia muscular en adultos, por ejemplo, a través de la
estimulación de la proliferación de células de músculo de satélite.

EJEMPLO 80**Ensayo de Tejido Epitelial Mamario**

20

En animales lactantes, la cantidad de tejido epitelial mamario
es un factor limitante en la producción de leche, ya son células que
producen y secretan leche. Al emplear sistemas in vitro, las células
epiteliales obtenidas de glándulas mamarias de animales pueden ser
25 estimuladas por el IGF-1 o IGF-2 modificado de la presente invención

para proliferar y producir cantidades en incremento de constituyentes de leche. Además, se puede demostrar que las células epiteliales mamarias estimuladas para proliferar en dicho sistema de célula in vitro pueden ser re-implantadas en depósitos de grasa mamarios descongestionados y ser estimuladas para proliferar y/o producir
5 leche en animales hembra lactantes.

EJEMPLO 81

Medición de IGF-1 o IGF-2 en Sangre u Otros Fluidos del Cuerpo

10

La cantidad efectiva del péptido administrado parenteralmente por dosis puede ser medida a través de una curva de dosis-respuesta. Por ejemplo, los péptidos IGF modificados de la invención pueden ser medidos en la sangre o fluidos del cuerpo del sujeto que
15 será tratado para determinar la dosificación. Alternativamente, se pueden administrar cantidades en incremento del péptido al sujeto y verificar los niveles, en el suero del sujeto, del IGF-1 e IGF-2 modificados. La cantidad del péptido que se empleará puede ser calculada en una base molar sobre estos niveles, en el suero, de
20 IGF-1 e IGF-2 modificados.

Un método para determinar la dosificación apropiada del péptido implica medir un péptido IGF de la invención en un fluido biológico, tal como un fluido del cuerpo o sangre. La medición de dichos niveles puede realizarse a través de cualquier medio,
25 incluyendo RIA y ELISA. Después de medir los niveles de IGF, el

fluido se pone en contacto con el péptido utilizando dosis individuales o múltiples. Después de este paso de hacer contacto, los niveles de IGF se vuelven a medir en el fluido. Si los niveles de IGF en el fluido han caído una cantidad suficiente para producir la
5 eficacia deseada para la cual se va administrar la molécula, entonces la dosis de la molécula puede ser ajustada para producir la eficacia máxima. Este método puede ser realizado in vitro o in vivo. Preferiblemente, este método se realiza in vivo, es decir, después de que el fluido es extraído de un sujeto y los niveles de IGF se han
10 medido, el péptido aquí es administrado al mamífero utilizando dosis individuales o múltiples (es decir, el paso de poner en contacto se realiza a través de la administración a un animal), y después los niveles de IGF se vuelven a medir a partir del fluido extraído del animal.

15 Otro método para determinar la dosificación es utilizar anticuerpos para el péptido u otro método de detección para el péptido en el formato LIFA.

EJEMPLO 82

Farmacocinética In Vivo de hIGF-1-Ec 3mut

20

Ratones macho adultos (n = 3/grupo) recibieron una inyección de bolo intravenosa (i.v.) de rhIGF-1 a 1 mg/kg, y hIGF-1-Ec 3mut (descrito en el Ejemplo 3) a 1.55 mg/kg. Se recogieron especímenes
25 de sangre en serie a 5, 15, 30 y 60 minutos después de la

administración del material de prueba. Las concentraciones de rhIGF-1 y hIGF-1-Ec 3mut, en el suero, se determinaron mediante ELISA. Este ensayo es específico para hIGF-1.

Se administraron, i.v. en ratones, dosis equimolares de rhIGF-1 y hIGF-1-Ec 3mut. Los resultados muestran niveles significativamente más altos de la proteína hIGF-1-Ec 3mut según comparado con rhIGF-1 en todos los puntos de tiempo examinados, indicando que el hIGF-1-Ec 3mut es metabólicamente más estable que el IGF-1 con una longitud de 70 aminoácidos.

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.- Un polipéptido que comprende una proteína de precursor IGF-1 humana, en donde la escisión del péptido E a partir de IGF-1
5 mediante una proteasa se reduce a través de la modificación de la proteína de precursor.

2.- El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la proteína de precursor comprende el péptido Ea.

3.- El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en
10 donde la proteína de precursor comprende el péptido Eb.

4.- El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3, en donde los últimos siete aminoácidos C-terminales de Eb son eliminados.

5.- El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en
15 donde la proteína de precursor comprende el péptido Ec.

6.- El polipéptido de acuerdo con cualquier de las reivindicaciones precedentes, en donde G1 de la proteína de precursor es eliminado o mutado.

7.- El polipéptido de acuerdo con cualquier de las
20 reivindicaciones precedentes, en donde P2 de la proteína de precursor es eliminado o mutado.

8.- El polipéptido de acuerdo con cualquier de las reivindicaciones precedentes, en donde E3 de la proteína de precursor es eliminado o mutado.

25 9.- El polipéptido de acuerdo con cualquier de las

reivindicaciones precedentes, en donde R36 de la proteína de precursor es eliminado o mutado.

10.- El polipéptido de acuerdo con cualquier de las reivindicaciones precedentes, en donde R36 es mutado a alanina.

5 11.- El polipéptido de acuerdo con cualquier de las reivindicaciones precedentes, en donde R37 de la proteína de precursor es eliminado o mutado.

12.- El polipéptido de acuerdo con cualquier de las reivindicaciones precedentes, en donde R37 es mutado a alanina.

10 13.- El polipéptido de acuerdo con cualquier de las reivindicaciones precedentes, que además comprende la secuencia de consenso de glicosilación N-enlazada, NXS/T.

14.- El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3, que además comprende los aminoácidos 93-102 de Ea insertado entre los
15 aminoácidos N95 y T96 de Eb.

15.- El polipéptido de acuerdo con cualquier de las reivindicaciones precedentes, que además comprende un oligosacárido covalentemente enlazado a una cadena lateral de aminoácido de la proteína de precursor.

20 16.- El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el oligosacárido está covalentemente enlazado a una cadena lateral de arginina de la proteína de precursor.

17.- El polipéptido de acuerdo con cualquier de las reivindicaciones precedentes, en donde un residuo de la proteína de
25 precursor se reemplaza por un aminoácido no natural.

18.- El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el aminoácido no natural comprende un grupo acetileno o azido.

19.- El polipéptido de acuerdo con cualquier de las 5 reivindicaciones precedentes, que además comprende una porción de glicol etilénico covalentemente unida a una cadena lateral de la proteína de precursor.

20.- El polipéptido de acuerdo con cualquier de las reivindicaciones precedentes, que además comprende un péptido E 10 adicional enlazado al término C de la proteína de precursor.

21.- Un polipéptido que comprende, a partir del término N al término C,

una proteína de precursor IGF-1 que comprende un primer péptido Eb, en donde:

15 G1, P1 y E1 son eliminados,

R36 y R37 son eliminados,

R71 y S72 son eliminados, y

los últimos siete aminoácidos C-terminales del primer péptido Eb son eliminados;

20 un segundo péptido Eb, en donde R71, S72, y los últimos siete aminoácidos C-terminales del segundo péptido Eb son eliminados;

un tercer péptido Eb, en donde R71, S72 y los últimos siete aminoácidos C-terminales del tercer péptido Eb son eliminados;

25 y

un cuarto péptido Eb, en donde R71 y S72 son eliminados.

22.- El polipéptido de acuerdo con cualquier de las reivindicaciones 1 a 20, en donde R71 o S72 de la proteína de precursor es eliminado o mutado.

23.- Un polipéptido que comprende una proteína de precursor IGF-1 humana, en donde la escisión del péptido E a partir de IGF-1 a través de una proteasa se reduce a través de la modificación de la proteína de precursor.

24.- El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 23, en donde R68 o D69 de la proteína de precursor es eliminado o mutado.

25.- Un método para tratar una enfermedad músculo-esquelética, diabetes, muerte de célula neuronal, o anemia, el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones precedentes a un sujeto.

26.- El uso del polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad músculo-esquelética, diabetes, muerte de célula neuronal, o anemia.

1/20

FIG. 1A



FIG. 1B

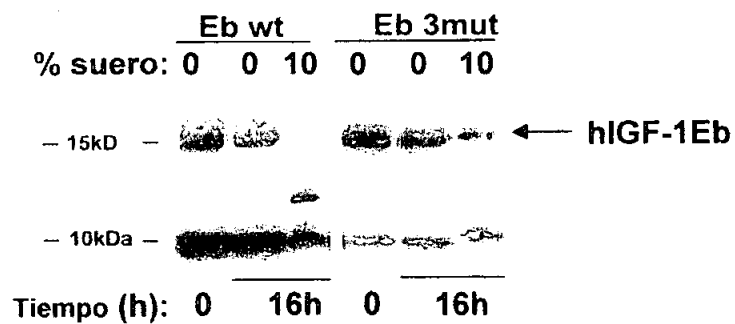
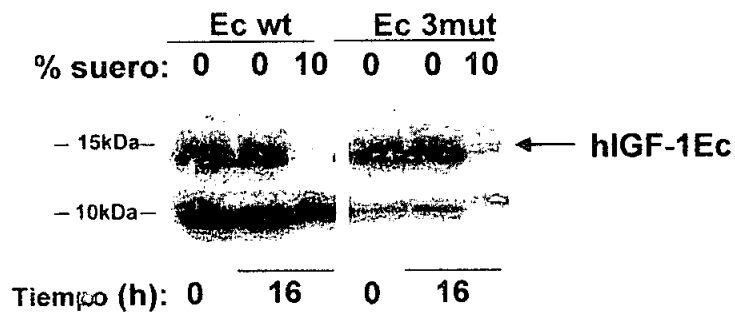


FIG. 1C



2/20

FIG. 2A

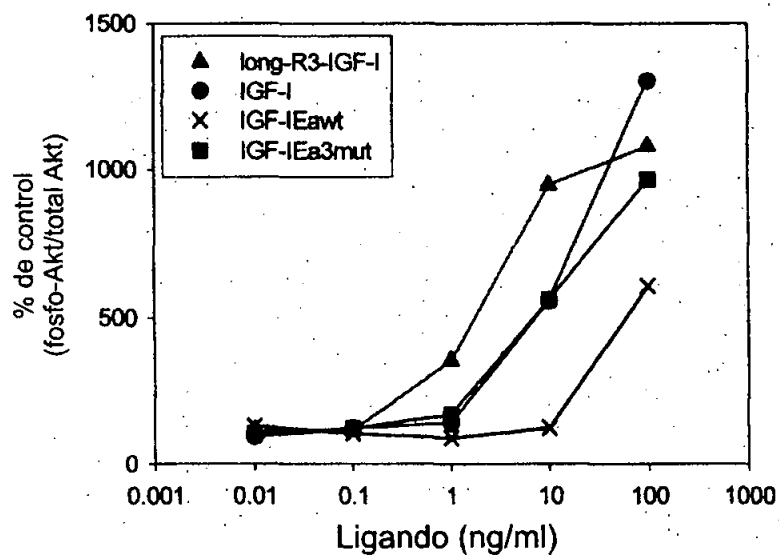
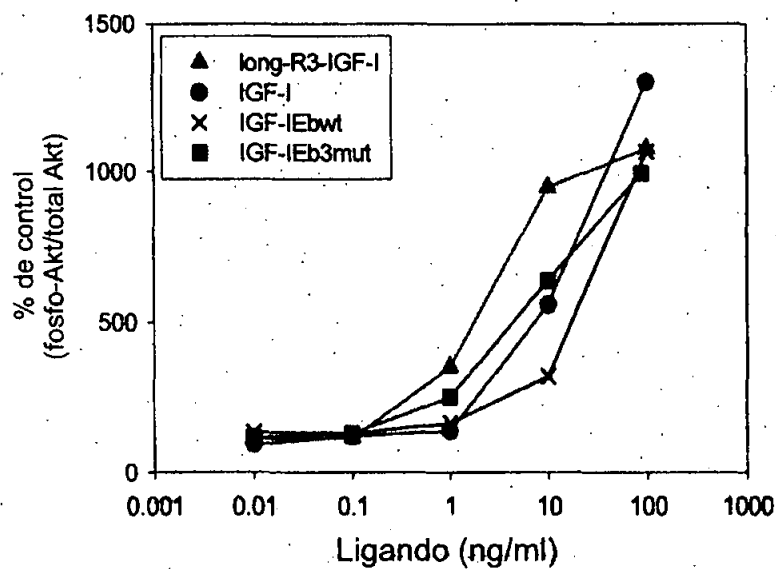


FIG. 2B



3/20

FIG. 2C

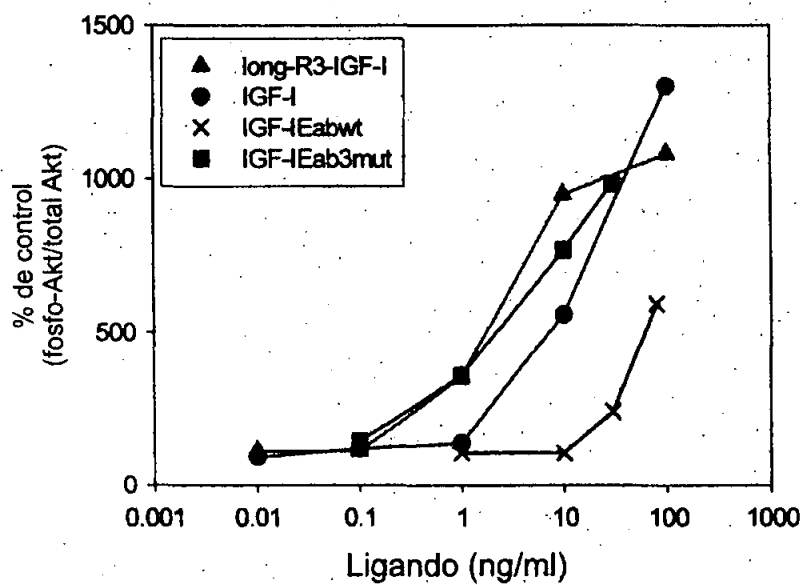
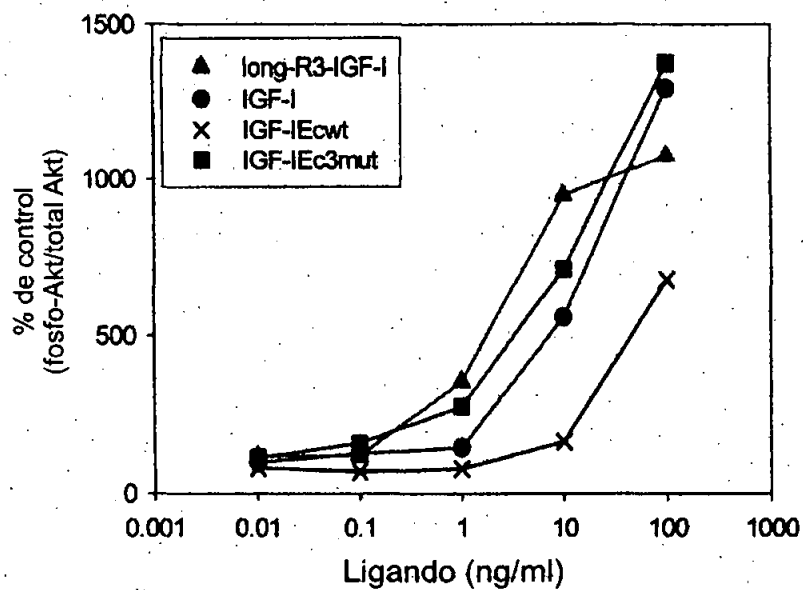


FIG. 2D



4/20

FIG. 3A

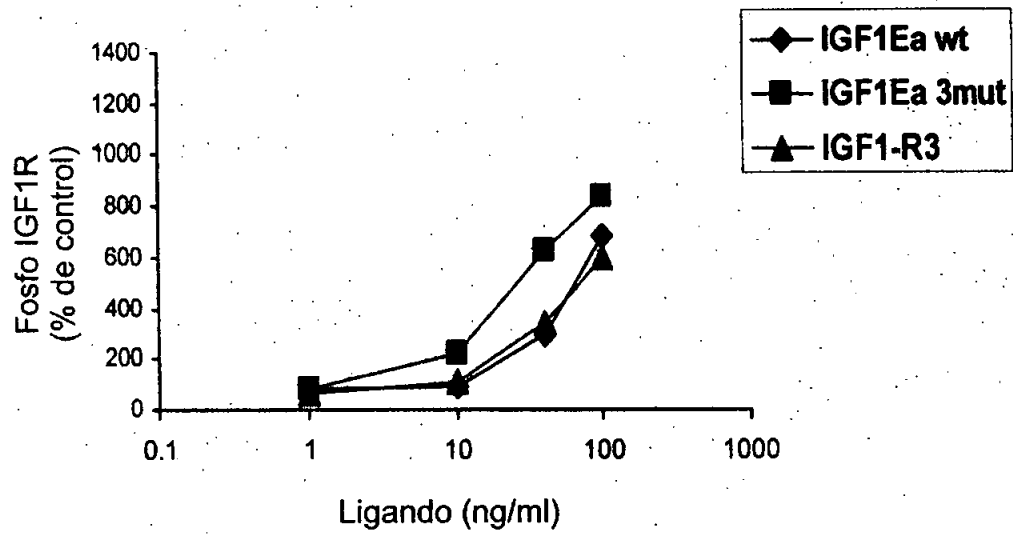
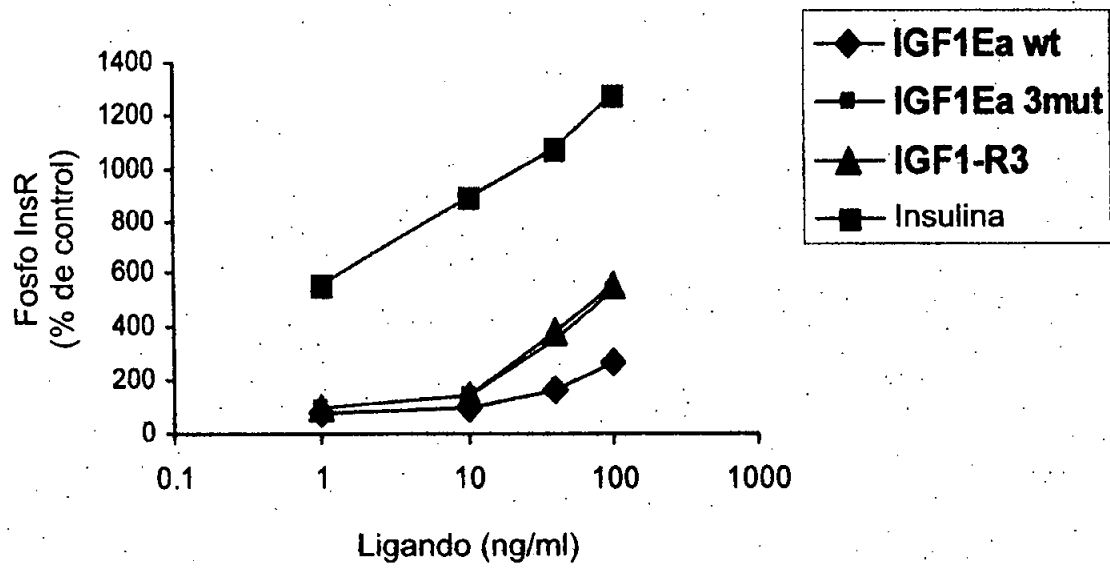


FIG. 3B



5/20

FIG. 3C

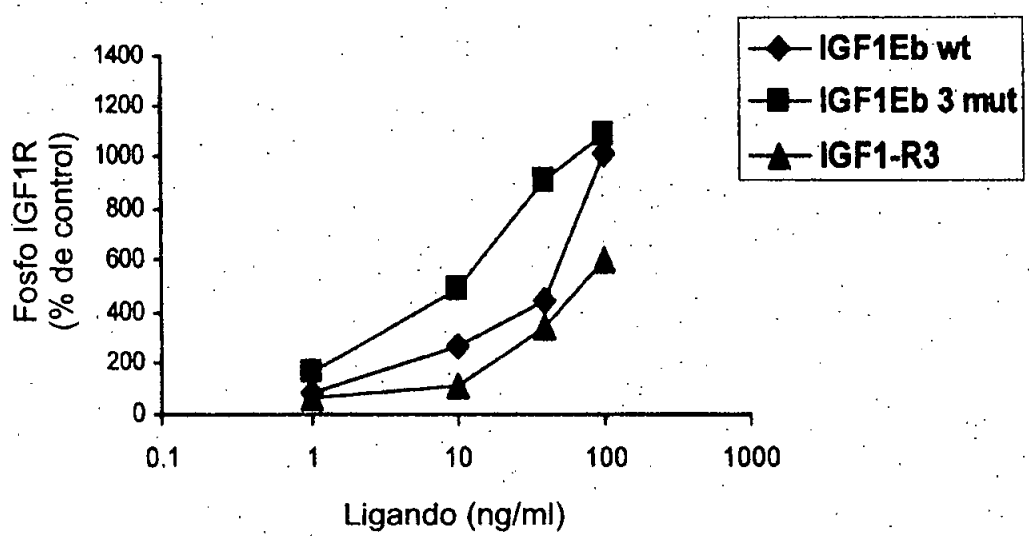
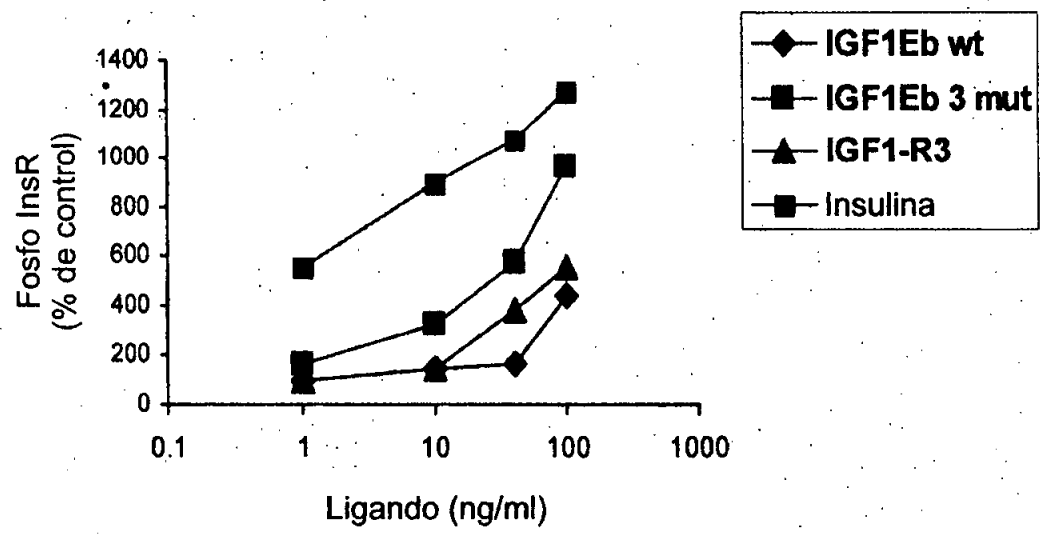


FIG. 3D



6/20

FIG. 4A

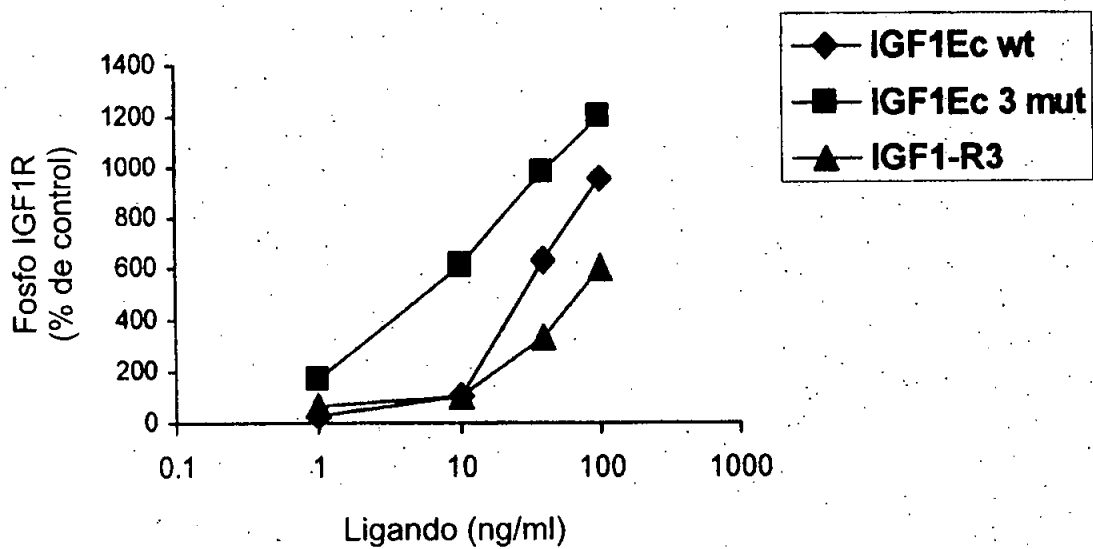
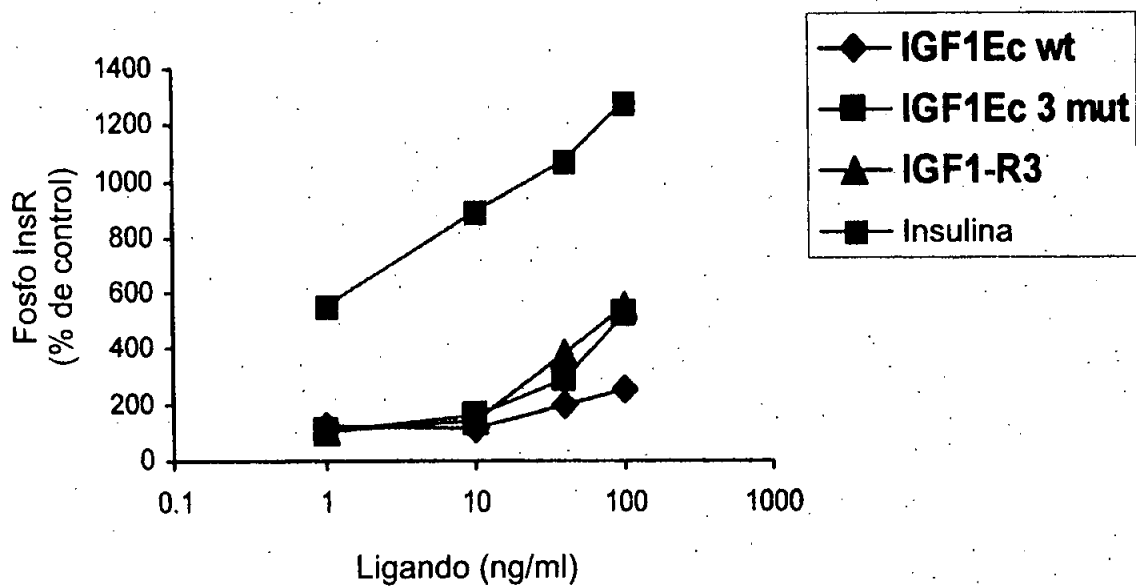


FIG. 4B



7/20

FIG. 4C

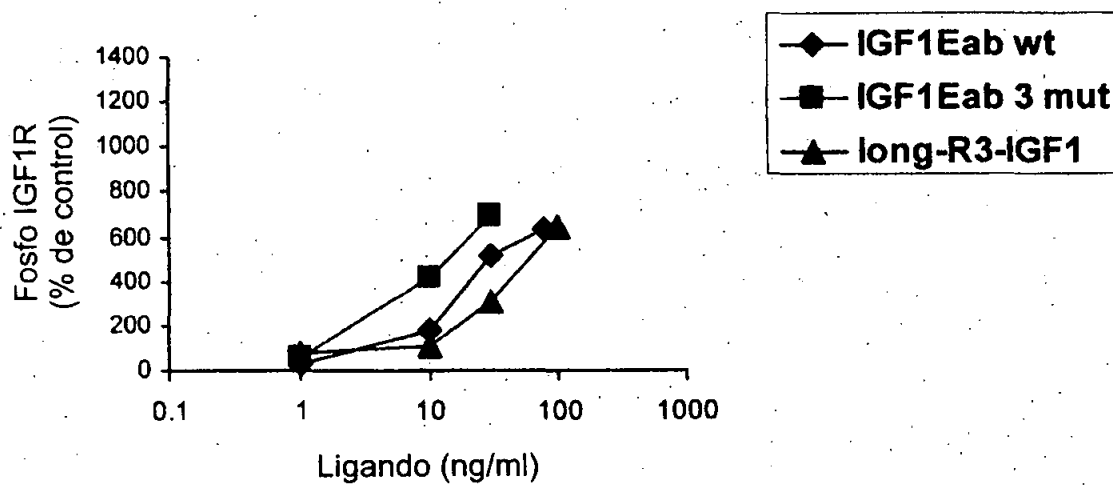
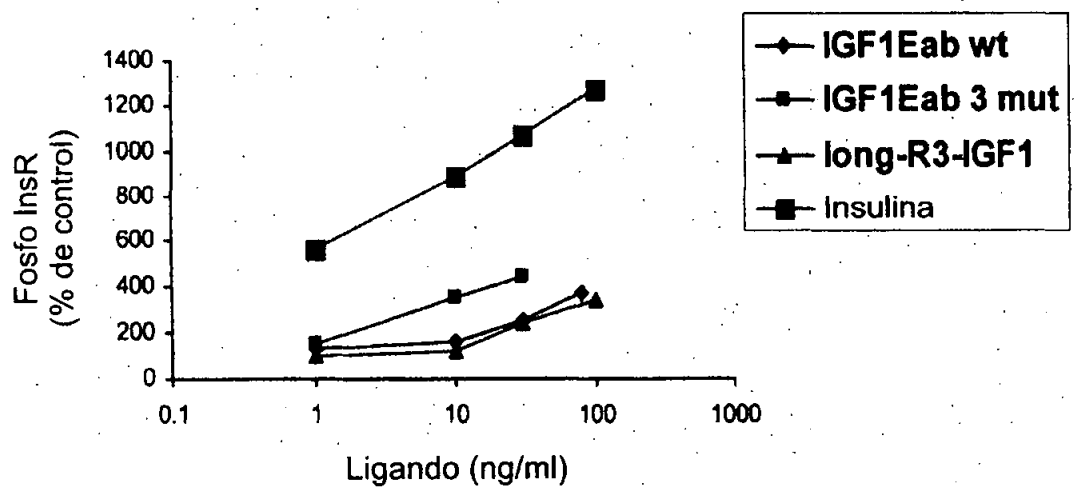


FIG. 4D



8/20

FIG. 5

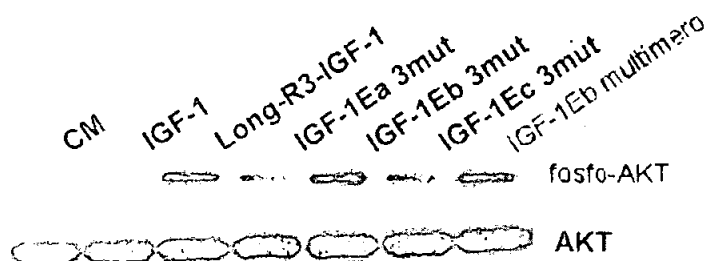


FIG. 6A

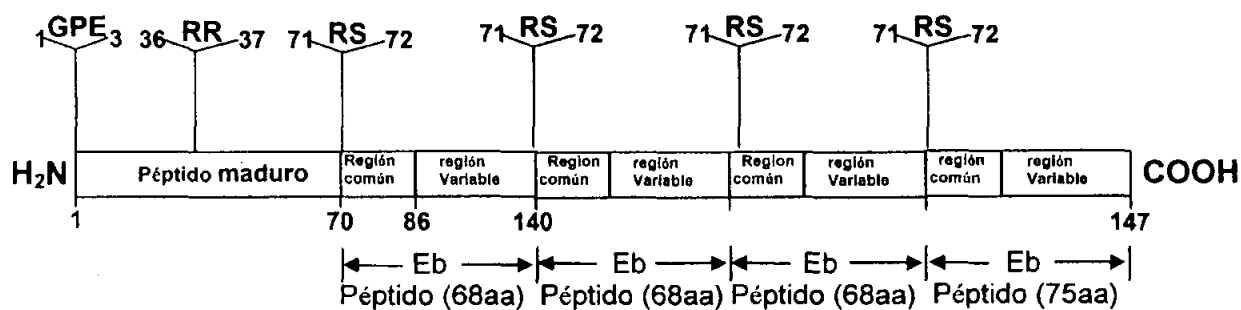
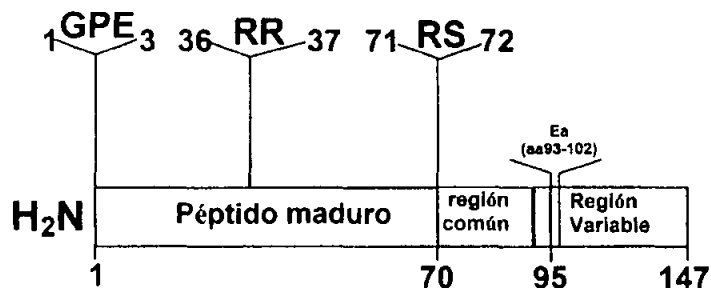


FIG. 6B



9/20

FIG. 7A

SEC ID NO

Mayoría

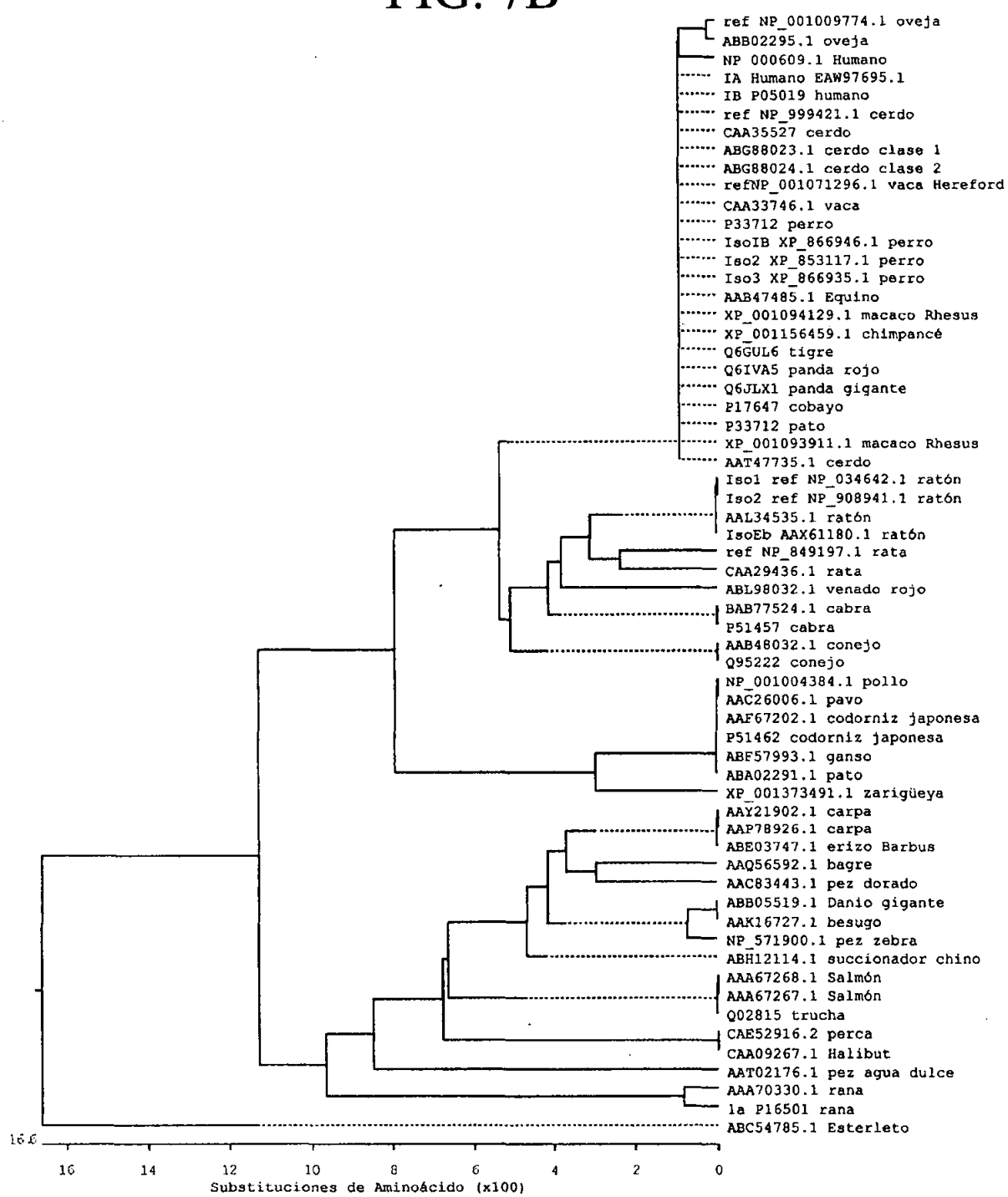
GPETLCGAELVDALOFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA 1

IGF-1 Humano
IA Humano EAW97695.1
IB P05019 humano
ref NP_999421.1 cerdo
CAA35527 cerdo
ABG88023.1 cerdo clase 1
ABG88024.1 cerdo clase 2
refNP_001071296.1 vaca Hereford
CAA33746.1 vaca
ref NP_001009774.1 oveja
ABB02295.1 oveja
BAB77524.1 cabra
P51457 cabra
P33712 perro
Iso1B XP_866946.1 perro
Iso2 XP_853117.1 perro
Iso3 XP_866935.1 perro
AAB47485.1 Equino
XP_001094129.1 macaco Rhesus
XP_001156459.1 chimpancé
Q6GUL6 tigre
Q61VA5 panda rojo
Q6JLX1 panda gigante
ABI98032.1 venado rojo
AAB48032.1 conejo
Q95222 conejo
P17647 cobayo
ref NP_849197.1 rata
CAA29436.1 rata
Iso1 ref NP_034642.1 ratón
Iso2 ref NP_908941.1 ratón
AAI34535.1 ratón
IsoEb AAX61180.1 ratón
NP_001004384.1 pollo
AAC26006.1 pavo
AAF67202.1 codorniz japonesa
P51462 codorniz japonesa
ABF57993.1 ganso
P33712 pato
ABA02291.1 pato
AAA67268.1 Salmón
AAA67267.1 Salmón
ABC54785.1 Esterleto
CAE52916.2 perca
Q02815 trucha
CAA09267.1 Halibut
AAQ56592.1 bagre
AAY21902.1 carpa
AAP78926.1 carpa
ABB05519.1 Danio gigante
NP_571900.1 pez zebra
ABH12114.1 succionador chino
ABE03747.1 erizo Barbus
AAT02176.1 pez agua dulce
AACB3443.1 pez dorado
AAA70330.1 rana
AAK16727.1 besugo
la P16501 rana
XP_001093911.1 macaco Rhesus
XP_001373491.1 zarigüeya
AAT47735.1 cerdo

[illegible]

10/20

FIG. 7B



11/20

FIG. 8A

SEC ID NO

Mayoría

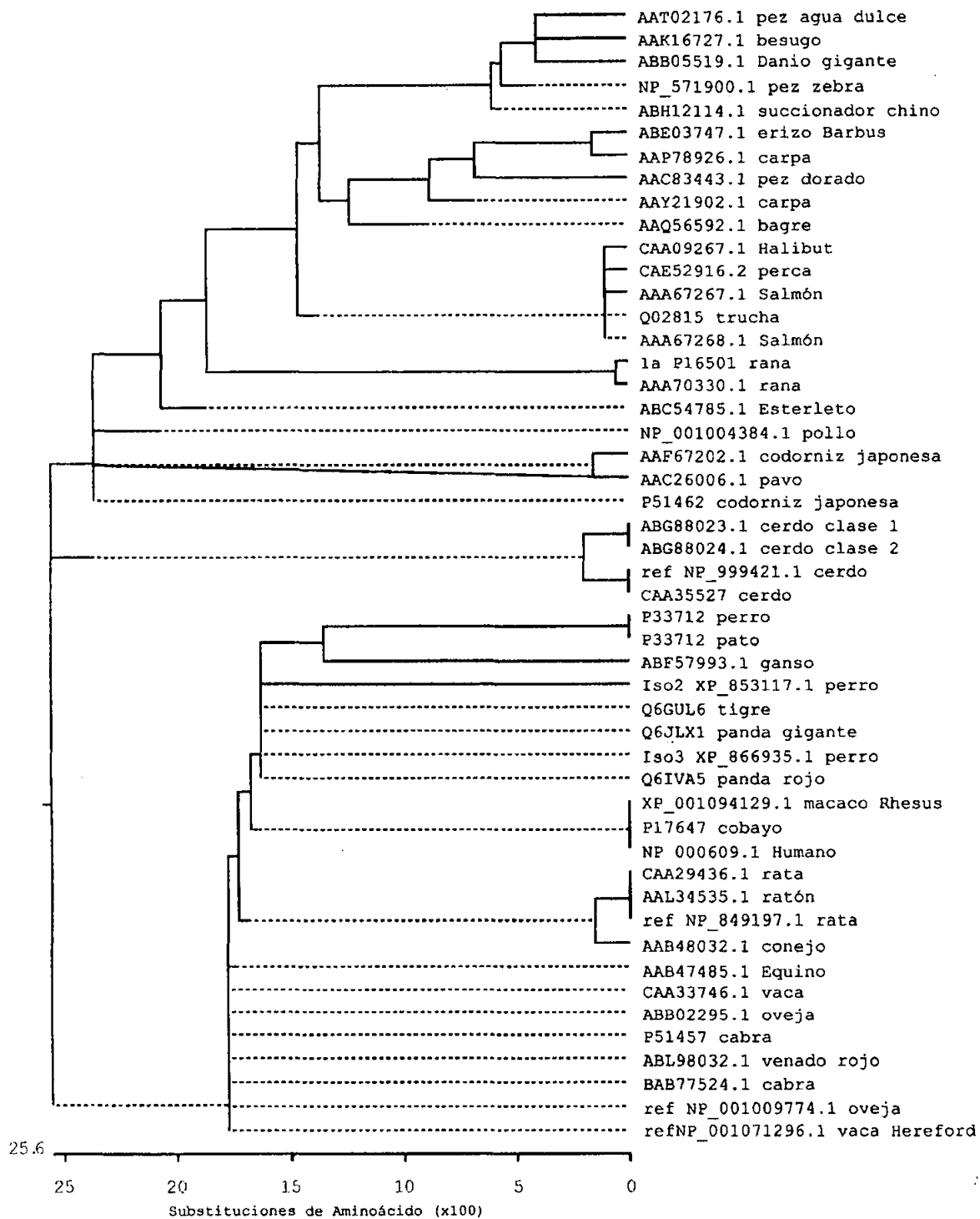
RSVRAQRHTDMPKAOKEVHLKNTSRGSTGNKNYRM 109

Ea humano
ref NP_999421.1 cerdo
CAA35527 cerdo
ABG88023.1 cerdo clase 1
ABG88024.1 cerdo cclase 2
ref NP_001071296.1 vaca Hereford
CAA33746.1 vaca
ref NP_001009774.1 oveja
ABB02295.1 oveja
BAB77524.1 cabra
P51457 cabra
P33712 perro
Iso2 XP_853117.1 perro
Iso3 XP_866935.1 perro
AAB47485.1 equino
XP_00104129.1 macaco Rhesus
Q6GUL6 tigre
Q6IVA5 panda rojo
Q6JLX1 panda gigante
ABL98032.1 venado rojo
AAB48032.1 conejo
P17647 cobayo
ref NP_849197.1 rata
CAA29436.1 rata
AAL34535.1 ratón
NP_001004384.1 pollo
AAC26006.1 pavo
AAF67202.1 codorniz japonesa
P51462 cordoniz japonesa
ABF57993.1 ganso
P33712 pato
AAA67268.1 salmón
AAA67267.1 salmón
ABC54785.1 esterleto
CAE52916.2 percha
Q02815 trucha
CAA09267.1 Halibut
AAQ56592.1 bagre
AAY21902.1 carpa
AAP78926.1 carpa
ABB05519.1 Danio gigante
NP_571900.1 pez zebra
ABH12114.1 succionador chino
ABE03747.1 erizo Barbus
AAT02176.1 pez agua dulce
AAC83443.1 pez dorado
AAA70330.1 rana
AAK16727.1 besugo
la P16501 rana

	10	20	30	
	+	+	+	
	-	-	-	
RSVRAQRHTDMPKTKQEVHLKNASRGSGAGNKNYRM				2
RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSSSGNKNYRM				109
RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSSSGNKNYRM				109
RSVRAQRHTDMPKARKEVHLKNTSRGSSSGNKNYRM				110
RSVRAQRHTDMPKARKEVHLKNTSRGSSSGNKNYRM				110
RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSGAGNKNYRM				111
RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSGAGNKNYRM				111
RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSGAGNKNYRM				111
RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSGAGNKNYRM				111
RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSGAGNKNYRM				111
RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSGAGNKNYRM				111
RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNASRGSGAGNKTY				112
RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNASRGSGAGNKNYRM				113
RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNASRGSGAGNKNYRM				113
RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSGAGNKNYRM				111
RSVRAQRHTDMPKTKQEVHLKNASRGSGAGNKNYRM				2
RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNASRGSGAGNKNYRM				113
RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNASRGSGAGNKNYRM				113
RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNASRGSGAGNKNYRM				113
RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGSGAGNKNYRM				111
RSVRAQRHTDMPKTKQEVHLKNTSRGSGAGNKNYRM				114
RSVRAQRHTDMPKTKQEVHLKNASRGSGAGNKTY				2
RSIRAQRHTDMPKTKQEVHLKNTSRGSGAGNKTYRM				115
RSIRAQRHTDMPKTKQEVHLKNTSRGSGAGNKTYRM				115
RSIRAQRHTDMPKTKQEVHLKNTSRGSGAGNKTYRM				115
RSIRAQRHTDMPKTKQEVHLKNTSRGNTGNRNYRM				116
RSVRAQRHTDMPKAQKELHLKNTSRGNTGNRNYRM				117
RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGNTGNRNYRM				116
RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGNTGNRNYRM				116
RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNTSRGNTGNRNYRM				118
RSVRAQRHTDMPKAQKEVHLKNASRGSGAGNKTY				112
RSVRAQRHTDMPRTPEVHQKNSSRGNTGGRNYRM				119
RSVRAQRHTDMPRTPEVHQKNSSRGNTGGRNYRM				119
RSVRAQRHTDMPKAQKEVHKSNSRGNTGNRNYRI				120
RSVRAQRHTDMPRAPKEVHQKNSSRGNTGGRNYRM				121
RSVRAQRHTDMPRTPEVHQKNSSRGNTGGRNYRM				119
RSVRAQRHTDMPRAPKEVHQKNSSRGNTGGRNYRM				122
RSVREQHTDTPKTPKEVHQKNSSRGNTGGRNYRM				123
RSIRAQRHTDSPKTAKEVHQKNSSRGNTGGRNYRM				124
RSVRAQRHTDSPRTAKEVHQKNSSRGNTGGRNYRI				125
RSIRAQRHTDIPRTAKEVHQKNSSRGNTGGRNYRM				126
RSIRAQRHTDIPRTPEVHQKNSSRGNTGGRNYRM				127
RSIRAQRHTDIPRTPKDVHQKNSSRGNTGGRNYRM				128
RSIRAQRHTDSPRTAKEVHQKNSSRGNTGGRNYRI				129
RSIRAQRHTDIPRTAKEVHQKNSSRGITGGRNYRM				130
RSIRAQRHTDGTRTAKEVHQKNSSRGNTGGRNYRM				131
RSVRAQRHTDMPKAQKEVHPKNTSRGNTGSGRFRM				132
RSIRAQRHTDIPRTAKEVHQKNSSRGNTGGRNYRI				133
RSVRTQRHTDMPKAQKEVHPKNTSRGNTGSGRFRM				134

12/20

FIG. 8B



13/20

FIG. 9A

Mayoría

-----RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNNKTKSQRARRKGGPKTHPGGEQKE-----

-----10-----20-----30-----40-----50-----60-----70-----

Ed humano -----RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNNKTKSQRARRKGGPKTHPGGEQKEGTEASLQIRGKKKEQRREIGSRNAECRGKK

P05019 humano -----RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNNKTKSQRARRKGGPKTHPGGEQKEGTEASLQIRGKKKEQRREIGSRNAECRGKK

AAT47735.1 cerdo -----RSVRAQRHTDMPKAQKYQPPSTNNKTKSQRARRKGS--TFEEHK

AAU93628.1 vaca de la India -----YOPPSTNNKTKSQRARRKGGPKTHPGGEQKE

AAA03497.1 ganado HAQSGEGKPARGGGEGRPSSYQPPSTNNKTKSQRARRKGGPKTHPGGEQKE

AAU93630.1 bufalo de agua -----YOPPSTNNKTKSQRARRKGGPKTHPGGEQKE

AAU93626.1 oveja -----YQLPSTNNKTKSQRARRKGGPKTHPGGEQKE

XP 866946.1 perro -----RSVRAQRHTDMPKAQKYHPPSTNNKTKSQRARRKGS--TFEECK

Q95222 conejo -----RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNNKTKSQRARRKGS--TFEEHK

XP_001156459.1 chimpancé -----RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNNKTKSQRARRKGGPKTHPGGEQKEGTEASLQIRGKKKEQRREIGSRNAECRGKK

XP_001093911.1 mono Rhesus -----RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNNKTKSQRARRKGGPKTHPGGEQKEGTEASLQIRGKKKEQRREIGSRNAECRGKK

NP_908941.1 ratón -----RSIRAQRHTDMPKTQKSPSLSTNNKTKLQRRRKGEKPKTHPEGEQEEVTEATRKIRGPREKRLG

AAA41214.1 rata -----RSIRAQRHTDMPKTQKSPSLSTNNKTKLQRRRKGEKPKTHPEGEQEEVTEATRKIRGPREKRLG

AAX61180.1 ratón -----RSIRAQRHTDMPKTQKSPSLSTNNKTKLQRRRKGS--TFEEHK

SEC ID NO

135

Mayoría

--

--

Ed 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

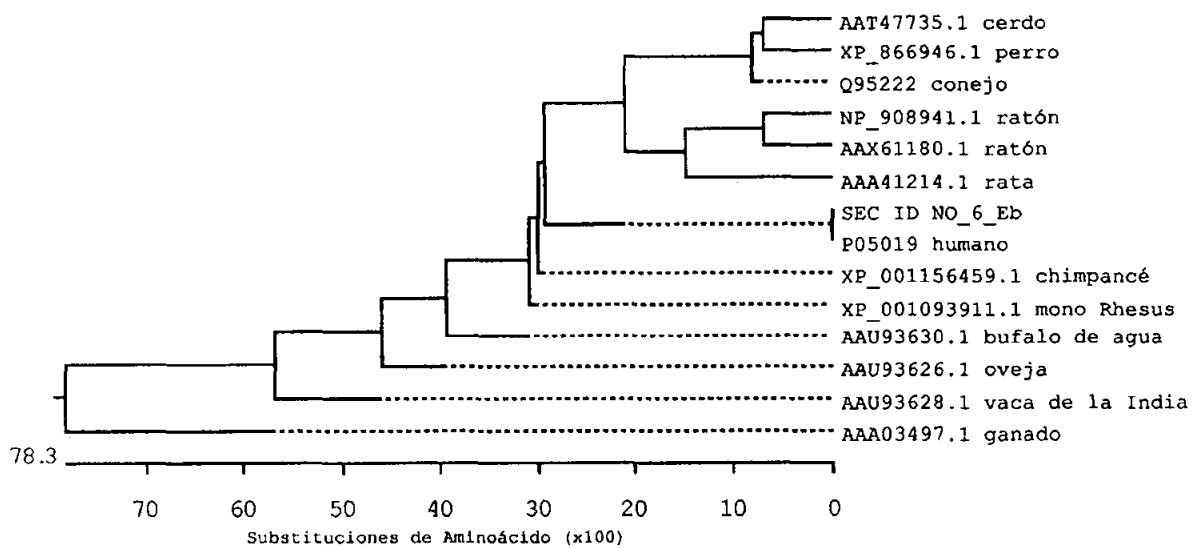
NP_908941.1 ratón 145

AAA41214.1 rata 146

AAX61180.1 ratón 147

14/20

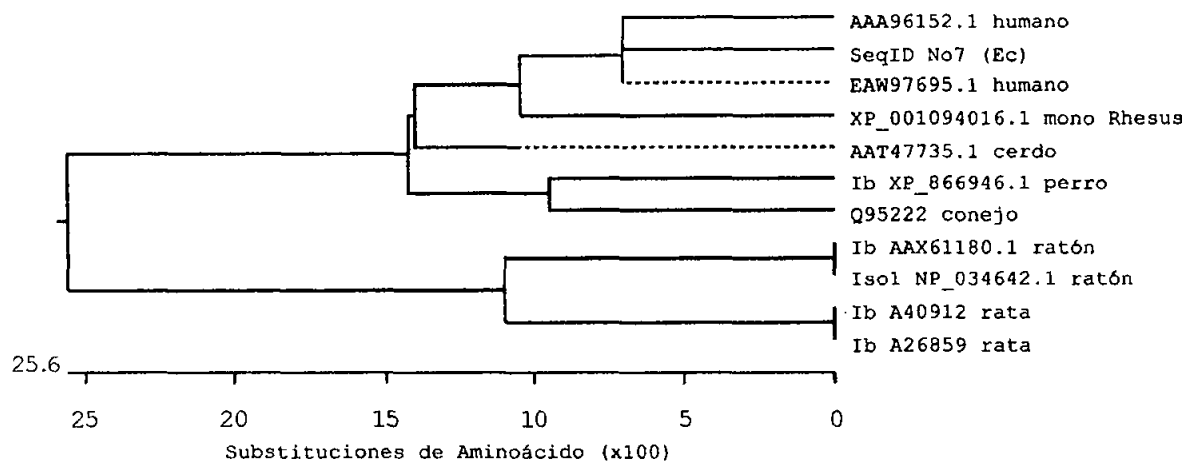
FIG. 9B



1

	RSVRAQRHTDMPKTKYQPPSTNKKTKSQRRRKGSTFEEH	SEC ID NO
Mayoria	-----+-----+-----+-----+ 10 20 30 40 -----+-----+-----+-----+	148
Ec humano	RSVRAQRHTDMPKTKYQPPSTNKNKTSQRR-KGSTFEERK	4
EAW97695.1 humano	RSVRAQRHTDMPKTKYQPPSTNKNKTSQRR-KGSTFEER	149
AAA96152.1 humano	RSVRAQRHTDMPKTKYQPPSTNKNKTSQRR-KGSTFEER	149
AAT47735.1 cerdo	RSVRAQRHTDMPKAKQYQPPSTNKKTKSQRRRKGSTFEEH	150
Ib XP_866946.1 perro	RSVRAQRHTDMPKAKQYHPPSTTKRMKSQRRRKGSTFEEC	151
Q95222 conejo	RSVRAQRHTDMPKTKYQPPSTNKKMKSQRRRKGSTFEEH	152
XP_001094016.1 mono Rhesus	RSVRAQRHTDMPKTKYQPPSTNKNKTSQRRRKGSTFEER	153
Ib AAX61180.1 ratón	RSIRAQRHTDMPKTKQSPSLSTNKKTKLQRRRKGSTFEEH	154
Isol NP_034642.1 ratón	RSIRAQRHTDMPKTKQSPSLSTNKKTKLQRRRKGSTFEEH	154
Ib A40912 rata	RSIRAQRHTDMPKTKQSPQLSTHKKRKLQRRRKGSTLEE	155
Ib A26859 rata	RSIRAQRHTDMPKTKQSPQLSTHKKRKLQRRRKGSTLEE	155

FIG. 10B



17/20

FIG. 11A

Mayoría

AYRPSETLCCGSELVDTLQFVCGDRGFYFS-----RPAS-RVNRRS--RGIVECCFRSCDLALLETYCATPAK
-----+-----+-----+-----+-----+-----
 10 20 30 40 50 60
-----+-----+-----+-----+-----+-----

IGF-2 humano AYRPSETLCCGSELVDTLQFVCGDRGFYFSR-----AS---RVSRSS--RGIVECCFRSCDLALLETYCATPAK
NP_000603.1 humano AYRPSETLCCGSELVDTLQFVCGDRGFYFSR-----AS---RVSRSS--RGIVECCFRSCDLALLETYCATPAK
NP_999048.1 cerdo AYRPSETLCCGSELVDTLQFVCGDRGFYFS-----RPAS-RVNRRS--RGIVECCFRSCDLALLETYCATPAK
NP_776512.2 ganado AYRPSETLCCGSELVDTLQFVCGDRGFYFS-----RPSS-RINRRS--RGIVECCFRSCDLALLETYCATPAK
NP_001009311.1 oveja AYRPSETLCCGSELVDTLQFVCGDRGFYFS-----RPAS-RVTRSS--RGIVECCFRSCDLALLETYCATPAK
Iso1 XP_540785.2 perro AYRPSETLCCGSELVDTLQFVCGDRGFYFS-----RPAS-RVTRSS--RGIVECCFRSCDLALLETYCATPAK
Iso2 XP_851137.1 perro AYRPSETLCCGSELVDTLQFVCGDRGFYFS-----SRPAS-RINRRS--RGIVECCFRSCDLALLETYCATPAK
Iso3 XP_863200.1 perro AYRPSETLCCGSELVDTLQFVCGDRGFYFSDAALLPPVGLPGRRP-RVTRSS--RGIVECCFRSCDLALLETYCATPAK
XP_421026.2 ave roja selvática AYGTAETLCCGSELVDTLQFVCGDRGFYFS-----RPVG-RNNRRN--RGIVECCFRSCDLALLETYCAKSVK
NP_113699.1 rata AYRPSETLCCGSELVDTLQFVCSDRGFYFS-----RPSS-RANRRS--RGIVECCFRSCDLALLETYCATPAK
NP_034644.1 ratón AYGGETLCCGSELVDTLQFVCGDRGFYFS-----RPSS-RANRRS--RGIVECCFRSCDLALLETYCATPAK
XP_001153640.1 chimpancé AYRPSETLCCGSELVDTLQFVCGDRGFYFSKA-----STPAAFPIITRLP---RRVGRCCRCGGCPADLRDASAIFPRR
Iso1 XP_001338042.1 pez zebra EVASAEITLCCGSELVDALQFVCEDRGFYFS-----RPTSRSNSRRSQNRGIVECCFFSNCLALLEQYCAKPAK
Iso2a NP_001001815.1 pez zebra EVASAEITLCCGSELVDALQFVCEDRGFYFS-----RPTSRSNSRRSQNRGIVECCFFSNCLALLEQYCAKPAK
Iso2b NP_571508.1 pez zebra NVTAGETLCCGSELVDTLQFVCGEDGYIS-----RPN-RSNSRRPO-RGIVECCFRSCDLHLLQQYCAKPVK

Mayoría

SERDVSTP-----PTVLDPDNFPYPVGKFFQYDTW-KQSQRLLRGLPALLRARRGRMLAKEAFREAKR-HRPLI
-----+-----+-----+-----+-----+-----
 70 80 90 100 110 120 130
-----+-----+-----+-----+-----+-----

IGF-2 humano SERDVSTP-----PTVLDPDNFPYPVGKFFQYDTW-KQSQRLLRGLPALLRARRGHVLAKEAFREAKR-HRPLI
NP_000603.1 humano SERDVSTP-----PTVLDPDNFPYPVGKFFQYDTW-KQSQRLLRGLPALLRARRGHVLAKEAFREAKR-HRPLI
NP_999048.1 cerdo SERDVSTP-----PTVLDPDNFPYPVGKFFQYDTW-KQSQRLLRGLPALLRARRGRMLAKEAFREAKR-HRPLI
NP_776512.2 ganado SERDVSTP-----PTVLDPDNFPYPVGKFFQYDTW-KQSQRLLRGLPALLRARRGRMLAKEAFREAKR-HRPLI
NP_001009311.1 oveja SERDVSTP-----PTVLDPDNFPYPVGKFFQYDTW-KQSQRLLRGLPALLRARRGRMLAKEAFREAKR-HRPLI
Iso1 XP_540785.2 perro SERDVSTP-----PTVLDPDNFPYPVGKFFQYDTW-KQSQRLLRGLPALLRARRGRMLAKEAFREAKR-HRPLI
Iso2 XP_851137.1 perro SERDVSTP-----PTVLDPDNFPYPVGKFFQYDTW-KQSQRLLRGLPALLRARRGRMLAKEAFREAKR-HRPLI
Iso3 XP_863200.1 perro SERDVSTP-----PTVLDPDNFPYPVGKFFQYDTW-KQSQRLLRGLPALLRARRGRMLAKEAFREAKR-HRPLI
XP_421026.2 ave roja selvática SERDLSATSLAGL---PALNKESFQKPSPHAKYSKYNVWKKSSQLRQEVPGILRRARYRWQAFGLQAEEARAHMHPLI
NP_113699.1 rata SERDVSTS-----QAVLPDDFPYPVGKFFQYDTW-QSAGRLLRGLPALLRARRGRMLAKEAFREAKR-HRPLI
NP_034644.1 ratón SERDVSTS-----QAVLPDDFPYPVGKFFQYDTW-QSAGRLLRGLPALLRARRGRMLAKEAFREAKR-HRPLI
NP_001153640.1 chimpancé ESRHLITS-----PFPSQDNFPYPVGKFFQYDTW-KQSQRLLRGLPALLRARRGRMLAKEAFREAKR-HRPLI
Iso1 XP_001338042.1 pez zebra SERDVSATSLQVI PVMPALKQEVPRKHVTVKYSKYDVWQRKAARLRGIIPAILRAKKFRROAERIKAQEQLLH-HRPLI
Iso2a NP_001001815.1 pez zebra SERDVSATSLQVI PVMPALKQEVPRKHVTVKYSKYDVWQRKAARLRGIIPAILRAKKFRROAERIKAQEQLLH-HRPLI
Iso2b NP_571508.1 pez zebra SERDVSSTLSQVFVPVSQALHKDT----INVKYSKYEVWQKAAQRLRGVPSILLARKFRROMEKIQDEEQTSF-HRPLI

SEC ID NO

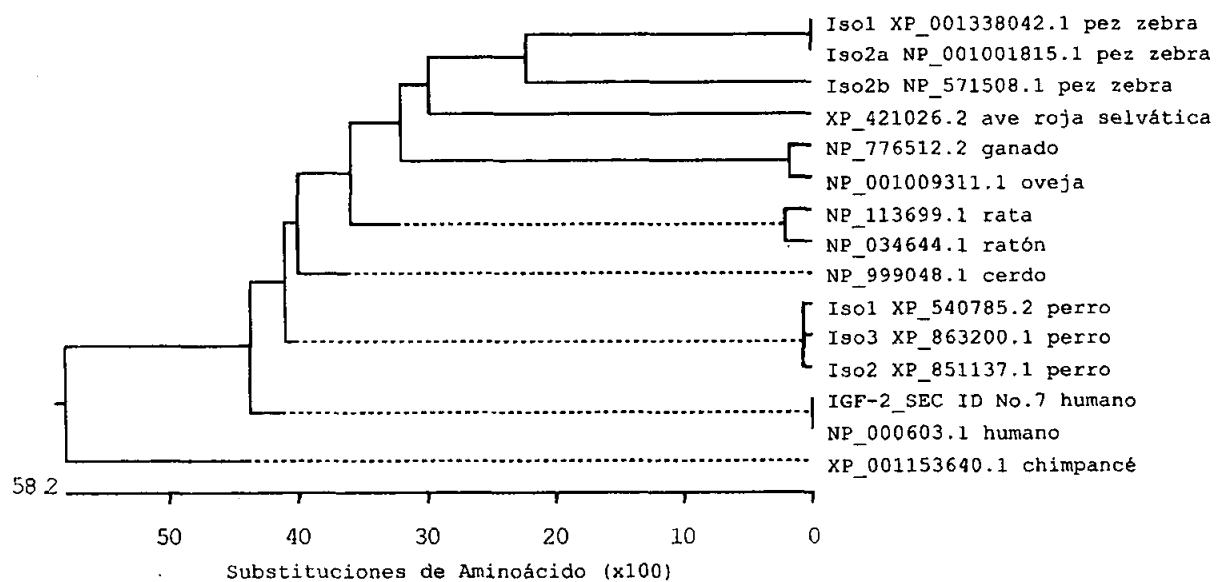
Mayoría

ALPTQDPA-HGGAPPEASSNRK--- 156
-----+-----+-----+-----+-----+-----
 140 150
-----+-----+-----+-----+-----+-----

IGF-2 humano ALPTQDPA-HGGAPPEMASNRKAYR 7
NP_000603.1 humano ALPTQDPA-HGGAPPEMASNRK 157
NP_999048.1 cerdo ARPTRDPAHGGASPEASGHRK 158
NP_776512.2 ganado ALPTQDPATHGGASSESSKD 159
NP_001009311.1 oveja ALPTQDPATHGGASSESSD 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 SLPSQHPP-APRASPEATGPQE 164
NP_113699.1 rata VLFPKOPA-HGGASSEMSNHQ 165
NP_034644.1 ratón VLFPKOPA-HGGASSEMSNHQ 166
XP_001153640.1 chimpancé ALPTQDPA-HGGAPPEMASNRK 167
Iso1 XP_001338042.1 pez zebra TLPSKLPP---ILLPTENYVSHK 168
Iso2a NP_001001815.1 pez zebra TLPSKLPP---ILLPTENYVSHK 168
Iso2b NP_571508.1 pez zebra TLPNQPA---IVPHVQISTSK 169

18/20

FIG. 11B



19/20

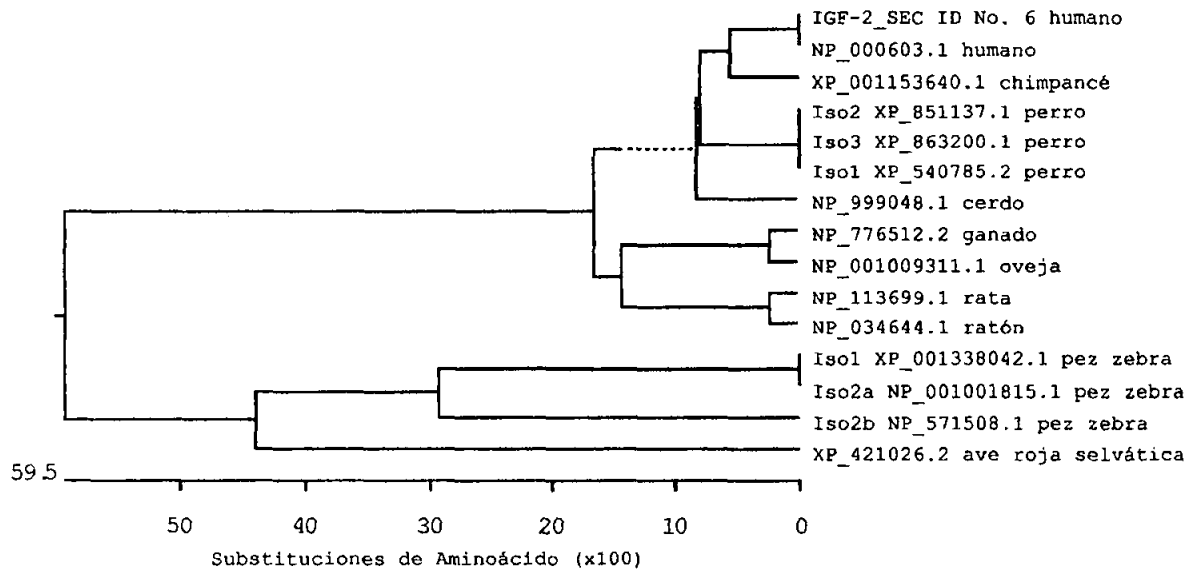
FIG. 12A

Mayoría	RDVSTP-----PTVLPDNFPYPVVGKFFQYDTW-KQSAQRLRRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR-HRPLIAL
	70 80 90 100 110 120 130
IGF-2 humano	RDVSTP-----PTVLPDNFPYPVVGKFFQYDTW-KQSTQRLRRGLPALLRARRGHVLAKELEAFREAKR-HRPLIAL
NP_000603.1 humano	RDVSTP-----PTVLPDNFPYPVVGKFFQYDTW-KQSTQRLRRGLPALLRARRGHVLAKELEAFREAKR-HRPLIAL
NP_999048.1 cerdo	RDVSTP-----PTVLPDNFPYPVVGKFFQYDTW-KQSAQRLRRGLPALLRARRGRTLAKELAVREAKR-HRPLTAR
NP_776512.2 ganado	RDVSAS-----TTVLDDDTAYPVGKFFQYDTW-KQSTQRLRRGLPAFLRARRGRTLAKELALREAKS-HRPLIAL
NP_001009311.1 oveja	RDVSAS-----TTVLDDDTAYPVGKFFQYDTW-KQSTQRLRRGLPAFLRARRGRTLAKELALREAKS-HRPLIAL
Iso1 XP_540785.2 perro	RDVSTP-----PTVLPDNFPYPVVGKFFQYDTW-KQSAQRLRRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR-HRPLIAL
Iso2 XP_851137.1 perro	RDVSTP-----PTVLPDNFPYPVVGKFFQYDTW-KQSAQRLRRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR-HRPLIAL
Iso3 XP_863200.1 perro	RDVSTP-----PTVLPDNFPYPVVGKFFQYDTW-KQSAQRLRRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR-HRPLIAL
XP_421026.2 ave roja selvática	RDLSATSLAGL---PALNKESFQKPSHAKYSKYNVWQKKSSQRLQREVPGILRRARYRWQAEGLQAEEAARAMHRPLISL
NP_113699.1 rata	RDVSTS-----QAVLPDDFPYPVVGKFFQYDTW-KQSAGRLRRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR-HRPLIVL
NP_034644.1 ratón	RDVSTS-----QAVLPDDFPYPVVGKFFQYDTW-KQSAGRLRRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR-HRPLIVL
XP_001153640.1 chimpancé	RHLLTS-----PFPSQDNFPYPVVGKFFQYDTW-KQSTQRLRRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKR-HRPLIAL
Iso1 XP_001338042.1 pez zebra	RDVSATSLQVI PVPALKQEVPRKHVTVKYSKYDVWQRKAAQRLRRGIPAILRAKKFRRQAEIRIKAQEQLLH-HRPLITL
Iso2a NP_001001815.1 pez zebra	RDVSATSLQVI PVPALKQEVPRKHVTVKYSKYDVWQRKAAQRLRRGIPAILRAKKFRRQAEIRIKAQEQLLH-HRPLITL
Iso2b NP_571508.1 pez zebra	RDVSSTSLQVFPVPSQALHKDT---INVKYSKYEVWQKAAQRLRRGVPSILLARKFRRQMEKIQDFEQTSF-HRPLMTL

SEC ID NO

Mayoría	PTQDPA-HGGASPEASSNRK 170
	140 150
IGF-2 humano	PTQDPA-HGGAPPEMASNRK 6
NP_000603.1 humano	PTQDPA-HGGAPPEMASNRK 6
NP_999048.1 cerdo	PTRDPAHGGASPEASGHRK 171
NP_776512.2 ganado	PTQDPATHGGASSEASSD 172
NP_001009311.1 oveja	PTQDPATHGGASSEASSD 173
Iso1 XP_540785.2 perro	PTHDPATHGGASPEASGNQK 174
Iso2 XP_851137.1 perro	PTHDPATHGGASPEASGNQK 174
Iso3 XP_863200.1 perro	PTHDPATHGGASPEASGNQK 174
XP_421026.2 ave roja selvática	PSQRPP-APRASPEATGPQE 175
NP_113699.1 rata	PPKDPA-HGGASSEMSSNHQ 176
NP_034644.1 ratón	PPKDPA-HGGASSEMSSNHQ 177
XP_001153640.1 chimpancé	PTQDPA-HGGAPPEMASNRK 178
Iso1 XP_001338042.1 pez Zebra	PSKLPP--ILLPTENYVSHK 179
Iso2a NP_001001815.1 pez Zebra	PSKLPP--ILLPTENYVSHK 179
Iso2b NP_571508.1 pez Zebra	PNRQPA--IVPHVQISTSRK 180

FIG. 12B



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
21 December 2007 (21.12.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/146689 A2

(51) International Patent Classification:
C07K 14/65 (2006.01)

Jonathan [US/US]; 341 Furnace Dock Road, #30, Cortlandt Manor, New York 10567 (US). **FORNARO, Mara** [IT/CH]; Eptingerstrasse 14, CH-4052 Basel (CH).

(21) International Application Number:

PCT/US2007/070468

(74) Agent: **FERRARO, Gregory D.**; Novartis, Corporate Intellectual Property, One Health Plaza, East Hanover, NJ 07936-1080 (US).

(22) International Filing Date: 6 June 2007 (06.06.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/812,349 9 June 2006 (09.06.2006) US
60/862,244 20 October 2006 (20.10.2006) US
60/897,187 24 January 2007 (24.01.2007) US

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(71) Applicant (for all designated States except US): **NOVARTIS AG** [CH/CH]; Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel (CH).

(71) Applicant (for AT only): **NOVARTIS PHARMA GmbH** [AT/AT]; Brunner Strasse 59, A-1230 Vienna (AT).

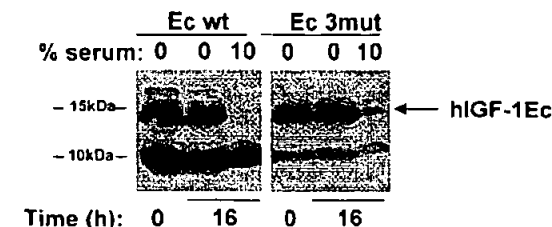
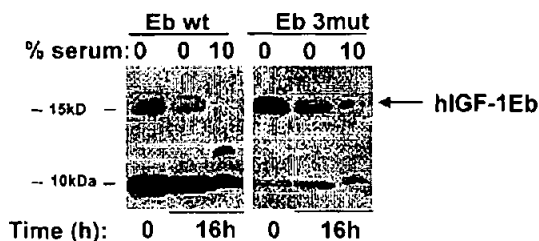
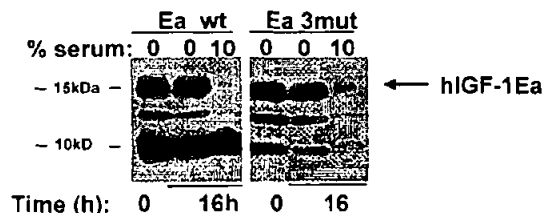
(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **GLASS, David**

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,

[Continued on next page]

(54) Title: STABILIZED INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR POLYPEPTIDES



(57) Abstract: The invention relates to stabilized polypeptides having an IGF-1 or IGF-2 sequence and an E-peptide sequence, where the natural physiological cleavage of the E-peptide from the IGF is prevented.

WO 2007/146689 A2



ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

198

International application No

PCT/US2007/070468

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/30 C07K14/65

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DUGUAY STEPHEN J ET AL: "Processing of wild-type and mutant proinsulin-like growth factor-IA by subtilisin-related proprotein convertases" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 10, 1997, pages 6663-6670, XP009094808 ISSN: 0021-9258 page 6663 - page 6664; figure 1; tables 1,2 ----- -/--	1-3,5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 January 2008

Date of mailing of the international search report

27/02/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Paresce, Donata

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/070468

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DUGUAY STEPHEN J ET AL: "Mutational analysis of the insulin-like growth factor I prohormone processing site" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 29, 1995, pages 17566-17574, XP009094810 ISSN: 0021-9258 page 17566; table 1 -----	1-3,5
X	DUGUAY STEPHEN J ET AL: "Post-translational processing of the insulin-like growth factor-2 precursor: Analysis of O-glycosylation and endoproteolysis" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 273, no. 29, 17 July 1998 (1998-07-17), pages 18443-18451, XP002159286 ISSN: 0021-9258 page 18445 - page 18448; figures 1,6 -----	23,24
A	BRYANT K J ET AL: "Design and characterisation of long-R3-insulin-like growth factor-I muteins which show resistance to pepsin digestion." GROWTH FACTORS (CHUR, SWITZERLAND) 1996, vol. 13, no. 3-4, 1996, pages 261-272, XP009094816 ISSN: 0897-7194 the whole document -----	1-26
A	WO 01/36483 A (UNIV LONDON [GB]; GOLDSPIK GEOFFREY [GB]; JOHNSON IAN [GB]) 25 May 2001 (2001-05-25) page 7 page 14 -----	1-26
A	WO 97/33997 A (ROYAL FREE HOSP SCHOOL MED [GB]; GOLDSPIK GEOFFREY [GB]) 18 September 1997 (1997-09-18) page 2 - page 4 -----	1-26
P,X	WO 2006/097682 A (UCL BIOMEDICA PLC [GB]; S THE BOARD OF TRUSTEES OF THE [US]; GOLDSPIK) 21 September 2006 (2006-09-21) page 9 - page 12 page 15 - page 22 -----	1-26
P,X	WO 2006/074390 A (REGENERON PHARMA [US]; GLASS DAVID J [US]; YANCOPOULOS GEORGE D [US];) 13 July 2006 (2006-07-13) page 1 - page 2 -----	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2007/070468

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0136483	A	25-05-2001	EP 1235858 A1	04-09-2002
			JP 2003520784 T	08-07-2003
			US 2006058239 A1	16-03-2006
WO 9733997	A	18-09-1997	AT 326534 T	15-06-2006
			DE 69735883 T2	19-04-2007
			DK 0894136 T3	18-09-2006
			EP 0894136 A1	03-02-1999
			ES 2265649 T3	16-02-2007
			JP 2000506729 T	06-06-2000
			PT 894136 T	31-10-2006
			US 6221842 B1	24-04-2001
WO 2006097682	A	21-09-2006	NONE	
WO 2006074390	A	13-07-2006	AU 2006203882 A1	13-07-2006
			CA 2594023 A1	13-07-2006
			EP 1833847 A2	19-09-2007