



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 353 674**

⑤1 Int. Cl.:

C07K 14/71 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **06779123 .6**

⑨6 Fecha de presentación : **11.08.2006**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1945663**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.2008**

⑤4 Título: **Factores de unión del factor II de crecimiento similar a la insulina (IGF-II).**

③0 Prioridad: **15.08.2005 GB 0516722**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.03.2011

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.03.2011

⑦3 Titular/es: **Cancer Research Technology Limited**
Sardinia House Sardinia Street
London, Greater London WC2A 3NL, GB

⑦2 Inventor/es: **Zaccheo, Oliver;**
Prince, Stuart y
Hassan, Andrew

⑦4 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

DESCRIPCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a materiales para uso en el secuestro del factor II de crecimiento similar a la insulina (IGF-II), por ejemplo, en el tratamiento de cáncer.

5 **[0002]** El receptor de manosa 6-fosfato independiente de cationes de mamífero/factor II de crecimiento similar a la insulina (abreviado IGF2R) es una proteína de membrana integral de tipo I y lectina de tipo P, con múltiples funciones atribuibles a su amplia variedad de ligandos conocidos (1-3). La proteína glicosilada de 270 kDa está constituida por una secuencia señal del extremo N (aminoácidos 1-44),
 10 15 dominios de repetición extracitoplásmicos homólogos (aminoácidos 45-2313), una región transmembrana (aminoácidos 2314-2336) y un dominio citoplásmico del extremo C (aminoácidos 2337-2499) (4,5). Sus 15 dominios repetidos tienen cada uno 147 aminoácidos de longitud y muestran similitud significativa en secuencia de aminoácidos y distribución de disulfuro entre sí (16-38% de identidad) y con el único
 15 dominio extracitoplásmico del receptor de manosa 6-fosfato dependiente de cationes (CD-MPR) (14-28% de identidad) (5). Ahora se han resuelto las estructuras cristalinas para los dominios 1, 2, 3 (6) y 11 (7) y muestran que cada dominio tiene una topología similar que está constituida por un barril β de 9 cadenas aplanadas, compartida con CD-MPR y avidina (8), sugiriendo que los 15 dominios extracitoplásmicos representan
 20 15 unidades estructurales homólogas. La función principal de IGF2R y CD-MPR son la liberación de hidrolasas ácidas recientemente formadas, de las que hay 50, al lisosoma mediante la unión a sus restos marcados con manosa 6-fosfato (M6P) (3). El IGF2R también procesa varios otros ligandos marcados con M6P y no M6P. Los dominios 3, 9 y recientemente 5 (9) se han identificado como los sitios de unión para
 25 las proteínas manosiladas tales como TGF- β latente (10), proliferina y granzima B y la proteasa catépsina. Los estudios de mutagénesis sitiodirigida han establecido los restos de interacción crítica dentro de los dominios 3 y 9 para manosa 6-fosfato (11, 12). De los ligandos no manosilados actualmente identificados (IGF-II, ácido retinoico, receptor del activador de plasminógeno de tipo urocinasa y plasminógeno), el IGF-II
 30 ha sido con mucho el mejor estudiado, estando el sitio de unión localizado en el dominio 11 (13-15).

[0003] El IGF-II (7,5 kDa) es una hormona pequeña de péptido mitogénico que funciona principalmente durante el crecimiento embrionario en el que su actividad está estrechamente regulada, pero también está frecuentemente desregulada en tumores
 35 (16-18). Al igual que IGF-I, IGF-II ejerce su efecto mitogénico predominantemente

señalizando mediante el IGF1R, conduciendo a la activación de tirosina cinasa y a la estimulación tanto de la cinasa de proteína activada por mitógeno (MAP) como de la cascada de señalización de PKB/AKT. Las dianas en la dirección 3' incluyen los factores de transcripción FOXO, GSK3 β , MDM2 y mTOR que conducen a la

5 regulación por incremento de señales pro-crecimiento y anti-apoptóticas (19). En mamíferos, la estrecha regulación de la actividad de IGF-II se logra por la unión de alta afinidad a seis proteínas de unión a IGF (IGFBP 1-6) y por la unión a IGF2R en la superficie celular, conduciendo a la internalización de IGFII y posterior degradación dentro del lisosoma (20-22). Los estudios de RMN previos han establecido la

10 estructura de IGF-II maduro (23,24) y se ha usado mutagénesis sitiodirigida para identificar los restos F48, R49, S50, A54, L55 como críticos para la interacción con IGF2R (25,26). Aunque el IGF-II está relativamente estructuralmente conservado, el sitio de unión de IGF-II de IGF2R está presente sólo en especies de mamíferos en las que la regulación del crecimiento embrionario y placentario de IGF-II por IGF2R

15 también implica el sellado recíproco de los genes que codifican estas proteínas (27). La alteración de *Igf2* en el ratón produce un crecimiento reducido (60% de natural) a partir del día embrionario 9-11 (28, 29), mientras que los ratones con alteración de *Igf2r* presentan crecimiento fetal excesivo e hiperplasia cardiaca mortal (30, 31). El crecimiento y el fenotipo de letalidad perinatal se rescata cuando *Igf2* también se

20 altera, sugiriendo que la función crítica del principio de IGF2R es la regulación de IGF-II (32). Más recientemente se ha destacado la interacción funcional específica entre IGF-II y IGF2R y su función crítica en el desarrollo, ya que los embriones partenogenéticos con expresión del alelo materno *Igf2* pueden conducir a desarrollo normal de ratones vivos con dos genomas maternos, y la supresión epigenética de *Igf2r*

25 puede representar síndrome de la cría grande tras clonación de células somáticas (33, 34).

[0004] Los dominios de unión de IGF-II divergen en monotremas, marsupiales y mamíferos euterios (83).

[0005] La regulación anómala de la actividad de IGF-II se ha relacionado

30 repetidamente como una característica común de tumores tanto en ratón como en ser humano (35). Por ejemplo, el aumento de la expresión de IGF-II por pérdida de sellado (LOI) se ha descrito en una plétora de tipos de tumores que incluyen tumor de Wilms (36), carcinoma colorrectal (37), rabdomiosarcoma (38), sarcoma de Ewing (39), carcinoma cervical (40), carcinoma de pulmón (41) y feocromocitoma (42). La LOI de

35 *IGF2* está particularmente asociada a una disminución del riesgo relativo de desarrollar

carcinoma colorrectal (43, 44). El *IGF2R* también actúa de supresor tumoral ya que la pérdida de heterocigosidad del receptor ha sido detectada en varios tipos de tumores que incluyen tumores de hígado, pulmón y cabeza y cuello (45-48). Además, se ha caracterizado la pérdida de mutaciones de la función del receptor (49) y la

5 sobreexpresión de *IGF2R* produce una disminución del crecimiento y un aumento de apoptosis en modelos de células tumorales (50-53). La estructura cristalina del dominio 11 de *IGF2R* se ha resuelto a una resolución de 1,4 Å usando dispersión anómala de azufre (7), y ha sido confirmada por otros (54). La estructura del dominio 11 de *IGF2R* revela dos sitios hidrófobos sobre la superficie del dominio 11,

10 identificando el primero el posible sitio de unión de IGF-II dentro de la hendidura de la estructura de barril β, espacialmente análogo al sitio de unión de azúcar hidrófilo del CD-MPR, y un segundo que participa en las interacciones dominio-dominio (7, 55). El sitio de unión de IGF-II se forma por las cadenas β A, B, C y D y los bucles AB, CD y FG, confiriendo bucles más cortos una cavidad de unión más superficial que la del CD-

15 MPR. Los restos Y1542, S1543, G1546 (bucle AB), F1567, G1568, T1570, I1572 (bucle CD), S1596, P1597, P1599 (bucle FG) se han identificado como que están significativamente expuestos a disolventes y, por tanto, posiblemente participan en la interacción de IGF-II (7). Previamente, Linnell y col. cuantificaron la interacción de IGF-II con el dominio de *IGF2R* 10-13 expresado en una proteína quimérica de rata

20 CD4 (dominios 3 y 4) usando resonancia de plasmones superficiales (SPR), y se confirmó la actividad potenciadora del dominio 13 con respecto a la interacción del dominio 11-IGF-II (15, 56).

[0006] Los presentes inventores han identificado mutantes novedosos del dominio de unión de IGF-II del receptor del factor 2 de crecimiento similar a la insulina

25 (IGF2R) que tienen afinidad de unión potenciada por IGF-II con respecto al dominio de unión de IGF-II natural, pero no muestran ninguna reducción en la especificidad.

[0007] Un aspecto de la invención proporciona un dominio de unión de IGF-II que está constituido por la secuencia de aminoácidos de los restos 1511 a 1650 del *IGF2R* humano con 50 o menos restos mutados o alterados,

30 en el que E1544 está sustituido por un resto de aminoácido no ácido que es distinto de N, P o G y; en el que el dominio de unión de IGF-II se une a IGF-II con aumento de la afinidad con respecto al dominio de unión de IGF-II natural (restos 1511 a 1650) de *IGF2R* humano, por ejemplo, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces o 7 veces o más de afinidad. La unión del dominio de unión de IGF-II mutante a IGF-II

35 puede tener, por ejemplo, un aumento de la constante de asociación (k_{as}) y/o una

reducción de la constante de disociación (k_{dis}) con respecto al dominio de unión de IGF-II natural.

[0008] Preferentemente, el dominio de unión de IGF-II muestra una especificidad de unión que es idéntica o similar al dominio de unión de IGF-II natural (restos 1511 a 1650) de IGF2R humano, es decir, muestra no unión o sustancialmente no unión a IGF-I.

[0009] El IGF2R humano tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 y la entrada en la base de datos NP_000867.1 GI: 4504611 y está codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 2 y la entrada en la base de datos (NM_000876.1 GI: 4504610). La secuencia de aminoácidos de los restos 1511 a 1650 de IGF2R humano se muestra en SEQ ID NO: 3. El resto E1544 en la secuencia de IGF2R humano se corresponde con el resto E34 de SEQ ID NO: 3. Excepto cuando se establezca de otro modo, los números de los restos explicados en este documento se refieren a la posición del resto en la secuencia de IGF2R humano mostrada en SEQ ID NO: 1.

[0010] Un resto identificado por su posición en la secuencia de IGF2R humano puede identificarse fácilmente en una secuencia de IGF2R truncada o variante, tal como la secuencia del dominio de unión de IGF-II mostrada en SEQ ID NO: 3, o variantes de la misma, por ejemplo, usando alineamiento de secuencias y técnicas de análisis convencionales.

[0011] Aparte de la sustitución de un resto de aminoácido no ácido que es distinto de N, P o G en E1544, un dominio de unión de IGF-II descrito en este documento puede tener 50 o menos resto de aminoácidos alterados con respecto a la secuencia de aminoácidos natural de los restos 1511 a 1650 de IGF2R humano, preferentemente 45 o menos, 40 o menos, 30 o menos, 10 o menos, 5 o menos o 3 o menos.

[0012] Un resto de aminoácido en la secuencia de aminoácidos natural puede estar alterado o mutado por inserción, delección o sustitución de uno o más aminoácidos. Tales alteraciones pueden producirse por uno o más de adición, inserción, delección o sustitución de uno o más nucleótidos en el ácido nucleico codificante.

[0013] En algunas realizaciones, los restos F1567 y I1572 no están mutados, más preferentemente, los restos F1567, T1570 y I1572 no están mutados, y lo más preferentemente, los restos F1567, T1570, I1572, P1597 y P1599 no están mutados, es decir, un dominio de unión de IGF-II descrito en este documento comprende F1567, T1570, I1572, P1597 y P1599 (que se corresponden con los restos F57, T60, I62, P87 y P89 de SEQ ID NO: 3, respectivamente). Preferentemente, el dominio de IGF-II

mutante retiene la estructura de barril beta del dominio natural.

[0014] En algunas realizaciones preferidas, el dominio de unión de IGF-II puede estar constituido por la secuencia de aminoácidos de los restos 1511 a 1650 de IGF2R humano con el resto E1544 mutado por sustitución de un resto de aminoácido no ácido
5 que es distinto de N, P o G.

[0015] El dominio de unión de IGF-II mutante puede compartir al menos el 50% de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos natural de los restos 1511 a 1650 de IGF2R humano, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%
10 o al menos el 98%. La secuencia puede compartir al menos el 60% de similitud con la secuencia natural, al menos el 70% de similitud, al menos el 80% de similitud, al menos el 90% de similitud, al menos el 95% de similitud o al menos el 99% de similitud.

[0016] La similitud e identidad de secuencias se definen comúnmente con
15 referencia al algoritmo GAP (paquete Wisconsin GCG, Accelrys Inc, San Diego USA). GAP usa el algoritmo de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias completas que maximiza el número de emparejamientos y minimiza el número de huecos. Generalmente se usan parámetros por defecto, con una penalización por creación de hueco = 12 y penalidad por extensión de hueco = 4. El uso de GAP puede
20 preferirse, pero pueden usarse otros algoritmos, por ejemplo, BLAST (que usa el procedimiento de Altschul y col. (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410), FASTA (que usa el procedimiento de Pearson y Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448), o el algoritmo de Smith-Waterman (Smith y Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197), o el programa TBLASTN, de Altschul y col. (1990), anteriormente, empleando
25 generalmente parámetros por defecto. En particular, puede usarse el algoritmo de psi-Blast (Nucl. Acids Res. (1997) 25 3389-3402). La identidad y la similitud de secuencias también puede determinarse usando el software GenomequestTM (Gene-IT, Worcester, MA, EE.UU.).

[0017] Las comparaciones de secuencias se hacen preferentemente a lo largo de la
30 longitud completa de la secuencia relevante descrita en este documento.

[0018] La similitud permite "variación conservativa", es decir, sustitución de un resto hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, o la sustitución de un resto polar por otro tal como arginina por lisina, ácido glutámico por aspártico o glutamina por asparagina.

35 **[0019]** En el dominio de unión de IGF-II mutante, el resto E1544 está sustituido

por un resto de aminoácido no ácido que es distinto de N, P o G, es decir, el dominio de unión de IGF-II comprende un aminoácido distinto de E, D, N, P o G en la posición 1544 (posición 34 en SEQ ID NO: 3).

[0020] Por ejemplo, el resto E1544 puede estar sustituido por un resto alifático tal como A, V, L o I, puede usarse un resto básico tal como K, R o H, un resto que contiene azufre tal como C o M, o un resto hidroxilo tal como S o T. Más preferentemente, E1544 puede estar sustituido por un resto polar tal como S, o un resto básico tal como K, R o H. Por ejemplo, el dominio de unión de IGF-II puede comprender K, R, H o S en la posición 1544 (posición 34 en SEQ ID NO: 3). Lo más preferentemente, E1544 está sustituido por R o K.

[0021] Un dominio de unión de IGF-II como se describe en este documento puede comprender uno o más aminoácidos no naturales, aminoácidos modificados o d-aminoácidos. El uso de tales aminoácidos es muy conocido para aquellos expertos en la materia.

[0022] Un dominio de unión de IGF-II mutante como se ha descrito anteriormente puede estar comprendido dentro de un polipéptido.

[0023] En algunas realizaciones, el dominio de unión de IGF-II mutante puede ligarse a secuencias de aminoácidos que no están ligadas al dominio de unión de IGF-II natural (dominio 11) de IGF2R en la naturaleza (es decir, secuencias heterólogas).

[0024] En algunas realizaciones, el polipéptido puede comprender múltiples dominios de unión de IGF-II que incluyen, por ejemplo, uno o más dominios de unión de IGF2 mutantes como se describen en este documento. Un polipéptido puede comprender dos, tres, cuatro o más dominios de unión de IGF-II. La presencia de múltiples dominios puede aumentar la capacidad del polipéptido para unirse a IGF-II. Los dominios pueden ser idénticos (es decir, copias) o pueden ser no idénticos (es decir, pueden diferenciarse en uno o más restos de aminoácidos).

[0025] Los dominios de unión de IGF-II pueden estar directamente conectados sin enlazantes o pueden ligarse mediante secuencias de aminoácidos de IGF2R humano, secuencias de aminoácidos sintéticos, moléculas orgánicas sintéticas o polipéptidos que se multimerizan o ensamblan en estructuras poliméricas. En algunas realizaciones, los dominios de unión de IGF2 pueden ligarse mediante marcas de biotina-estreptavidina.

[0026] El polipéptido puede comprender adicionalmente una o más secuencias de aminoácidos adicionales al uno o más dominios de unión de IGF-II. Por ejemplo, el polipéptido de unión de IGF-II puede comprender uno o más dominios adicionales.

Los dominios adicionales pueden incluir dominios de IGF2R humano tales como el dominio 13 (restos 1800 a 1991 de la secuencia de IGF2R) y el dominio 12 (restos 1651 a 1799 de la secuencia de IGF2R) o dominios de otros polipéptidos (es decir, dominios heterólogos) que mejoran las propiedades de estabilidad, farmacocinética, elección de diana, afinidad, purificación y producción del polipéptido, tal como un dominio Fc de inmunoglobulina que confiere estabilidad/parámetros farmacocinéticos mejorados en fluido biológico.

[0027] En algunas realizaciones, el polipéptido puede comprender un dominio Fc de inmunoglobulina. Los dominios Fc de inmunoglobulina adecuados son muy conocidos en la técnica e incluyen el dominio Fc de IgG1 humana. El dominio Fc de inmunoglobulina puede localizarse en el extremo N o el extremo C del dominio de unión de IGF-II.

[0028] El dominio Fc de inmunoglobulina y el dominio de unión de IGF-II pueden unirse directamente o mediante una molécula enlazante, por ejemplo, un péptido enlazante.

[0029] Ejemplos de polipéptidos que comprenden un dominio Fc de inmunoglobulina se muestran en la Figura 8.

[0030] En realizaciones preferidas, el polipéptido no está comprendido dentro de un polipéptido de IGF2R de longitud completa.

[0031] En algunas realizaciones, el polipéptido puede comprender una marca de afinidad que puede ser, por ejemplo, útil para purificación. Una marca de afinidad es una secuencia de péptidos heteróloga que forma un miembro de un par de unión específica. Los polipéptidos que contienen la marca pueden purificarse por la unión del otro miembro del par de unión específica al polipéptido, por ejemplo, en una columna de afinidad. Por ejemplo, la secuencia de la marca puede formar un epítipo que está unido por una molécula de anticuerpo.

[0032] Las marcas de afinidad adecuadas incluyen, por ejemplo, glutatión-S-transferasa (GST), dominio de unión a maltosa (MBD), MRGS(H)₆, DYKDDDDK (FLAGTM), T7-, S- (KETAAAKFERQHMDs), poli-Arg (R₅₋₆), poli-His (H₂₋₁₀), poli-Cys (C₄) poli-Phe(F₁₁) poli-Asp(D₅₋₁₆), marca de estreptavidina II (WSHPQFEK), c-myc (EQKLISEEDL), marca de gripe-HA (Murray, P. J. y col. (1995) Anal Biochem 229, 170-9), marca de Glu-Glu-Phe (Stammers, D. K. y col. (1991) FEBS Lett 283, 298-302), Tag.100 (Qiagen; marca de 12 aa derivada de MAP cinasa 2 de mamífero), marca Cruz 09TM (MKAEFRRQESDR, Santa Cruz Biotechnology Inc.) y marca Cruz 22TM (MRDALDRLDRLA, Santa Cruz Biotechnology Inc.). Las secuencias de marcas

conocidas se revisan en Terpe (2003) Appl. Microbiol. Biotechnol. 60 523-533.

[0033] En realizaciones preferidas puede usarse una marca de poli-His tal como (H)₆ o MRGS(H)₆.

[0034] La secuencia de la marca de afinidad puede eliminarse después de la
5 purificación, por ejemplo, usando proteasas específicas de sitio.

[0035] En algunas realizaciones, la proteína puede acoplarse a un péptido conductor apropiado para dirigir la secreción del polipéptido de fusión a partir de célula en el medio de cultivo. En la técnica se conoce una gama de péptidos conductores de señales adecuados. El péptido conductor de señales puede ser
10 heterólogo al dominio de unión a IGF, es decir, puede ser una secuencia señal de no IGF2R. Por ejemplo, puede emplearse una señal de secreción de factor α o secuencia señal de BiP. Preferentemente, el péptido señal se elimina por procesamiento postraduccionnal después de la expresión del polipéptido.

[0036] Preferentemente, el polipéptido que comprende o que está constituido por
15 uno o más dominios de unión de IGF-II es soluble. Un polipéptido soluble no se asocia naturalmente a membranas después de la expresión y no forma agregados en disolución acuosa bajo condiciones fisiológicas. Un polipéptido soluble puede carecer, por ejemplo, de un dominio transmembrana.

[0037] Otro aspecto de la invención proporciona un ácido nucleico que codifica
20 un polipéptido que comprende o que está constituido por uno o más dominios de unión de IGF-II mutantes como se describen en este documento.

[0038] El ácido nucleico que codifica un polipéptido puede estar comprendido en un vector. Los vectores adecuados pueden elegirse o construirse, conteniendo secuencias reguladoras apropiadas que incluyen secuencias promotoras, fragmentos
25 terminadores, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según convenga. Preferentemente, el vector contiene secuencias reguladoras apropiadas para accionar la expresión del ácido nucleico en células de mamífero. Un vector también puede comprender secuencias tales como orígenes de replicación y marcadores de selección que permiten su selección y
30 replicación en huéspedes bacterianos tales como *E. coli*.

[0039] Los vectores pueden ser plásmidos, víricos, por ejemplo, fago, o fagémido, según convenga. Para más detalles véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3ª edición, Russell y col., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico,
35 por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis,

secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, se describen en detalle en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel y col. eds. John Wiley & Sons, 1992.

[0040] Un ácido nucleico o vector como se describe en este documento puede
5 introducirse en una célula hospedadora.

[0041] En la técnica se conoce una serie de células hospedadoras adecuadas para la producción de polipéptidos recombinantes. Las células hospedadoras adecuadas pueden incluir células procariotas, en particular bacterias tales como *E. coli*, y células eucariotas que incluyen células de mamíferos tales como CHO y líneas celulares
10 derivadas de CHO (células Lec), células HeLa, COS y HEK293, células de anfibio tales como oocitos de *Xenopus*, células de insecto tales como *Trichoplusia ni*, Sf9 y Sf21 y células de levadura tales como *Pichia pastoris*.

[0042] Las técnicas para la introducción de ácido nucleico en células están muy establecidas en la materia y puede emplearse cualquier técnica adecuada según las
15 circunstancias particulares. Para células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus u otros virus, por ejemplo, adenovirus, AAV, lentivirus o vaccinia. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación y
20 transfección usando bacteriófago.

[0043] Pueden usarse genes marcadores tales como genes con resistencia o sensibilidad a antibióticos en la identificación de clones que contienen ácido nucleico de interés, como es muy conocido en la técnica.

[0044] El ácido nucleico introducido puede estar sobre un vector
25 extracromosómico dentro de la célula o el ácido nucleico puede integrarse en el genoma de la célula hospedadora. La integración puede promoverse por la inclusión de secuencias dentro del ácido nucleico o vector que promueven la recombinación con el genoma, según técnicas convencionales.

[0045] La introducción puede ir seguida de la expresión del ácido nucleico para
30 producir el polipéptido codificado que comprende o que está constituido por uno o más dominios de unión de IGF2 mutantes. En algunas realizaciones, las células huésped (que pueden incluir células en realidad transformadas, aunque es más probable que las células sean descendientes de las células transformadas) pueden cultivarse *in vitro* en condiciones para la expresión del ácido nucleico de manera que se produzca el
35 polipéptido de unión de IGF2 codificado. Si se usa un promotor inducible, la expresión

puede requerir la activación del promotor inducible.

[0046] El polipéptido expresado que comprende o que está constituido por uno o más dominios de unión de IGF-II mutantes puede aislarse y/o purificarse, después de producirse. Esto puede lograrse usando cualquier procedimiento conveniente conocido en la técnica. Las técnicas para la purificación de polipéptidos recombinantes son muy conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, HPLC, FPLC o cromatografía de afinidad. En algunas realizaciones, la purificación puede realizarse usando una marca de afinidad sobre el polipéptido como se ha descrito anteriormente.

[0047] Los polipéptidos que comprenden o que están constituidos por uno o más dominios de unión de IGF2 mutantes que se producen como se describe pueden investigarse adicionalmente, por ejemplo, pueden determinarse las propiedades farmacológicas y/o actividad. Los procedimientos y medios de análisis de proteínas son muy conocidos en la técnica.

[0048] Otro aspecto de la invención proporciona un polipéptido que comprende o que está constituido por uno o más dominios de unión de IGF-II, un ácido nucleico o una célula huésped como se describe en este documento para uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia. Por ejemplo, el polipéptido que comprende un dominio de unión de IGF2, ácido nucleico o célula hospedadora como se describe en este documento puede usarse en un procedimiento de tratamiento de cáncer.

[0049] Otro aspecto de la invención proporciona el uso de un polipéptido que comprende o que está constituido por uno o más dominios de unión de IGF-II, un ácido nucleico o una célula hospedadora como se describe en este documento en la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de cáncer.

[0050] Los cánceres que pueden tratarse como se describe en este documento incluyen cánceres caracterizados por regulación por incremento de IGF-II, por ejemplo, cánceres colorrectales tales como adenoma intestinal y carcinoma colorrectal, cánceres cervicales tales como carcinoma cervical, cánceres de pulmón tales como carcinoma de pulmón, cánceres de riñón tales como tumor de Wilms, cánceres de músculo tales como rhabdomioma, cánceres óseos tales como sarcoma de Ewing, cánceres endocrinos tales como feocromocitoma, cánceres de hígado tales como carcinoma hepatocelular, tumores cerebrales tales como glioblastoma, cánceres de mama tales como cánceres inflamatorios de mama, cánceres gastrointestinales superiores tales como cáncer pancreático, cánceres hematológicos tales como mieloma, sarcomas de tejido blando tales como hemangiopericitoma y cánceres que producen

hipoglucemia relacionada con tumores relacionada con el aumento de niveles en circulación de IGF2 y/o expresan los genes de IGF-II a altos niveles.

[0051] Los polipéptidos como se describen en este documento también pueden ser útiles como agentes que eligen cáncer como diana para administrar otras moléculas anticancerosas a tumores, radiomarcas para detectar y tratar tumores y agentes sensibilizantes que sensibilizan tumores a otras terapias contra el cáncer que incluyen quimioterapia y radioterapia.

[0052] Mientras que un polipéptido que comprende o que está constituido por uno o más dominios de unión de IGF2, un ácido nucleico o una célula huésped como se describe en este documento puede administrarse solo, es preferible presentarlo como una composición farmacéutica (por ejemplo, formulación) que comprende el polipéptido, ácido nucleico o célula junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, adyuvantes, excipientes, diluyentes, cargas, tampones, estabilizadores, conservantes, lubricantes, u otros materiales muy conocidos para aquellos expertos en la materia y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos o profilácticos.

[0053] Por tanto, los procedimientos como se describen en este documento pueden comprender la etapa de formular un polipéptido que comprende o que está constituido por uno o más dominios de unión de IGF2, un ácido nucleico o una célula huésped como se describe en este documento con un vehículo, adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0054] El término "farmacéuticamente aceptable" como se usa en este documento se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que, dentro del alcance del juicio médico razonable, son adecuados para uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, humano) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación de beneficio/riesgo razonable. Cada vehículo, excipiente, etc., también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros componentes de formulación. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral o mediante inyección, por ejemplo, cutánea, subcutánea o intravenosa.

[0055] Las composiciones farmacéuticas para administración por vía oral pueden ser en comprimido, cápsula, polvo o forma líquida. Un comprimido puede incluir un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente incluyen un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina

fisiológica, dextrosa u otra disolución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

[0056] Para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el sitio de aflicción, el principio activo estará en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos de habilidad relevante en la materia pueden preparar bien disoluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer o inyección de Ringer con lactato. Pueden incluirse conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según se requiera.

[0057] Los vehículos, excipientes, etc., adecuados pueden encontrarse en textos farmacéuticos convencionales, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990.

[0058] Las composiciones y formulaciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en forma farmacéutica unitaria y pueden prepararse mediante cualquier procedimiento muy conocido en la técnica de la farmacia. Tales procedimientos incluyen la etapa de asociar el polipéptido de unión de IGF-II, ácido nucleico o célula huésped al vehículo que constituye uno o más componentes auxiliares. En general, las composiciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el compuesto activo a vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si fuera necesario, moldeando el producto.

[0059] Tanto si es un dominio de unión de IGF-II como un polipéptido, ácido nucleico o célula hospedadora según la presente invención que va a administrarse a un individuo, la administración es preferentemente en una "cantidad profilácticamente eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" (según sea el caso, aunque la profilaxis puede considerarse terapia), siendo esto suficiente para mostrar el beneficio al individuo. La cantidad real administrada, y la velocidad y el transcurso de tiempo de la administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de lo que está tratándose. La prescripción de tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., está dentro de la responsabilidad de médicos generales y otros doctores médicos.

[0060] Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, tanto simultáneamente como secuencialmente, dependiendo de las circunstancias del individuo que va a tratarse.

[0061] Diversos aspectos y realizaciones adicionales de la presente invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia en vista de la presente

divulgación.

[0062] Las definiciones y descripciones de las características explicadas anteriormente se aplican a todos los aspectos y realizaciones que comprenden aquellas características, a menos que el contexto lo dicte de otro modo.

5 **[0063]** Ahora se ilustrarán ciertos aspectos y realizaciones de la invención a modo de ejemplo y con referencia a las figuras y tablas descritas más adelante.

La Figura 1 muestra sensogramas obtenidos de soluciones variables para el análisis de la unión de IGF-II al dominio 11 por SPR. Los experimentos de SPR se realizaron usando tanto el dominio 11 (a, b, c) como IGF-II (d, e, f) como
10 ligando inmovilizado. Se inyectaron muestras por duplicado de IGF-II a 268, 134, 67, 33,5, 17,8, 8,4, 4,2 y 2,1 nM sobre CD4-11 biotinilado de células 293T (a), dominio 11 acoplado a amina de *E. coli* (b) y dominio 11 biotinilado de levadura (c). El IGF-II biotinilado se inmovilizó al chip, inyecciones de analito de CD4-11 bruto a 240, 120, 60, 30, 15, 7,5 y 3,8 nM (d), 11 se purificó de *E.*
15 *coli* a 4096, 2048, 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16 y 8 nM (obsérvese que las trazas de 4096 y 2048 nM se solapan en este ejemplo) (e) y 11 se purificó a partir de levadura a 4096, 2048, 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16 y 8nM (f).

La Figura 2 muestra el sitio de unión de IGF-II del dominio 11 y la localización de restos mutados. La Figura 2(a) muestra la secuencia de aminoácidos primaria del dominio 11 de IGF2R (aminoácidos 1511-1650). Las regiones de bucle que
20 forman el parche hidrófobo del sitio de unión de IGF-II putativo están encuadradas y los restos interactuantes candidatos que se mutaron en este estudio se muestran en negrita. La naturaleza de cada resto mutado se indica anteriormente (a = ácido, b = básico, h = hidrófobo y p = polar). La Figura 2(b)
25 muestra la región del dominio 11 que engloba los restos mutados (subrayados en a) y las mutaciones específicas generadas.

La Figura 3 muestra un diagrama de proteínas de fusión del dominio 11 (naturales o que llevan mutantes dirigidos a sitio) con marca de His₆ en el extremo C y señal de secreción del factor α en el extremo N. El dominio 11
30 expresado está constituido por los aminoácidos 1511-1650 de IGF2R. La escisión de la señal del factor α (en el sitio indicado por la flecha) durante la secreción genera la proteína de 17 kDa soluble final.

La Figura 4 muestra sensogramas obtenidos de análisis de SPR de construcciones del dominio 11 de IGF2R naturales y mutadas que se unen a IGF-
35 II. Los sensogramas se obtuvieron después de inyecciones del dominio 11

natural (a) o dominio 11 que lleva las siguientes alteraciones de un único resto: en el bucle AB, Y1542A (b), S1543A (c), E1544A (d) y K1545A (e), en el bucle CD, F1567A (f), Q1569A (g), T1570A (h), I1572A (i) y I1572T (j) en el bucle FG, S1596A (k) o en el bucle GH, G1619R (l). Para todos excepto para (f), (i) y (j), las inyecciones de analito por duplicado se realizaron a concentraciones de 4096, 2048, 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16 y 8 nM. Para (f), (i) y (j) se inyectó analito a 16384, 8192, 4096, 2048, 1024, 512, 256, 128, 64 y 32 nM. La inspección de los sensogramas muestra que las mutaciones F1567A (f), I1572A (i) y I1572T (j) casi suprimen la unión de IGF-II, S1543A (c), Q1569A (g) y S1596A (k) tienen poco efecto y Y1542A (b) y T1570A (h) tiene un impacto intermedio. El polimorfismo G1619R (l) tiene una interacción natural evidente y la mutación E1544A (d) tiene un efecto positivo modesto sobre la unión de IGF-II.

La Figura 5 muestra sensogramas obtenidos de análisis de SPR del dominio 11 natural y mutantes en la posición 1544 que interaccionan con sensogramas que se obtuvieron después de inyecciones de dominio 11 natural (a) o mutantes del dominio 11 con las siguiente sustituciones en la posición 1544: E1544A (b), E1544V (c), E1544K (d). Las inyecciones de analito por duplicado se realizaron a concentraciones de 4096, 2048, 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16 y 8 nM. Los sensogramas para E1544A (b) y E1544V (c) muestran un aumento modesto pero visible en la afinidad con respecto al natural (a), mientras que E1544K (d) muestra claramente un marcado aumento en la afinidad, con una disminución obvia en la constante de disociación (véase la Tabla 4).

La Figura 6 muestra el análisis de la unión del dominio 11 natural y de E1544A a IGF-II por calorimetría de valoración isotérmica. La Figura 6(a) muestra el calor entálpico desprendido por segundo para el blanco (compensación con +0,05 $\mu\text{cal/s}$), 11 (compensación con -0,2 $\mu\text{cal/s}$) y E1544A. La Figura 6(b) muestra isothermas de unión integradas para las valoraciones de IGF-II en el dominio 11 (compensación con -4 kcal/mol) y el mutante E1544A después de restar el blanco. El ajuste de los datos experimentales a un modelo de un único sitio (línea roja) generó valores de K_D de $150 \pm 4,4$ nM para el dominio 11 y $81 \pm 8,8$ nM para E1544A. Los valores son la media $\pm$ D.E. de los experimentos por duplicado.

La Figura 7 muestra un histograma que muestra afinidades en estado estacionario (K_D) obtenidas de construcciones del dominio 11 específicamente mutadas para

sustituir el resto glutamato en la posición 1544 con el aminoácido indicado. Se ha incluido la afinidad del dominio 11 natural (WT) para la comparación. Las columnas individuales están sombreadas para reflejar la propiedad del resto introducido (puntos = hidrófobo, sin sombrear = polar, sombreadas = básico, líneas diagonales = ácido). Barras = error estándar de la media.

La Figura 8 muestra el dominio 11 de IGF2R humano clonado en los vectores de expresión pPIC9K y pMT/BiP/V5-His B; incluyendo el último vector una marca Fc de IgG1 humana en el extremo C para la dimerización.

La Figura 9 muestra que el aumento de la dosis de IGF-II conduce a un aumento en la fosforilación de PKB en líneas celulares HaCaT. Las muestras se sondearon con un anticuerpo PKB dirigido contra fosfo-(Ser473). La carga igual se confirmó volviendo a probar la transferencia con un anticuerpo para α -tubulina.

La Figura 10 muestra que el aumento de la dosis de IGF-II conduce a un aumento en la fosforilación de PKB en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) inmortalizados homocigóticos nulos para *Igf2* (*Igf2*^{-/-}) y líneas celulares HaCaT.

La Figura 11 muestra una comparación de las construcciones del dominio 11 con dos mutaciones diferentes, E1544K (que potencia la unión de IGF-II) y I1572A (que inhibe la unión de IGF-II), tanto con como sin una marca Fc, en su capacidad para bloquear las acciones de IGF-II en MEF *Igf2*^{-/-}.

La Figura 12 muestra una comparación de proteínas homodiméricas de Fc en su capacidad para bloquear las acciones de IGF-II en MEF *Igf2*^{-/-}. La construcción 11^{E1544K}-Fc inhibió significativamente la proliferación estimulada por IGF-II (*p=0,024, n=3 experimentos con muestras por triplicado, $\pm$ EEM) en comparación con 11-Fc, aún cuando la afinidad para IGF-II es del mismo orden de magnitud.

La Figura 13 muestra que 11^{E1544K}-Fc disminuye la proliferación estimulada por IGF-II de células HaCaT en un modo dependiente de la dosis, como se determina por incorporación de ³H-timidina.

La Figura 14 muestra que 11^{E1544K}-Fc bloquea la proliferación y señalización de un modo dependiente de IGF-II tanto en HaCaT como en MEF *Igf2*^{-/-} inmortalizados como se determina por incorporación de ³H-timidina.

La Tabla 1 muestra los cebadores de oligonucleótidos que se usaron para generar mutantes sitiodirigidos. La secuencia de los pares de cebadores de oligonucleótidos directos e inversos se usó para la mutagénesis sitio dirigida para generar construcciones del dominio 11 que codifican cambios de un único resto.

El tipo en negrita indica el codón alterado y las bases mutadas se muestran en subíndice. (NM_000876.1 GI: 4504610 IGF2R humano).

La Tabla 2 muestra los datos de cinética de SPR para la interacción de IGF2 con el dominio 11 purificado a partir tanto de *E. coli* como de *Pichia pastoris*. Los valores son la media $\pm$ E.E.M. de tres experimentos separados.

La Tabla 3 muestra datos cinéticos obtenidos de análisis de SPR de mutantes del dominio 11 que interaccionan con IGF2. La afinidad relativa se calculó dividiendo los valores en estado estacionario para KD entre los obtenidos a partir del receptor del dominio 11 natural. Los valores son la media $\pm$ E.E.M. de tres experimentos separados.

La Tabla 4 muestra datos cinéticos obtenidos del análisis de SPR del dominio 11 mutado en la posición 1544 que interactúa con IGF2. Los valores son la media $\pm$ E.E.M. de tres experimentos separados.

La Tabla 5 muestra datos cinéticos obtenidos del análisis de SPR del dominio 11 en el que E1544 se sustituyó con todos los restos posibles de aminoácidos.

La Tabla 6 muestra una comparación de las constantes de afinidad de disociación de IGF2 (K_D) de construcciones del dominio 11 seleccionadas determinadas usando tanto Biacore como ITC

La Tabla 7 muestra las masas calculadas, puntos isoeléctricos y coeficientes de extinción molar de las proteínas del dominio 11 de IGF2R descritas en este documento.

La Tabla 8 muestra las constantes cinéticas y de afinidad para la unión de IGF2 a proteínas del dominio 11 de IGF2R descritas en este documento.

Experimentos

25 Procedimientos

Construcción de plásmidos para la expresión del dominio 11 de IGF2R y mutantes sitiodirigidos

[0064] El dominio 11 de IGF2R se amplificó por PCR a partir del plásmido pEFBOS que contenía los dominios 10-13 previamente descritos por Linnell y col. (15) y derivados de ATCC (J03528) usando los cebadores 11EF (5'-AAAAGAATTCAACGAGCATGATGA-3') y 11AR (5'-AAAACCTAGGGGTCGCTTGCTCGCAGGC-3') que incorporan sitios de restricción EcoRI y AvrII, respectivamente. El producto se ligó por extremos romos en el vector pCR-Blunt (Invitrogen) para generar pCR-11. Las construcciones mutantes que codifican cambios de un único resto se generaron usando el kit de mutagénesis sitio

dirigida QuikChange II (Stratagene) según los protocolos del fabricante usando pCR-11 como molde y pares de cebadores como se muestran en la Tabla 1. Las mutaciones deseadas se confirmaron por secuenciación bidireccional de ADN realizada por The Sequencing Service (School of Life Sciences, Universidad de Dundee, Escocia, www.ADNseq.co.uk) usando química de Big-Dye Ver 3.1 de Applied Biosystems en un secuenciador de ADN capilar automatizado modelo 3730 de Applied Biosystems.

[0065] las construcciones no genomanipuladas y mutantes se escindieron con EcoRI y AvrII para la clonación en el vector de expresión de *Pichia pastoris* pPIC-HIS, generando pPIC-11 (tanto no genomanipulado como con la mutación indicada).

El vector pPIC-HIS usado en este estudio se derivó del plásmido de expresión pPIC-9K de Invitrogen en el que la expresión de alto nivel es impulsada por el promotor AOX1 inducible por metanol y la proteína expresada se elige como diana para la secreción en los medios de crecimiento por fusión al factor α de feromonas de acoplamiento a *Saccharomyces cerevisiae*. Esta secuencia señal se escinde eficazmente durante la secreción produciendo proteína nativa. El vector pPIC-HIS para la expresión de construcciones no genomanipuladas y mutantes del dominio 11 se generó alterando pPIC-9K por la inserción de un enlazante bicatenario formado por hibridación de los siguientes oligonucleótidos HISF (5'-CTAGGCATCATCACCATCACCATTAAG-3') HISR (5'-CTAGCTTAATGGTGATGGTGATGATGC-3') en el sitio de restricción AvrII. El enlazante se diseñó de forma que la clonación de las construcciones del dominio 11 en el sitio EcoRI y AvrII resultante produjera una fusión en marco con una marca de His6 en el extremo C para la detección y purificación. El vector pPIC-Bio para la expresión en *Pichia* del dominio 11 con un motivo de biotinilación se generó similarmente por inserción de un enlazante bicatenario formado por hibridación de los siguientes oligonucleótidos;

BIOF(5'-

CTAGGGGTCTGAACGACATCTTCGAGGCTCAGAAAATCGAATGGCACGAA
G)

y

BIOR(5'-

CTAGCTTCGTGCCATTCGATTTTCTGAGCCTCGAAGATGTCGTTTCAGACCC);

en el sitio de restricción AvrII de pPIC-9K. El enlazante codifica la secuencia de Avitag para el eficaz marcado con biotina usando la enzima BirA (Avidity, Denver, EE.UU.). La posterior clonación del dominio 11 en los sitios de restricción EcoRI y

AvrII produjo una fusión del extremo C en el marco. Para la proteína del dominio 11

de IGF2R expresada en bacterias, el dominio 11 se subclonó en el vector pET-15, se expresó, la proteína se purificó y se replegó como se describe (7).

Transformación y expresión del dominio 11 y construcciones mutantes en células 293T

[0066] Las transfecciones y expresión de las construcciones CD4-IGF2R del dominio 11 (natural y mutantes I1572T) fueron como se describe (15).

Transformación y expresión del dominio 11 y construcciones mutantes en Pichia pastoris

[0067] La integración elegida como diana de las construcciones de expresión en el locus his4 del genoma de *P. pastoris* se logró linealizando aproximadamente 5 µg del vector relevante dentro del gen HIS4 usando Sall antes de la transformación en la cepa GS115 de *P. pastoris* auxotrófica para histidina (Invitrogen) por electroporación según las instrucciones de Invitrogen. Brevemente, un cultivo de levadura de 5 ml se cultivó durante la noche en YPD (extracto de levadura al 1%, peptona al 2%, glucosa al 2%) a A600 2,0, éste se diluyó a A600 0,1 en 50 ml de YPD y se cultivó hasta que A600 alcanzó 1,5 (4-5 horas). Después de lavar, las células se resuspendieron añadiendo 200 µl de sorbitol 1 M frío en hielo. Entonces se añadieron 80 µl de la mezcla de células al ADN transformante en una cubeta Gene Pulser de 0,2 cm (BioRad) y se electroporó a 1500 kV, 25 µF, 400 Ω. Inmediatamente se añadió 1 ml de sorbitol 1 M frío en hielo a la mezcla antes de diseminarlo en placas MD (YNB al 1,34%, biotina al 4 x 10⁻⁵%, dextrosa al 2%, agar al 2%) para seleccionar prototifos de histidina.

[0068] Para la expresión, cada cepa se cultivó a 30°C, 250 r.p.m. en matraces cónicos de 250 ml que contenían 50 ml de BMGY (extracto de levadura al 1%, peptona al 2%, fosfato de potasio 100 mM a pH 6,0, YNB al 1,34%, biotina al 4 x 10⁻⁵%, glicerina al 1%), inoculada a partir de un cultivo iniciador de 5 ml durante la noche, durante 24 horas (A600 - 6,0). Se llevó a cabo la mutagénesis del dominio 11 de IGF2R y la cinética de unión de IGF-II antes de que se cosecharan las células por centrifugación y que se indujeran para la expresión transfiriéndose a 50 ml de BMMY (extracto de levadura al 1%, peptona al 2%, fosfato de potasio 100 mM a pH 6,0, YNB al 1,34%, biotina al 4 x 10⁻⁵%, 0,5% metanol). Los cultivos se complementaron con metanol hasta un volumen final del 1% después de otras 24 y 48 horas, tras lo cual las células se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se retuvo. Los sobrenadantes se sometieron a SDS-PAGE y se analizaron tanto por tinción con Coomassie como por transferencia Western. Para las proteínas que llevan la marca His6, las transferencias se sondearon usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra His6 de ratón conjugado con peroxidasa (Roche Diagnostics) y se visualizaron usando

ECL (Amersham Biosciences).

Purificación de proteínas expresadas en levadura

[0069] Se pasaron 50 ml de sobrenadante de levadura a través de un filtro de 0,22 μm , se concentraron en un concentrador centrífugo Amicon Ultra (10 kDa) y se purificaron usando un cartucho de His-Bind Quick 300 (Novagen) siguiendo los protocolos del fabricante, seguido de intercambio de tampón (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005%).

[0070] Las concentraciones se determinaron midiendo la absorbancia a 280 nm y aplicando coeficientes de extinción como se calculan por ProtParam (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>).

Espectroscopia de dicroísmo circular

[0071] Los espectros de DC se obtuvieron a partir de 0,1 mg/ml de disolución de proteína en tampón fosfato de sodio 10 mM a pH 7,4 usando un espectropolarímetro Jobin-Yvon CD6 durante un intervalo de longitud de onda de 190-250 nm a través de una longitud de paso de 1 mm. Se promediaron los espectros de UV de 10 mediciones y se corrigieron para la señal de DC del disolvente.

Filtración analítica en gel

[0072] La filtración analítica en gel se llevó a cabo en una columna Superdex 75 HR 26/60 (Amersham Biosciences) equilibrada con tampón HBS-E ligada a un sistema purificador AKTA (Amersham Biosciences). La columna se calibró con BSA (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y citocromo c (12,5 kDa). La proteína purificada se cargó a 5 mg/ml. El peso molecular del dominio 11 se determinó a partir de una representación de V_e/V_o frente al log (PM) de los patrones, en la que V_e es el volumen de elución de la proteína y V_o es el volumen inicial. El volumen inicial para la columna se determinó mediante la elución de dextrano azul (2000 kDa).

Ultracentrifugación analítica

[0073] Los experimentos del equilibrio de sedimentación se realizaron en una ultracentrífuga analítica Beckman XL-A (Beckman, Palo Alto, California, USA) como se describe previamente (79). Los datos se ajustaron por análisis de mínimos cuadrados no lineales usando el software ORIGIN (80) a un único valor para $M_{w,ap}$ usando el volumen específico parcial calculado por SEDNTERP(80). Los ajustes se evaluaron basándose en la variación al azar en los restos, en los que los restos representan la diferencia entre cada punto de dato y el punto teórico correspondiente en la curva ajustada.

35 Análisis de resonancia de plasmones superficiales

[0074] El análisis cinético por resonancia de plasmones superficiales (SPR) se realizó en un biosensor BIAcore 3000 (BIAcore, Uppsala, Suecia) a 25°C en HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005%) a una velocidad de flujo de 40 µl/min. Después del acondicionamiento previo, el chip sensor con 3 inyecciones × 1 min de NaCl 1 M, NaOH 50 mM, aproximadamente 50 unidades de respuesta (UR) de biotinil-IGF-I humano recombinante o biotinil-IGF-II (GroPep Ltd, Adelaida, Australia) se inmovilizó sobre chip sensor SA por captura por afinidad por estreptavidina. Los experimentos cinéticos consistieron en una inyección de dos minutos de analito seguido de una fase de disociación de 100 s en tampón de electroforesis, tras lo cual la superficie de unión se regeneró con una inyección de 2 minutos de MgCl₂ 2 M. Se usó una celda de flujo de blanco para la resta de la referencia en línea de cambios debidos a diferencias en el índice de refracción del tampón de electroforesis frente a la muestra y se usó una inyección de sólo tampón para restar el ruido y la desviación del instrumento. Las inyecciones se realizaron por duplicado para cada concentración y en un orden aleatorizado. Los parámetros cinéticos se determinaron mediante ajuste global de sensogramas a un modelo de unión de dos estados (cambio conformacional) usando el software BIAevaluation versión 4.0.1. En todos los casos, el componente minoritario hizo una contribución insignificante a la afinidad global y como tal sólo se usaron los parámetros cinéticos del componente de unión principal. Para cada interacción también se calculó la constante de afinidad por disociación (K_D) ajustando la respuesta de cada concentración en equilibrio a un modelo de afinidad en estado estacionario usando BIAevaluation. Con el fin de investigar la influencia de la fuerza iónica, los experimentos cinéticos se realizaron en tampones de electroforesis de HBS-EP que contenían la concentración de NaCl deseada. En cada caso, las muestras de analito se prepararon en el tampón de electroforesis apropiado antes de la inyección.

[0075] Los datos para el análisis termodinámico se obtuvieron en un BIAcore T100 realizando experimentos cinéticos a temperaturas de 20°C, 25°C, 30°C, 37°C y 42°C en HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05%). El análisis cinético a cada temperatura se realizó como antes usando 50 UR de IGF2 biotinilado inmovilizado sobre una superficie de chip sensor SA. Las inyecciones de analito por duplicado se realizaron a 512, 256, 128, 64, 32, 16, y 8 nM después de que cada una de las superficies se regeneraran usando una inyección de 2 min de MgCl 2 M. Se usó una celda de flujo de blanco e inyecciones de blanco de tampón para la resta de la referencia. Los datos se analizaron usando la herramienta de

evaluación BIAcore T100. Los sensogramas generados a cada temperatura se ajustaron a un modelo de reacción de dos estados. Los parámetros cinéticos y de afinidad derivados del componente principal se ajustaron a las formas lineales de las ecuaciones de van't Hoff y Eyring para obtener valores para ΔH° , ΔS° , $\Delta H^{\circ\dagger}$ y $\Delta S^{\circ\dagger}$.

- 5 **[0076]** Los experimentos de unión cinética para proteínas del dominio 11 de IGF2R marcadas con Fc se llevaron a cabo a 25°C a una velocidad de flujo de 75 $\mu\text{l}/\text{min}$ en tampón de unión HBS-EP. Para los ensayos cinéticos se prepararon seis concentraciones de proteína del dominio 11 de IGF2R marcada con Fc realizando diluciones seriadas dos veces (en HBS-EP) que oscilaban de 2,464 nM a 0,077 nM. Se
- 10 incluyeron un control de tampón y una celda de flujo de referencia. Los analitos se inyectaron sobre la superficie del ligando durante 3 min, tras lo cual las disoluciones de analito se sustituyeron por tampón HBS-EP durante 1 hora. La regeneración del chip sensor para las posteriores inyecciones se llevó a cabo mediante una inyección de 60 μl de MgCl_2 2 M. Todos los experimentos se repitieron por triplicado. La
- 15 transformación de datos y las representaciones de superposición se prepararon con el software BIAevaluation versión 4.0.1. Se restaron los datos de la celda de flujo de referencia y se eliminaron las puntas de regeneración y de aire. Las curvas se transformaron en x e y, y se restó el control de tampón. Los datos se ajustaron simultáneamente y se incluyeron tantos datos de asociación y de disociación como fue
- 20 posible. Los momentos de inicio y parada de la inyección se fijaron con precisión y los datos se fijaron usando el modelo de analito bivalente para el ajuste de curvas sin cambio aparente del índice de refracción. Los experimentos de control de transferencia de masas se realizaron inyectando proteína 11^{E1544K}-Fc 0,616 nM a cinco velocidades de flujo: 5, 20, 40, 60 y 75 $\mu\text{l}/\text{min}$. Las curvas de unión se compararon para su
- 25 conformidad.

Calorimetría de valoración isotérmica

- [0077]** Las mediciones calorimétricas se realizaron usando un microcalorímetro VP-ITC (MicroCal). Todas las disoluciones se desgasificaron minuciosamente antes de uso mediante agitación a vacío. Las valoraciones se realizaron a 25°C y consistieron en
- 30 17 inyecciones x 15 μl (después de un inyección inicial de 7,5 μl) de IGF-II 40 μM en tampón HBS-E (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM) a una tasa de 1 inyección cada 3 min. La célula de muestra contuvo tanto el dominio 11 no genomanipulado (7 μM) como el mutante E1544A (8 μM), también en tampón HBS-E. Para corregir los efectos del calor de dilución y el mezclado se restaron los calores de
- 35 reacción obtenidos de un experimento de control, en el que IGF2 se inyectó en HBS-E.

Los datos calorimétricos se analizaron usando el software MicroCal ORIGIN (versión 5.0) suministrado con el instrumento. Los parámetros termodinámicos se derivaron ajustando las isotermas de unión a un modelo de unión de un único sitio. Los valores para las constantes de afinidad por disociación (KD) se determinaron a partir de 5 experimentos por duplicado.

Construcción de vectores de expresión de trampa de ligandos de IGF-II marcados con Fc

[0078] El dominio 11 de ADNc de M6P/IGF2R se amplificó por PCR a partir del plásmido pEFBOS_1-15 (17) usando Pwo polimerasa (Roche) y el sitio *Bgl*III que
 10 contenía el cebador directo Bgl-11-directo (5'-AAAAAAAAGATCTCCCATGAAGAGCAACGAGCATGAT-3') y el sitio *Age*I que contenía el cebador inverso Age-11-inverso (5'-AAAAACCGGTGCAGGCCAGCGGCGTGTG-3'). El producto de PCR se desaló usando filtros Microcon YM-100 (Millipore) y se digirió con las enzimas de
 15 restricción *Bgl*III y *Age*I. El producto de PCR digerido se purificó en gel usando Geneclean (Q-BIOgene, Cambridge, RU) y se clonó en el vector de expresión pMT/BiP/V5-His B de *Drosophila* purificado en gel digerido dos veces con *Bgl*III y *Age*I para crear pDes11. Entonces, esta construcción se marcó en el extremo C con el dominio Fc de IgG1 humana como un motivo de dimerización. Para lograr esto, el
 20 ADNc del dominio Fc se amplificó por PCR a partir del clon de IMAGE 4851063 (ATCC-6878978) usando Pwo polimerasa y el sitio *Age*I que contenía los cebadores Age-Fc-directo (5'-AAAAACCGGTGAGCCCAAATCTTCTGACAAAAC-3') y Age-Fc-inverso (5'-AAAAACCGGTTTTACCGGAGACAGGGAGAGG-3') según la exposición razonada descrita previamente (82). El producto de PCR se limpió con un
 25 Microcon YM-100, se digirió con *Age*I, se purificó por Geneclean y se clonó en *Age*I digerido y CIAP se desfosforiló con pDes11 para crear pDes11-Fc. La orientación del gen de Fc clonado se determinó por PCR usando los cebadores Bgl-11-directo y Age-Fc-inverso. Para facilitar la futura clonación de 11-Fc en otros vectores de expresión, el dominio 11 de unión del sitio *Age*I a la marca Fc se eliminó usando el kit de
 30 mutagénesis Stratagene ExSite y los oligonucleótidos fosforilados en 5' Fc ExSite directo (5'-GAGCCCAAATCTTCTGACAAAAC-3') y 11 ExSite inverso (5'-TTCGGTCGCTTGCTCGCAGG-3'). Las versiones mutantes nulas sitiodirigidas y potenciadas del dominio 11 se prepararon usando los oligonucleótidos y los protocolos descritos (75), concretamente 11^{E1544K} y 11^{I1572A}. Por tanto, se generaron vectores de
 35 expresión del dominio 11^{I1572A} marcado con Fc (mutante nulo) y del dominio marcado

con Fc 11^{E1544K} (mutante potenciando), y se llamaron pDes11^{I1572A}-Fc y pDes11^{E1544K}-Fc, respectivamente. Todos las construcciones se verificaron por secuenciación de ADN, realizada por el Servicio de secuenciación de la Universidad de Dundee. Las proteínas producidas a partir de estos vectores se llamaron 11-Fc, 11^{I1572A}-Fc y 11^{E1544K}-Fc.

Producción de proteínas trampa de ligando de IGF-II marcados con Fc en células de Drosophila melanogaster

[0079] Células Schneider 2 de *Drosophila melanogaster* adaptadas sin suero D.Mel-2 se mantuvieron en 5 ml de *Drosophila*-SFM (medio libre de suero) complementado con L-glutamina 16,5 mM a 28°C en matraces de cultivo de tejido T-10. Las células se sembraron a 1×10^5 células/ml y se fraccionaron cuando alcanzaron 1×10^7 células/ml. Las células se transfectaron al 70% de confluencia en un matraz T-175 complejando 48 µg de ADN del plásmido pDes11-Fc con 96 µl de reactivo TransFectin (BioRad) según las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se cultivaron en 30 ml de medio total. Veinticuatro horas después de la transfección se añadieron 30 µl de sulfato de cobre 500 mM esterilizado por filtración para inducir la expresión transgénica. Las células se mantuvieron en cultivo durante otras 72 horas para secretar proteína plegada expresada a partir del transgén. Entonces se añadió fosfato de sodio al sobrenadante de células a una concentración final de 20 mM y el pH se ajustó a 7. El sobrenadante se esterilizó por filtración y la afinidad de la proteína marcada con Fc se purificó con 3 ml de ProteinA Fast Flow Sepharose (Amersham Biosciences) en una columna según las instrucciones del fabricante. La proteína unida se lavó con 5 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM, pH 7, y se eluyó en 5 volúmenes de columna de citrato de sodio 0,1 M, pH 3,5. La proteína eluída se neutralizó rápidamente con 0,1 volúmenes de Tris 1 M, pH 9, y el pH se ajustó a 7,4. El intercambio de tampón en PBS y la concentración de proteína se realizó usando filtros MWCO Amicon Ultra-15 de 30 kDa. La columna se regeneró con citrato de sodio 0,1 M, pH 3, y se almacenó en etanol al 20%.

Medición del tamaño y la pureza de proteínas

[0080] Se midió la absorbancia a 280 nm de proteína purificada y la concentración de proteína se calculó usando el coeficiente de extinción y la masa se determinó por la herramienta ProtParam disponible en la página web ExPASy.org. Las proteínas marcadas con Fc expresadas en células de *Drosophila* están N-glicosiladas con dos moléculas de 982,9 Da de Man₃GlcNAc₂ (39), y así éstas se incluyeron en el cálculo de masa. La proteína purificada se esterilizó por filtración y se almacenó a 4°C en

alícuotas. Las muestras de proteína se desnaturalizaron y se sometieron a electroforesis por SDS-PAGE y se visualizaron por tinción con Coomassie contra marcadores Precision (BioRad).

Filtración analítica en gel (FPLC)

5 **[0081]** Para purificar adicionalmente proteínas y medir su masa nativa se usó FPLC como se describe previamente (37). Para las proteínas marcadas con Fc, filtración analítica en gel FPLC se llevó a cabo en una columna Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences) equilibrada con HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y ligada a un sistema ÄKTA Purifier (Amersham Biosciences). La
10 columna se calibró con amilasa (200 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa), BSA (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y citocromo C (12,5 kDa). La proteína purificada se cargó a 5 mg/ml. Los pesos moleculares de las proteínas se determinaron a partir de una representación de V_e/V_o frente a $\log(PM)$ de los patrones, en la que V_e es el volumen de elución de la proteína y V_o es el volumen inicial. El
15 volumen inicial para la columna se determinó mediante la elución de dextrano azul (2000 kDa).

Cultivo celular

[0082] Se cultivaron queratinocitos humanos HaCaT en DMEM/F-12 (1:1) complementado con suero bovino fetal al 10% (SBF), 0,5 µg/ml de hidrocortisona, 50
20 UI/ml de penicilina, 5 µg/ml de estreptomycin y L-glutamina 1 mM. Los inventores derivaron fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) *Igf2^{-/-}* inmortalizados a partir de embriones de E14 (*Igf2^{-/-}*) usando procedimientos establecidos. Brevemente, el embrión se lavó en PBS, se quitaron la cabeza y el hígado y el embrión se disgregó con pinzas y las células se dejaron cultivar para formar una monocapa. Estas células se
25 inmortalizaron usando el procedimiento 3T3 (76). Las células se cultivaron en DMEM complementado con SBF al 10%, 50 UI/ml de penicilina, 5 µg/ml de estreptomycin y L-glutamina 1 mM. Todas las células se mantuvieron a 37°C en 5% de dióxido de carbono con humedad.

Análisis de señalización por transferencia de Western

30 **[0083]** 24 horas después de la siembra sobre placas de 6 pocillos (1×10^5 células por pocillo), las células se privaron de suero durante la noche antes de la estimulación. Los IGF y las construcciones del dominio 11 se preincubaron según corresponda en medio libre de suero a temperatura ambiente durante 10 min antes de colocarlas sobre las células durante otros 10 min. Después de la estimulación, las células se lavaron dos
35 veces con PBS frío en hielo e inmediatamente se rasparon en 100 µl de tampón de lisis

(Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NP40 al 1%, EDTA 1 mM, NaCl 120 mM, β -glicerofosfato 40 mM, benzamidina 1 mM, NaF 1 mM, Na_3VO_4 1 mM, PMSF 1 mM, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de antipaina, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de pepstatina). El material insoluble se eliminó por centrifugación y las proteínas se separaron bajo condiciones reductoras sobre SDS al 12%-PAGE y se transfirieron a membrana de PVDF (Millipore) antes de la detección con anticuerpos dirigidos contra fosfo-(Ser473) PKB o contra fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/ Tyr204) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas se visualizaron usando reactivos de quimioluminiscencia (ECL) potenciados. La carga de proteína igual se verificó usando un anticuerpo dirigido contra α -tubulina (Sigma).

Ensayo de incorporación de ^3H -timidina

[0084] Las células se sembraron sobre placas de 24 pocillos (HaCaT, 1×10^4 células por pocillo, MEF 3×10^4 células por pocillo) en medio de crecimiento. Después de 24 horas, las células HaCaT se privaron de suero durante 24 h y luego se trataron con IGF apropiado y construcciones del dominio 11 preincubadas a temperatura ambiente en 500 μl de medio libre de suero durante 10 min. Después de otras 24 h se añadió 1 μCi de ^3H -timidina/pocillo y las células se incubaron durante 1 hora. El medio se eliminó y las células se lavaron dos veces con PBS antes de la fijación en 500 μl de TCA al 5% durante 20 min a 4°C seguido de extracción en 400 μl de NaOH 0,1 M a 4°C durante 1 hora. Los MEF se privaron de suero durante la noche antes de la estimulación con IGF apropiado y construcciones del dominio 11 preincubadas en 500 μl de medio libre de suero a temperatura ambiente durante 10 min. Se añadió 1 μCi de ^3H -timidina por pocillo con los IGF y las células se incubaron durante 24 h antes de la fijación en TCA al 5% y extracción con NaOH 0,1 M. la incorporación de ^3H -timidina se analizó por recuento por centelleo.

Análisis estadístico

[0085] Los datos se analizaron con la prueba de la t de Student (software MINITAB versión 14, Minitab Inc., Pensilvania, EE.UU.).

Resultados

Optimización del análisis cinético de SPR

[0086] Se generó una proteína quimérica del dominio 11 de IGF2R fusionada a los dominios 3 y 4 de rata CD4 y que llevaba un motivo de biotinilación en un modo análogo a las proteínas multidominio usadas previamente por Linnell y col. (15). El análisis de SPR se realizó usando un BIAcore 3000 con CD4-11 biotinilado como ligando inmovilizado, capturado mediante estreptavidina a la superficie del chip

sensor. Se inmovilizaron 675 UR de CD4-11 (45 kDa) para lograr una $R_{\text{máx}}$ teórica de 110 UR. Un CD4 biotinilado no quimérico se inmovilizó a una celda de flujo aguas arriba y se usó para la resta de referencia en línea. Usando IGF-II como analito, los experimentos se realizaron usando inyecciones de analito por duplicado de 268, 134, 67, 33,5, 16,8, 8,4, 4,2 y 2,1 nM. Los perfiles de sensogramas resultantes indicaron un complejo mecanismo de interacción que no se ajustaba a un modelo de Langmuir de 1:1 (Fig. 1a). El fracaso de incluso la mayor concentración para alcanzar el equilibrio durante el transcurso de la inyección y el fracaso de las curvas para volver al nivel inicial sugiere una interacción bifásica con un componente que se disoció rápidamente, y otro que pareció que permanecía unido. El experimento se repitió usando una construcción de CD4-11 que llevaba una mutación I1572T como referencia en línea. Esta mutación se había identificado previamente como que suprimía la unión de IGF-2 (13, 15) y como tal debería proporcionar una referencia adecuada para la resta de cualquier unión no específica. Sin embargo, no se detectó unión no específica a la superficie de control, lo que indica que la interacción compleja aparente no fue debida a la unión no específica, sino que dependía de un sitio de unión de IGF-II intacto. Inyecciones repetidas prolongadas de IGF-II tanto sin inyecciones de regeneración como sin IGF-II pudieron lograr niveles de respuesta superiores a la $R_{\text{máx}}$ teórica, proporcionando la indicación que la forma del sensograma observado no era el producto de una interacción 1:1 de IGF-II y la bolsa de unión del dominio 11. Las condiciones experimentales se modificaron para minimizar este efecto. Éste incluyó disminuir el nivel de inmovilización (hasta 20 UR), bloquear los sitios de unión de estreptavidina restantes con biotina libre (0,5 μM) o CD4 biotinilado (30 $\mu\text{g/ml}$), bloquear sitios no específicos reinyectando albúmina de suero bovino (BSA de fracción V, 1 mg/ml), que incluye BSA (1 mg/ml) como vehículo durante las inyecciones, usar tampones de electroforesis tanto a pH 7, 6 como 5 o realizar los experimentos tanto a 37°C como 20°C. Sin embargo, tales condiciones no evitaron la concentración aparente dependiente del desplazamiento hacia arriba en el nivel inicial tras la disociación y, como los sensogramas no se ajustaron a un modelo de interacción 1:1, no fue posible obtener datos cinéticos para la interacción usando esta solución.

[0087] Se intentaron varias estrategias alternativas usando tanto IGF-II como dominio 11 como componente de unión inmovilizado. Para cada experimento, el ligando se inmovilizó para lograr una $R_{\text{máx}}$ teórica de -100 UR. Los inventores expresaron primero una proteína del dominio 11 nativo en *E. coli*, que luego se replegó y se purificó antes del acoplamiento de amina a un chip sensor CM5. Se realizaron

inyecciones por duplicado de IGF-II 268, 134, 67, 33,5, 17,8, 8,4, 4,2 y 2,1 nM. El sensograma (Fig. 1b) mostró que la superficie del dominio 11 inmovilizado era de una actividad muy baja, proporcionando la indicación que muy poca de la proteína inmovilizada era funcional. Este resultado puede ser debido tanto a una inactivación de la proteína como al resultado del acoplamiento de amina como a enlaces covalentes formados entre el chip carboxi-metildextrano y restos de lisina del sitio de unión de IGF-II del dominio 11. Como alternativa, una proteína del dominio 11 (aminoácidos 1511-1650) con un motivo de biotilación en el extremo C se expresó entonces en *Pichia pastoris* (59). La proteína secretada soluble (0,5-2 mg/l de sobrenadante de cultivo) se biotiniló en el sobrenadante de cultivo (BirA) y se inmovilizó a la superficie del chip sensor por captura por afinidad de biotina por estreptavidina (10-15 M).

[0088] Se realizaron inyecciones por duplicado de IGF-II 268-2,1 nM. Los sensogramas resultantes mostraron de nuevo la compleja respuesta aparente (Fig. 1c), proporcionando la indicación que el efecto observado dependía de la interacción del dominio 11 inmovilizado con IGF-II en el tampón de flujo en vez de un artefacto asociado a la fusión del dominio 11 a CD4. Entonces, con IGF-II biotinilado inmovilizado a la superficie celular se realizaron inyecciones por duplicado de CD4-11 no biotinilado a 240, 120, 60, 30, 15, 7,5 y 3,8 nM. Los sensogramas resultantes (Fig. 1d) también parecieron mostrar una compleja interacción similar.

[0089] Repitiendo la solución que usa IGF-II inmovilizado biotinilado y el dominio 11 soluble purificado producido tanto a partir de *E. coli* como de *Pichia pastoris* como el analito a concentraciones de 4096, 2048, 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16 y 8 nM, los sensogramas (Fig. 1e y f, respectivamente) mostraron que bajo estas condiciones experimentales la interacción se ajusta a un modelo 1:1 patrón, volviendo cada curva al nivel inicial original dentro de 2-3 minutos. Los parámetros cinéticos se asignaron ajustando globalmente los sensogramas observados a un modelo de Langmuir 1:1 usando el software BIAevaluation versión 4.0.1 (Tabla 2). Como el equilibrio se logró durante el transcurso de la inyección para cada concentración, la constante de afinidad de disociación (KD) también se calculó en la unión en estado estacionario. La interacción de IGF2 con el dominio 11, tanto si se obtuvo a partir de *E. coli* como de *Pichia pastoris*, tuvo constantes de asociación y de disociación cinéticas similares y una KD de 100 nM, tanto si se determinó a partir de las constantes cinéticas como de la unión en estado estacionario (Tabla 2). Además, el cálculo de la estequiometría a partir de la R_{máx} en estado estacionario indicó que al menos el 80% del dominio 11 soluble se expresó en cualquier sistema unido a IGF-II.

Como el sobrenadante de cultivo de levadura proporcionó un procedimiento simple, rápido y económico para la producción del dominio 11 correctamente plegado y soluble, este procedimiento se eligió para la expresión de todas las otras construcciones. El análisis de SPR también se realizó en todos los experimentos
 5 posteriores con IGF-II biotinilado inmovilizado a una superficie de chip recubierta con estreptavidina y el dominio 11 se usó como analito.

Generación de mutantes sitio dirigidos dentro del dominio 11 de IGF2R

[0090] Se usó mutagénesis sitio dirigida de pCR-11 tras la subclonación en pPIC-HIS para generar construcciones mutadas del dominio 11, con una marca His6 en el
 10 extremo C, para la expresión secretada en *Pichia pastoris*. Se usó mutagénesis seleccionada de aminoácidos individuales para evaluar su contribución a la unión de IGF-II (véase la Tabla 1 para la secuencia de cebadores mutagénicos). De las cadenas laterales de aminoácidos expuestas al disolvente identificadas por Brown y col. (7) como que posiblemente participaban en la unión de IGF-II, Y1542, S1543 (bucle AB),
 15 F1567, T1570, I1572 (bucle CD) y S1596 (bucle FG) se mutaron inicialmente a alanina (Fig. 2). La función de los restos G1546, G1568, P1597 y P1599 no se evaluó inicialmente ya que la mutación tanto de glicina como de prolina se predeciría para alterar significativamente la conformación del sitio de unión. También se mutaron E1544 y K1545 (bucle AB). También se mutó I1572 a treonina ya que esta sustitución
 20 de aminoácidos se había caracterizado previamente como que suprimía la unión de IGF-II, y servía de control positivo (13, 15). Se ha identificado una sustitución de glicina a arginina en la posición 1619 (bucle GH) como un polimorfismo humano común dentro del dominio 11 de IGF2R (Fig. 2) (60). Con el fin de evaluar la consecuencia funcional de este polimorfismo también se generó otra construcción que
 25 poseía la sustitución en G1619R.

Expresión y purificación de construcciones del dominio 11 en Pichia pastoris

[0091] El dominio 11 y las formas mutantes sitio dirigidas se expresaron como proteínas solubles secretadas en la levadura *Pichia pastoris* usando el plásmido de expresión pPIC-HIS (Fig. 3). Tras la inducción, el análisis de cada sobrenadante de
 30 levadura por inmunotransferencia, probado con un anticuerpo policlonal dirigido contra His6, mostró la presencia del producto de 17 kDa esperado que llevaba la marca de epítipo His6. Por tanto, la tinción con Coomassie de geles de SDS-PAGE sólo detectó el producto de 17 kDa, que indica que la proteína expresada era la única proteína significativa presente en los sobrenadantes de levadura. Las proteínas se
 35 purificaron por cromatografía de afinidad por quelación de metales con rendimientos

típicos de aproximadamente 5 mg de proteína purificada por litro de sobrenadante.

Evaluación de mutantes sitio dirigidos del dominio 11 de IGF2R por SPR

- [0092]** Tras la purificación, la unión de cada construcción mutante a IGF2 se evaluó por SPR y se comparó con el dominio 11 natural. Se generaron sensogramas usando IGF2 biotinilado inmovilizado a la superficie celular y proteínas del dominio 11 mutantes como analito libre (Fig. 4). Para todos las construcciones, excepto F1567A, I1572A y I1572T, el analito se inyectó por duplicado a concentraciones de 4096, 2048, 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16 y 8 nM. Se usó un mayor intervalo de concentración de 16384, 8192, 4096, 2048, 1024, 512, 256, 128, 64 y 32 nM para las inyecciones de analito de F1567A, I1572A y I1572T, ya que los experimentos piloto habían mostrado que éstos tenían un afinidad por IGF-II significativamente reducida en comparación con los otros mutantes. Como antes, los parámetros cinéticos y las constantes de afinidad en estado estacionario se determinaron a partir de los sensogramas (Tabla 3).
- [0093]** A pesar del aumento del intervalo de concentración de analito, ni los datos cinéticos ni de afinidad pudieron obtenerse para F1567A, I1572A o I1572T; los sensogramas mostraron que la unión casi se suprimió completamente para cada una de estas mutaciones (Fig. 4f, i y j respectivamente). De forma interesante, los sensogramas muestran un aumento observable en la unión al mutante I1572T con respecto a I1572A, aunque insuficiente para ser cuantificado con precisión (Tabla 3). Sin embargo, esto confirma estudios previos que han demostrado que I1572 es esencial para la unión de IGF-II (13, 15). Aquí, F1567 se identifica en este documento como un segundo aminoácido hidrófobo crítico esencial para la unión de IGF2R a IGF2 cuando se muta solo. Todos los otros mutantes presentaron niveles de unión de IGF2 que fueron cuantificables por SPR, permitiendo la asignación de parámetros cinéticos y la afinidad en estado estacionario (Tabla 3). En todos los casos, las KD obtenidas del análisis de afinidad en estado estacionario coincidieron con las calculadas a partir de los datos cinéticos. De los mutantes restantes, la mutación T1570A tuvo la siguiente mayor reducción en la afinidad (KD = 900 nM) cuando se comparó con la del natural (KD = 100 nM), colocando los tres restos con la mayor contribución a la unión de IGF-II dentro del bucle CD (véase la Fig. 2). La mutación del bucle CD restante, Q1569A, sólo produjo una reducción menor en la afinidad (KD = 130 nM). De las mutaciones dentro del bucle AB, sólo Y1542A tuvo una reducción superior a 6 veces en la afinidad (KD = 640 nM) en comparación con la natural; S1543A y K1545A mostraron una modesta reducción en la afinidad de 2-3 veces (KD = 260 nM y KD =

290 nM, respectivamente). La mutación S1596A situada en el bucle FG también produjo una reducción menor en la afinidad ($K_D = 170$ nM). Intrigantemente, la mutación E1544A en el bucle AB produjo un aumento de casi 3 veces en la afinidad por IGF-II ($K_D = 40$ nM), proporcionando la indicación que el resto de glutamato ácido en esta localización es directamente inhibidor para la interacción de IGF-II. La cinética de unión de IGF-II de la mutación G1619R, que imita un polimorfismo humano común dentro del dominio 11 (60), no era significativamente diferente de la del natural; proporcionando la indicación que este polimorfismo no confiere consecuencia funcional en términos de unión de IGF2. Esto podría esperarse a partir de su localización en el bucle GH, muy retirado del sitio de unión de IGF2 putativo. En todos los casos, la evaluación de sensogramas reveló que los cambios significativos en la afinidad parecieron ser el resultado de cambios concurrentes en tanto las constantes de asociación (k_a) como de disociación (k_d).

[0094] No se observó un sesgado completo hacia la modificación tanto de constantes de asociación como de disociación. Durante todos los experimentos de SPR anteriores, los analitos también se pasaron por un celda de flujo separada en la que se había inmovilizado IGF1 biotinilado para evaluar la especificidad por IGF2. En todos los casos, la unión era de un nivel muy bajo, insuficiente para determinar la afinidad.

Análisis de SPR de los mutantes en la posición 1544 del dominio 11 de IGF2R

[0095] Habiendo establecido que la sustitución de glutamato en la posición 1544 con alanina produjo un aumento de casi 3 veces en la afinidad por IGF-II, mediante la modificación tanto de la constante de asociación como de disociación se generaron más mutaciones en esta posición con el fin de evaluar adicionalmente esta observación. El resto de glutamato ácido se sustituyó por cadenas laterales de aminoácidos de tamaño similar con el resto hidrófobo valina (E1544V) y el resto básico lisina (E1544K). Entonces se realizó el análisis de SPR como antes usando el dominio 11 natural y los mutantes E1544A, E1544V y E1544K como analito. De nuevo, los parámetros cinéticos y los datos de afinidad en estado estacionario se obtuvieron a partir de los sensogramas resultantes (Fig. 5 y Tabla 4).

[0096] La inspección de los sensogramas muestra que la actividad de la superficie del chip sensor de IGF-II inmovilizado se había reducido ligeramente con el almacenamiento, con una R_{max} aparente de ~ 60 UR. Sin embargo, quedó una amplia actividad por generar datos cinéticos. Al igual que el mutante E1544A, la mutación E1544V también presentó un aumento, aunque ligero (-2 veces), en la afinidad con respecto al natural. Sin embargo, el mutante E1544K mostró un aumento de -6 veces

en la afinidad ($K_D \approx 15$ nM) con una constante de disociación visiblemente reducida en los sensogramas (Fig. 5d), y se cuantificó por análisis cinético (Tabla 4). Estos datos confirman la novedosa observación de los inventores de que E1544 actúa de regulador negativo intra-dominio de la interacción de IGF-II con el dominio 11 de IGF2R, y que la conversión del resto de glutamato ácido en un resto básico (E1544K) tiene una mejora adicional significativa de la afinidad superior a la de la pérdida de la cadena lateral ácida (E1544A). La especificidad por IGF-II se retiene en mutantes E1544, siendo la afinidad por IGF-I todavía demasiado baja para cuantificarse. Además, todavía se muestra el mismo orden de rango aparente que la afinidad por IGF2, como se determina por la magnitud de la respuesta a la mayor concentración de analito ya que E1544K da la mayor respuesta a IGF-I seguido por los mutantes E1544A y E1544V, dando los naturales la menor respuesta. La mutagénesis sitio dirigida se usó para generar construcciones en las que E1544 se sustituyó con todos los restos de aminoácidos posibles. El análisis de SPR se realizó usando las construcciones del dominio 11 purificadas, mutadas en la posición 1544, como analito. Las inyecciones de analito por duplicado se realizaron a un intervalo de concentración de 4096-8 nM. Cuando fue posible se obtuvieron los parámetros cinéticos y los datos de afinidad en estado estacionario a partir de los sensogramas resultantes como antes (Tabla 5 y Fig. 7). Los rendimientos de proteína obtenidos a partir del mutante en el que la cisteína había sido introducida fueron muy bajos (< 1 mg/l) y los sensogramas a partir de los análisis de SPR sugirieron una interacción bifásica que no pudo interpretarse fácilmente. Parece probable que la introducción de un resto de cisteína adicional interrumpió la formación de disulfuro apropiado, produciendo resultados reducidos y proteína defectuosamente plegada.

[0097] La inclusión de un resto de ácido negativamente cargado en la posición 1544 es perjudicial para la afinidad en este contexto, confirmando tanto el (glutamato) como el aspartato naturales una afinidad relativamente "baja" ($103,3 \pm 4,4$ nM y $213,0 \pm 9,7$ nM, respectivamente). De forma interesante, el resto de aspartato produce una reducción significativa en la afinidad cuando se compara con el natural, debido predominantemente a un aumento en la constante de disociación ($14,00 \pm 0,10 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ con respecto a $7,87 \pm 0,29 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$). En cada caso, la sustitución con la forma de amida (glutamina y asparagina) produce una afinidad mejorada ($26,7 \pm 2,3$ nM y $118,0 \pm 5,6$ nM, respectivamente), aunque en el caso de la asparagina esto sólo produjo una afinidad próxima a la de la natural.

[0098] De las mutaciones restantes, todas excepto tres (P, G, N) produjeron un

afinidad potenciada cuando se compararon con las naturales (E). Los mutantes restantes mostraron un intervalo de afinidad relativamente estrecho ($14,1 \pm 1,0$ nM a $60,0 \pm 3,0$ nM). La reducción en la afinidad de los mutantes que contienen tanto prolina como glicina refleja probablemente una perturbación estructural alrededor del sitio de unión de IGF-II. Claramente, la mayor potenciación en la afinidad, por encima de la de la natural, se confirmó por los restos lisina ($16,9 \pm 0,2$ nM, aumento de la afinidad de 6 veces) y arginina ($14,1 \pm 1,0$ nM, aumento de la afinidad de 7 veces), proporcionando la indicación que la interacción del dominio 11 con IGF-II puede estabilizarse por la sustitución de la carga negativa en la posición 1544 con un resto positivamente cargado, más allá de la que se logra mediante la eliminación de la carga negativa. El efecto de potenciación de la afinidad del resto de lisina se confirmó por ITC ($26,4 \pm 5,1$ nM para E1544K). También se confirmó un aumento considerable en la afinidad por la introducción de un resto de serina ($19,7 \pm 1,5$ nM, aumento de la afinidad de -5 veces), predominantemente debido a un aumento de la constante de asociación (k_a de $21,20 \pm 0,21 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en comparación con el valor natural de $6,62 \pm 0,13 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Validación de los datos de afinidad por BLAcore mediante calorimetría de valoración isotérmica

[0099] Con el fin de validar los datos de sensogramas de SPR se usó ITC para evaluar la afinidad de unión entre el dominio 11 e IGF-II. La afinidad del mutante E1544A también se evaluó por ITC con el fin de confirmar si usar o no una segunda técnica que esté de acuerdo con el aumento aparente en la afinidad (Fig. 6 y Tabla 6). Las valoraciones se realizaron usando 17 inyecciones x 15 μl de IGF-II 40 μM (después de una inyección inicial de 7,5 μl) en la celda de reacción que contiene el dominio 11 natural o el mutante E1544A. Después de restar la valoración del blanco y de ajustar las isotermas de unión integradas a un modelo de un único sitio, se determinó que los valores de KD eran 150 nM para el dominio 11 natural y 80 nM para E1544A. Estos valores son similares a los obtenidos usando SPR, 103 nM y 37 nM, respectivamente, que indica que ambas técnicas independientes representan estrechamente las afinidades verdaderas. Las diferencias de dos veces pueden representar simplemente la fidelidad de ambas técnicas. Y, lo que es más importante, los datos de ITC concuerdan con que la mutación E1544A confiere un aumento de la afinidad relativo de un magnitud que es similar a la sugerida por SPR (2 veces en comparación con -2,5 veces, respectivamente).

[0100] La afinidad del dominio natural 11 se aproximó a 100-150 nM cuando se

cuantificó usando tanto SPR como ITC. La reproducibilidad y el intervalo de los datos de sensogramas, combinado con el uso del control I1572T, indicaron que la solución descrita tendría la sensibilidad para cuantificar con precisión leves diferencias en las constantes de asociación y disociación inducidas por mutaciones sitiodirigidas. La afinidad validada de IGF-II con el dominio 11 solo es al menos 10-100 veces inferior a la de IGF2R de longitud completa, oscilando las constantes de afinidad informadas de 2 nM (13, 61) a 0,2 nM (62). Además, el dominio 11 retiene la especificidad por IGF-II en comparación con IGF-I, y la afinidad potenciada del receptor intacto puede ser debida a una ralentización adicional de la velocidad de disociación por el dominio 13, dimerización del receptor de longitud completa y sus efectos sobre la afinidad, y adicionalmente como factores que todavía no se han identificado (6, 15, 56, 63).

Fusiones del dominio 11 - dominio Fc

[0101] Entonces se generaron proteínas de fusión marcadas en el extremo C del dominio Fc de IgG1 humana de las formas potenciadas naturales (11^{E1544K}) y mutantes nulas (11^{I1572A}) del dominio 11 de IGF2R (Fig. 8). Estas construcciones se expresaron en células D.Mel-2 de *Drosophila* y se secretaron en el medio de crecimiento libre de suero a una concentración de 1,0 mg por litro. Un resumen de las propiedades físicas calculadas de las proteínas del dominio 11 marcadas con Fc nativas y sin marcar se muestra en la Tabla 7. Un gel teñido con azul brillante de Coomassie desnaturizante de las proteínas purificadas mostró que las proteínas corrieron como una única banda y que sus masas desnaturalizadas fueron muy próximas a las predichas. La filtración analítica en gel reveló que las proteínas del dominio 11 marcadas con Fc nativas fueron dímeros y se eluyeron como un único pico a 13,58 ml con una masa (86 kDa) próxima a la masa predicha (88,06 kDa, véase la Tabla 7).

Afinidad de proteínas del dominio 11 marcadas con Fc mediante IGF-II

[0102] Se comparó la afinidad por IGF-II de versiones de proteínas de fusión del dominio 11 marcadas con Fc y construcciones del dominio 11 usando resonancia de plasmones superficiales (BIAcore 3000). Se hicieron intentos por inmovilizar proteínas del dominio 11 marcadas con Fc sobre una superficie del chip sensor (proteína A de CM5 y CM5), pero los inventores encontraron problemas similares a los que se han descrito anteriormente con el dominio 11 monomérico inmovilizado. En su lugar, la inmovilización de IGF-I y IGF-II biotinilados en celdas de flujo separadas de un chip sensor recubierto de estreptavidina (BIAcore) generó perfiles de sensogramas reproducibles cuando las proteínas del dominio 11 marcadas con Fc y sin marcar se pasaron sobre la superficie como analitos. Los datos cinéticos del dominio 11 marcado

con Fc realizados por triplicado generaron sensogramas que se analizaron usando un modelo de analito bivalente. Los ajustes globales de los datos con un modelo de analito bivalente sin cambio en el índice de refracción aparente no generaron χ^2 superiores a 1,94 y proporcionaron ajustes óptimos a los datos. Al igual que con el mutante nulo del dominio 11 monomérico de control (11^{11572A}), el homodímero 11^{11572A} -Fc no tuvo afinidad ni por IGF-II ni por IGF-I. Además, ni el dominio 11 natural marcado con Fc (11-Fc) ni el dominio 11 mutante potenciado marcado con Fc (11^{E1544K} -Fc) tuvieron una afinidad por IGF-I, confirmando que la dimerización no tenía especificidad por ligandos alterados. A partir de los sensogramas para la unión de IGF-II fue aparente que 11-Fc y 11^{E1544K} -Fc tenían ambos una alta afinidad por IGF-II, con respuestas de UR para 11^{E1544K} -Fc a aproximadamente dos veces la amplitud de aquellas para 11-Fc a concentraciones iguales. Pareció que ambas proteínas marcadas con Fc tenían velocidades de disociación reducidas en comparación con los monómeros sin marcar. Una comparación de estos datos muestra que la dimerización mediante marcado con Fc aumentó la afinidad molar (K_D) del dominio 11 natural por IGF-II de $118,8 \pm 3,5$ nM a $3,26 \pm 0,3$ nM, y la afinidad de 11^{E1544K} de $20,5 \pm 2,0$ nM a $1,79 \pm 0,08$ nM (Tabla 8). El 11^{E1544K} -Fc tuvo la mayor afinidad de todas las proteínas probadas siendo la afinidad molar de 11^{E1544K} -Fc aproximadamente dos veces la de 11-Fc. La mejora en la afinidad del marcado con dímeros Fc en comparación con los monómeros fue debida en buena parte a una disminución sustancial en la velocidad de disociación (k_d), de $7,87 \pm 0,29 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ a $0,445 \pm 0,04 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ para 11-Fc, y de $4,06 \pm 0,28 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ a $0,401 \pm 0,03 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ para 11^{E1544K} -Fc. El marcado con Fc dobló aproximadamente la velocidad de afinidad (k_a) para el dominio 11 natural de $6,62 \pm 0,13 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a $13,65 \pm 0,01 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pero tuvo poco efecto en la constante de disociación para 11^{E1544K} , que permaneció alta a $22,27 \pm 0,74 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Tabla 8). Sin embargo, la velocidad de afinidad sustancialmente mayor de 11^{E1544K} -Fc en comparación con 11-Fc pareció explicar su mayor afinidad molar. La afinidad molar de las proteínas marcadas con Fc se consideró demasiado alta para verificarse mediante calorimetría de valoración isotérmica (ITC) ya que la ITC no puede usarse fácilmente para medir afinidades superiores a 10 nM. También se obtuvieron parámetros cinéticos secundarios a partir de los datos de sensogramas (Tabla 8), pero fueron demasiado pequeños para demostrar cualquier formación significativa del complejo de AB2, en el que el analito puede formar un puente a través de dos moléculas de ligando. Este segundo acontecimiento de unión es puramente una función de la inmovilización de ligandos. También merece la pena observar que esto es un

ejemplo de una reacción ligada en la que la formación del complejo de AB2 depende completamente de la formación previa de AB, y que para disociarse, el AB2 debe descomponerse primero en AB. A partir de los ajustes, la $R_{\text{máx}}$ calculada para las proteínas marcadas con Fc fue aproximadamente el 75-85% de la $R_{\text{máx}}$ teórica (286 UR) y los inventores concluyeron que, por tanto, un alto porcentaje de las proteínas marcadas con Fc era funcional. Se intentó aumentar la valencia del dominio 11 tras la tetramerización de versiones biotiniladas del dominio 11 usando estreptavidina. Esto produjo proteína que no pudo purificarse fácilmente, y no fue posible cuantificar la afinidad funcional (avidez).

10 *Capacidad de las construcciones del dominio 11 para bloquear la actividad funcional de IGF-II in vitro.*

[0103] Los inventores investigaron a continuación la capacidad de las proteínas del dominio 11 para inhibir las acciones de IGF-II *in vitro* evaluando que la fosforilación de dianas en la dirección 3' de la señalización de IGF1R y IGF-II indujo la proliferación como se mide por incorporación de ^3H -timidina en ADN incipiente. Los inventores usaron dos líneas celulares diferentes, queratinocitos humanos HaCaT que se ha mostrado previamente que proliferan en respuesta a IGF-II (76, 77) y fibroblastos embrionarios de ratón *Igf2^{-/-}* (MEF *Igf2^{-/-}*) inmortalizados generados usando un protocolo 3T3 a partir de una línea de ratón 129S2 endogámica (78). La adición de IGF-II durante 10 minutos a células HaCaT o MEF *Igf2^{-/-}* privados de suero condujo a un aumento en la fosforilación de PKB en un modo dependiente de la dosis. La estimulación de células con concentraciones crecientes de IGF-II durante 24 horas estimuló la síntesis de ADN, también en un modo dependiente de la dosis. Se realizaron experimentos posteriores usando IGF-II 1,3 nM para experimentos de señalización y IGF-II 6,5 nM para experimento de proliferación, ya que estas concentraciones de IGF-II dieron una estimulación máxima coherente.

[0104] Las construcciones del dominio 11 11^{natural}, 11^{E1544K} (mutación potenciada), 11^{E1572A} (mutación nula), 11-Fc, 11^{E1544K}-Fc y 11^{E1572A}-Fc se investigaron para su capacidad de bloquear la proliferación estimulada por IGF-II y la señalización en MEF *Igf2^{-/-}*. De las diferentes construcciones, sólo el mutante potenciado marcado con Fc (11^{E1544K}-Fc) mostró capacidad significativa para inhibir la proliferación estimulada por IGF-II y la activación del IGF1R (Figs. 11 y 12). Si números equivalentes de sitios de unión de IGF-II estaban presentes para el dominio de 11^{E1544K} única, en comparación con el homodímero marcado con Fc, sólo 11^{E1544K}-Fc pudo inhibir significativamente la activación mediada por IGF-II de las células, aún cuando parece

que tanto la proliferación como la señalización están ligeramente atenuadas por 11^{E1544K} (Fig. 11). 11^{E1544K}-Fc también era la construcción con la mayor afinidad medida por IGF-II (Tabla 8).

[0105] Se investigaron adicionalmente las propiedades inhibitoras de 11^{E1544K}-Fc evaluando su capacidad para inhibir IGF-II dependiente de la proliferación en células HaCaT (Fig. 13). Manteniendo constante la concentración de IGF-II (6,5 nM), los inventores encontraron que 11^{E1544K}-Fc disminuyó la capacidad de IGF-II para estimular la proliferación en un modo dependiente de la dosis, disminuyendo significativamente 650 nM y 1300 nM la proliferación el 50% ($p=0,005$) y el 73% ($p=0,013$), respectivamente (Fig. 13). Cuando la disminución en la captación de 3H-timidina se equiparó a la concentración de IGF-II funcional que quedaba en los medios, 11^{E1544K}-Fc 650 nM y 1300 nM redujo la cantidad de IGF-II activo al 82% y al 90%, respectivamente (véase el inserto de la Fig. 13).

[0106] En comparación con 11^{E1544K}-Fc, el mutante nulo marcado con Fc (11^{I1572A}-Fc) no tuvo afinidad por IGF-II, fue incapaz de inhibir tanto la proliferación estimulada por IGF-II (Fig. 14) como la estimulación de la activación de IGF1R como se mide por la fosforilación de PKB (Akt). Esto proporciona la indicación de que la capacidad de 11^{E1544K}-Fc para inhibir las acciones de IGF-II depende de su capacidad para unirse directamente al ligando. Además, la función inhibitora de 11^{E1544K}-Fc era específica de IGF-II, ya que no pudo bloquear las acciones de IGF-I tanto sobre la proliferación como la estimulación mediante IGF1R.

[0107] Finalmente, la inhibición de la apoptosis inducida por quimioterapia (doxorubicina) y la activación de caspasas por IGF-II también fue atenuada por 11^{I1572A}-Fc^a. En general, los resultados de resonancia de plasmones superficiales combinados con ensayos de la función celular indican que 11^{E1544K}-Fc es tanto altamente específica para IGF-II como que su potencia inhibitora refleja su afinidad potenciada por el ligando de IGF-II.

[0108] Estos datos presentan el primer análisis mutacional sistemático del sitio de unión del dominio 11 de IGF2R para IGF-II, combinado el análisis de SPR detallado y validado de cinética de unión en tiempo real. Parece que la mutación del bucle CD previamente identificada (I1572T), y la nueva mutación identificada aquí (F1567A), forman el núcleo hidrófobo del sitio de unión a ligando. Ambas mutaciones suprimen la unión, y son los únicos dos restos hidrófobos dentro de los bucles AB y CD.

[0109] Para las mutaciones de restos no hidrófobos, la tecnología de SPR pudo cuantificar el impacto relativo de cada cadena lateral sobre la afinidad global. En este

contexto, los cambios predominantes se detectaron por la mutagénesis del dominio 11 de IGF2R y la cinética de unión de IGF-II en los bucles FG y AB, en los que los últimos restos adyacentes pudieron tanto potenciar como reducir la afinidad (por ejemplo S1543 y E1544). En vez de una alteración específica tanto en la constante de asociación como de disociación, pareció que la interacción de IGF-II con versiones mutadas del dominio 11 condujo a efectos relativamente iguales sobre las velocidades de asociación y de disociación. La mayoría de estos restos se denominan en lo sucesivo restos de 'segunda esfera', 'ancla' o de anillo 'O' que pueden modificar sustancialmente la afinidad en un modo aditivo, y así estabilizar la interacción mediante enlaces de hidrógeno y puentes de sal. Aquí, los inventores identifican una función novedosa para E1544 como un resto de segunda esfera que actúa de regulador negativo, con pérdida de la cadena lateral ácida que conduce a afinidad potenciada (E1544A). Se estableció otro potenciamiento de la afinidad con respecto al observado para E1544A mediante la conversión del resto glutamato en un resto básico de tamaño similar (E1544K). Y, lo que es más importante, los otros restos del bucle AB fallaron en la contribución a una función reguladora negativa. El resto E1544 del bucle AB también está conservado en especies de mamíferos, y está ausente en pollo (64). Como la función normal de IGF2R es despejar IGF-II mediante unión e internalización, la identificación de un resto de aminoácido que se ha desarrollado para regular negativamente esta afinidad es un hallazgo esperado.

[0110] La función supresora de tumores de IGF2R depende de su interacción de unión con IGF-II, ya que la expresión de un receptor de longitud completa IGF2R soluble rescata las consecuencias de la promoción del crecimiento de la expresión bialélica de *Igf2* en el modelo de ratón *ApcMin/+* de adenoma intestinal. Por tanto, el suministro de formas de alta afinidad solubles de IGF2R puede ser útil para elegir como diana y tratar las consecuencias del aumento de IGF-II en cáncer. Las moléculas descritas en este documento pueden ser útiles en el desarrollo de trampas terapéuticas de alta afinidad para IGF-II.

Referencias

[0111]

1. Dahms, N. M. y col. (2002) *Biochim Biophys Acta* 1572, 317-340
2. Hassan, A. B. (2003) *Am J Pathol* 162, 3-6
3. Ghosh, P. y col. (2003) *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 202-212
4. Oshima, A. y col. (1988) *J Biol Chem* 263, 2553-2562
5. Lobel, P. y col. (1988) *J Biol Chem* 263, 2563-2570

6. Olson, L. J. y col. (2004) *Embo J* 23, 2019- 2028
7. Brown, J. et al. (2002) *Embo J* 21, 1054-1062
8. Roberts, D. L. y col. (1998) *Cell* 93, 639-648
9. Reddy, S. T. y col. (2004) *J Biol Chem* 279, 38658-38667
- 5 10. Dennis, P. A. y col. (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 580-584
11. Hancock, M. K. y col. (2002) *J Biol Chem* 277, 11255-11264
12. Dahms, N. M. y col. (1993) *J Biol Chem* 268, 5457-5463
13. Garmroudi, F et al. (1996) *Mol Endocrinol* 10, 642-651
14. Schmidt, B. y col. (1995) *J Biol Chem* 270, 14975-14982
- 10 15. Linnell, J. y col. (2001) *J Biol Chem* 276, 23986-23991
16. Baker, J. y col. (1993) *Cell* 75, 73-82
17. Nielsen, F. C. (1992) *Prog Growth Factor Res* 4, 257-290
18. LeRoith, D. et al. (2003) *Cancer Lett* 195, 127-137
19. Foulstone, E. y col. (2005) *J Pathol* 205, 145-153
- 15 20. Oka, Y. y col. (1985) *J Biol Chem* 260, 9435-9442
21. Auletta, M. et al. (1992) *J Neurosci Res* 31, 14-20
22. Grimme, S. y col. (2000) *J Biol Chem* 275, 33697-33703
23. Terasawa, H. y col. (1994) *Embo J* 13, 5590-5597
24. Torres, A. M. y col. (1995) *J Mol Biol* 248, 385-401
- 20 25. Sakano, K. y col. (1991) *J Biol Chem* 266, 20626-20635
26. Forbes, B. E. et al. (2001) *Growth Factors* 19, 163-173
27. Haig, D. y col. (1991) *Cell* 64, 1045-1046 ISSN: 0092-8674
28. Burns, J. y col. (2001) *Development* 128, 3819-3830
29. DeChiara, T. M. y col. (1990) *Nature* 345, 78-80
- 25 30. Wang, Z. Q. y col. (1994) *Nature* 372, 464-467
31. Lau, M. M. y col. (1994) *Genes Dev* 8, 2953-2963
32. Ludwig, T. y col. (1996) *Dev Biol* 177, 517-535
33. Kono, T. y col. (2004) *Nature* 428, 860-864
34. Young, L. E. y col. (2001) *Nat Genet* 27, 153-154
- 30 35. Christofori, G. y col. 1994) *Nature* 369, 414-418
36. Ravenel, J. D. et al. (2001) *J Natl Cancer Inst* 93, 1698-1703
37. Nosh, K. y col. (2004) *Clin Cancer Res* 10, 7950-7957
38. El-Badry, O. M. y col. (1990) *Cell Growth Differ* 1, 325-331
39. Zhan, S. y col. (1995) *Oncogene* 11, 2503-2507
- 35 40. Douc-Rasy, S. y col. (1996) *Oncogene* 12, 423-430

41. Kohda, M. y col. (2001) *Mol Carcinog* 31, 184-191
42. Gelato, M. C. y col. (1990) *J Clin Endocrinol Metab* 71, 1168-1174
43. Cui, H. y col. (2003) *Science* 299, 1753-1755
44. Cruz-Correa, M. y col. (2004) *Gastroenterology* 126, 964-970
- 5 45. De Souza, A. T. y col. (1995) *Nat Genet* 11, 447-449
46. De Souza, A. T. y col. (1995) *Oncogene* 10, 1725-1729
47. Kong, F. M. y col. (2000) *Oncogene* 19, 1572-1578
48. Jamieson, T. A et al (2003) *BMC Cancer* 3, 4
49. Devi, G. R. y col. (1999) *Cancer Res* 59, 4314-4319
- 10 50. O'Gorman, D. B. y col. (2002) *Endocrinology* 143, 4287-4294
51. Souza, R. F. y col. (1999) *Oncogene* 18, 4063-4068
52. Lee, J. S. y col. (2003) *Int J Cancer* 107, 564-570
53. Li, J. y col. (2004) *Oncogene*
54. Uson, I. y col. (2003) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59, 57-66
- 15 55. Olson, L. J. et al. (1999) *J Biol Chem* 274, 29889-29896
56. Devi, G. R. y col. (1998) *Mol Endocrinol* 12, 1661-1672
57. Myszka, D. G. (2000) *Methods Enzymol* 323, 325-340
58. Lynch, G. W. y col. (1999) *Eur J Immunol* 29, 2590-2602
59. Reddy, S. T. et al. (2003) *Biochem Biophys Res Commun* 309, 643-651
- 20 60. Killian, J. K. y col. (2001) *Hum Mutat* 18, 25-31
61. MacDonald, R. G. y col. (1988) *Science* 239, 1134-1137
62. Tong, P. Y. y col. (1988) *J Biol Chem* 263, 2585-2588
63. Kreiling, J. L. y col. (2005) *J Biol Chem* 280, 21067-21077
64. Clairmont, K. B. y col. (1989) *J Biol Chem* 264, 16390-16392
- 25 65. Halperin, I. y col. (2004) *Structure (Camb)* 12, 1027-1038
66. Bogan, A. A., and Thorn, K. S. (1998) *J Mol Biol* 280, 1-9
67. Keskin, O. et al. (2005) *J Mol Biol* 345, 1281-1294
68. Li, X. y col. (2004) *J Mol Biol* 344, 781-795
69. Li, Y. y col. A. (2005) *Structure (Camb)* 13, 297-307
- 30 70. Rajamani, D. y col. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11287-11292
71. Lowman, H. B. et al. (1993) *J Mol Biol* 234, 564-578
72. Lowman, H. B. y col. (1991) *Biochemistry* 30 10832-10838
73. Pal, G. y col. (2003) *J Mol Biol* 332, 195-204
74. Wu, A. M. y col. (2001) *Protein Eng* 14, 1025-1033
- 35 75. Zaccheo, O. J. y col. (2006) *J Mol Biol* 359, 403-421

76. Kim, H. J., and Kim, T. Y. (2004) *J Invest Dermatol* 123, 547-555
77. Barreca, A. y col. (1992) *J Cell Physiol* 151, 262-268
78. DeChiara, T. M. y col. (1990) *Nature* 345, 78-80
79. Scott, C. D. y col. (1996) *Endocrinology* 137, 873-878
- 5 80. Scott, C. D. y col. (2000) *J Cell Physiol* 182, 62-68
81. Lee, J. S. y col. (2003) *Int J Cancer* 107, 564-570
82. Breuhahn, K. y col. (2004) *Cancer Res* 64, 6058-6064
83. Killian J et al (2000) *Mol Cell* 5 707-716

Tabla 1

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')
Y1542AF	CGGGATTCAGAGCTGCT gc CAGCGAGAAGGGGTTGG
Y1542AR	CCAACCCCTTCTCGCT Ggc AGCAGCTGTGAATCCCG
S1543AF	CGGGATTCACAGCTGCTTAC gc CGAGAAGGGGTTGG
S1543AR	CCAACCCCTTCTC Ggc GTAAGCAGCTGTGAATCCCG
E1544AF	CACAGCTGCTTACAGC Gc GAAGGGGTTGGTTTAC
E1544AR	GTAAACCAACCCCTT Cg CGCTGTAAGCAGCTGTG
K1545AF	CAGCTGCTTACAGCGAG gc GGGGTTGGACATGAGC
K1545AR	GCTCATGTAAACCAACCC Cgc CTCGCTGTAAGCAGCTG
F15667AF	CCTGGCGTGGGGGCTGC gc TGGACAGACCAGGATTAGC
F1567AR	GCTAATCCTGGTCTGTCC Agc GCAGGCCCCACGCCAGG
Q1569AF	CGTGGGGGCTGCTTTGG Agc GACCAGGATTAGCGTGG
Q1569AR	CCACGCTAATCCTGGT Cgc TCCAAAGCAGGCCCCACG
T1570AF	GCCTGGTTTGGACAG g CCAGGATTAGGGTGGGC
T1570AR	GCCCACGCTAATCCT Ggc CTGTCCAAAGCAGGC
I1572AF	GCTTTGGACAGACCAG g gTAGCGTGGGCAAGGCC
I1572AR	GGCCTTGCCCACGCT Agc CCTGGTCTGTCCAAAGC
I1572TF	GCTTTGGACAGACCAG GAc TAGCGTGGGCAAGGCC
I1572TR	GGCCTTGCCCACGCT Ag TcCTGGTCTGTGCAAAGC
S1596AF	GGTGTACAAGGATGG g CCCCCTGTCCCTCCAAATCC
S1596AR	GGATTTGGAGGGACAAG GGc CCCATCCTTGTACACC
G1619RF	CGTGTGCAGGCCTGAGGCC a GGCCAACCAATAGGCC
G1619RR	GGCCTATTGGTTGG Cc tGGCCTCAGGCCTGCACACG
E1544VF	CACAGCTGCTTACAGC Gt GAAGGGGTTGGTTTAC
E1544VR	GTAAACCAACCCCTT Ca CGCTGTAAGCAGCTGTG
E1544KF	CACAGCTGCTTACAG Ca AGAAGGGGTTGGTTTAC
E1544KR	GTAAACCAACCCCTT Ct tGCTGTAAGCAGCTGTG

Tabla 2

Fuente del dominio 11	Parámetros cinéticos			Estado estacionario
	$k_a (\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$k_d (\text{s}^{-1})$	$K_D (\times 10^{-9} \text{ M})$	$K_D (\times 10^{-9} \text{ M})$
<i>E. coli</i>	$5,53 \pm 0,25$	$0,063 \pm 0,003$	$114,0 \pm 5,0$	$114 \pm 5,4$
<i>Pichia pastoris</i>	$5,25 \pm 0,35$	$0,053 \pm 0,002$	$101,8 \pm 3,6$	$103 \pm 4,4$

Tabla 3

Bucle	Mutación	Parámetros cinéticos			Estado estacionario	Afinidad relativa
		$k_a (\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$k_d (\text{s}^{-1})$	$K_D (\times 10^{-9} \text{ M})$ $K_D (\times 10^{-9} \text{ M})$		
AB	WT	$5,25 \pm 0,35$	$0,053 \pm 0,002$	102 ± 4	103 ± 4	1,00
	Y1542A	$2,65 \pm 0,13$	$0,169 \pm 0,008$	639 ± 5	633 ± 6	0,16
	S1543A	$3,69 \pm 0,16$	$0,096 \pm 0,003$	260 ± 4	262 ± 3	0,39
	E1544A	$9,34 \pm 1,04$	$0,033 \pm 0,002$	36 ± 2	37 ± 3	2,79
	K1545A	$2,73 \pm 0,15$	$0,078 \pm 0,004$	287 ± 8	289 ± 10	0,36
	F1567A	-	-	-	-	-
	Q1569A	$5,29 \pm 0,19$	$0,069 \pm 0,001$	130 ± 4	130 ± 3	0,80
	T1570A	$2,95 \pm 0,03$	$0,281 \pm 0,002$	954 ± 8	930 ± 12	0,11
CD	I1572A	-	-	-	-	-
	I1572T	-	-	-	-	-
FG	S1596A	$4,41 \pm 0,15$	$0,079 \pm 0,004$	179 ± 2	170 ± 4	0,61
GH	G1619R	$4,39 \pm 0,42$	$0,050 \pm 0,003$	114 ± 5	114 ± 4	0,90

Tabla 4

Mutación	Parámetros cinéticos			Estado estacionario	Afinidad relativa
	$k_a (\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$k_d (\text{s}^{-1})$	$K_D (\times 10^{-9} \text{ M})$		
WT	$5,25 \pm 0,35$	$0,053 \pm 0,002$	$101,8 \pm 3,6$	$103,3 \pm 4,4$	1,00
E1544A	$9,34 \pm 1,04$	$0,033 \pm 0,002$	$35,9 \pm 2,3$	$37,0 \pm 2,6$	2,79

ES 2 353 674 T3

4 4

E1544V	$8,37 \pm 0,42$	$0,041 \pm 0,001$	$49,8 \pm 2,7$	$52,7 \pm 3,1$	1,96
E1544K	$15,20 \pm 0,15$	$0,023 \pm 0,000$	$15,2 \pm 0,1$	$16,9 \pm 0,2$	6,12

Tabla 5

Propiedad de las cadenas laterales	Resto en la posición 1544	Parámetros cinéticos			Estado estacionario	Afinidad relativa
		k_a ($\times 10^5$ $M^{-1}s^{-1}$)	k_d ($\times 10^{-2}$ s^{-1})	K_D ($\times 10^{-9}$ M)	K_D ($\times 10^{-9}$ M)	
Hidrófobas	A	$12,30 \pm 0,52$	$5,58 \pm 0,18$	45,5	$37,0 \pm 2,6$	2,79
	V	$11,23 \pm 0,67$	$6,75 \pm 0,15$	60,5	$52,7 \pm 3,1$	1,96
	L	$10,50 \pm 0,04$	$6,55 \pm 0,05$	62,4	$51,1 \pm 1,7$	2,02
	I	$13,00 \pm 0,05$	$6,49 \pm 0,06$	49,9	$42,5 \pm 2,8$	2,43
	P	$7,34 \pm 0,03$	$17,20 \pm 0,08$	234,3	$211,0 \pm 8,9$	0,49
	W	$9,36 \pm 0,05$	$5,88 \pm 0,05$	62,8	$53,2 \pm 2,2$	1,94
	F	$11,40 \pm 0,08$	$7,91 \pm 0,11$	69,4	$56,4 \pm 2,6$	1,83
	M	$12,70 \pm 0,08$	$5,66 \pm 0,06$	44,6	$37,6 \pm 1,9$	2,75
	G	$11,00 \pm 0,09$	$21,90 \pm 0,22$	199,1	$180,0 \pm 7,3$	0,57
	S	$21,20 \pm 0,21$	$4,94 \pm 0,10$	23,3	$19,7 \pm 1,5$	5,24
	T	$9,98 \pm 0,07$	$6,92 \pm 0,07$	69,3	$60,0 \pm 3,0$	1,72
	Y	$9,44 \pm 0,03$	$6,14 \pm 0,01$	65,0	$57,4 \pm 2,5$	1,80
Polares	C	-	-	-	-	-
	N	$8,67 \pm 0,07$	$12,20 \pm 0,15$	140,7	$118,0 \pm 5,6$	0,88
	Q	$17,60 \pm 0,19$	$5,78 \pm 0,12$	32,8	$26,7 \pm 2,3$	3,87

Propiedad de las cadenas laterales	Resto en la posición 1544	Parámetros cinéticos			Estado estacionario	Afinidad relativa
		k_a ($\times 10^5$ $M^{-1}s^{-1}$)	k_d ($\times 10^{-2}$ s^{-1})	K_D ($\times 10^{-9}$ M)	K_D ($\times 10^{-9}$ M)	
Básicas	K	$20,23 \pm 2,97$	$4,06 \pm 0,28$	20,5	$16,9 \pm 0,2$	6,12
	R	$22,90 \pm 0,06$	$4,07 \pm 0,04$	17,8	$14,1 \pm 1,0$	7,33
	H	$18,00 \pm 0,16$	$6,89 \pm 0,10$	38,3	$33,7 \pm 2,3$	3,07
Ácidas	D	$6,08 \pm 0,03$	$14,00 \pm 0,10$	230,3	$213,0 \pm 9,7$	0,48
	E (WT)	$6,62 \pm 0,13$	$7,87 \pm 0,29$	118,8	$103,3 \pm 4,4$	1,00

Tabla 6

Construcción del dominio 11	Afinidad, K_D ($\times 10^{-9}$ M)	
	Biacore	ITC
WT	$103,3 \pm 4,4$	$149,6 \pm 4,4$
E1544A	$37,0 \pm 2,6$	$81,4 \pm 9,0$
E1544K	$16,9 \pm 0,2$	$26,4 \pm 5,1$
Q1569A	$129,7 \pm 2,7$	$208,9 \pm 13,0$
S1596A	$170,0 \pm 3,6$	$323,6 \pm 42,0$

Tabla 7

Proteína	Peso molecular (kDa)	PI	Coefficiente de ext. ($M^{-1} cm^{-1}$ a 280 nm)
11 ^{natural}	16,82	7,76	13650
11 ^{E1544K}	"	8,45	"
11 ^{I1572A}	16,77	7,76	"
11 ^{natural} -Fc	88,06	8,02	94420
11 ^{E1544F}	"	8,36	"
11 ^{I1572A}	87,98	8,02	"

Tabla 8

Proteína	Principales parámetros cinéticos			Parámetros cinéticos secundarios		
	k_{al} ($\times 10^5 M^{-1} s^{-1}$)	k_{dl} ($\times 10^{-2} s^{-1}$)	K_D ($\times 10^{-9} M$)	k_{a2} ($\times 10^{-3} s^{-1}$)	k_{a2} ($\times 10^{-5} UR^{-1} s^{-1}$)	k_{d2} ($\times 10^{-4} s^{-1}$)
11 ^{natural}	6,62 $\pm$ 0,13	7,87 $\pm$ 0,29	118,8 $\pm$ 3,5	2,45 $\pm$ 0,33	-	121 $\pm$ 7,2
11 ^{E1544K}	20,23 $\pm$ 2,97	4,06 $\pm$ 0,28	20,5 $\pm$ 2,0	3,83 $\pm$ 1,10	-	79 $\pm$ 28
11 ^{I1572A}	-	-	-	-	-	-
11 ^{natural} -Fc	13,65 $\pm$ 0,01	0,445 $\pm$ 0,04	3,26 $\pm$ 0,3	-	7,12 $\pm$ 0,19	2,33 $\pm$ 0,12
11 ^{E1544K}	22,27 $\pm$ 0,74	0,401 $\pm$ 0,03	1,79 $\pm$ 0,08	-	7,86 $\pm$ 0,04	1,26 $\pm$ 0,03
11 ^{I1572A}	-	-	-	-	-	-

Secuencias**[0112]**

```

1 mgaaagrsph lgpaparrpq rsllllqlll lvaapgstqa qaapfpelcs ytweavdtkn
61 nvlykinicg svdivqcgps savcmhdlkt rtyhsvgdsv lrsatrsille fnttvscdqg
121 gtnhrvqssi aflcgktlgt pefvtatecv hyfewrttaa ckkdifkank evpcyvfdee
181 lrkhdlnpli klsgaylvdd sdptslfin vcrdidtlrd pgsqrlacpp gtaaclvrgh
241 qafdvqgprd glklvrkdrl vlsyvreeag kldfcdghsp avtitfvcpv erregtipkl
301 taksncryei ewiteyachr dylesktcs1 sgeqqdvsid ltplaqsggs syisdgkeyl
361 fylnvcgete iqfcnkqkaa vcqvksdts qvkaagryhn qtlrysdgd tliyfggdec
421 ssgfqrmsvi nfecnktagn dgkgtpvftg evdctyfftw dteyacvkek edllcgatdg
481 kkrydlsalv rhaepegnwe avdgsqtete kkhffinich rvlqegkarg cpedaavcav
541 dkngsknlgk fisspmkekq niqlsysdgd dcghgkkikt nitlvckpgd lesapvlrts
601 geggcfyefe wrtaaacvls ktegenctvf dsqagfsfdl spltkknagy kvetkkydfy
661 invcgpvsvs pcqpdsgacq vaksdektwn lglsnaklsy ydgmigllyr ggtpynnerh
721 tpratlitfl cdrdagvgfp eyqeednsty nfrwytasyac peepolecvvt dpstleqydl
781 sslaksegg1 ggnwyamdns gehvtwrkyy invcrplnpv pgcnryasac qmkyekdqgs
841 ftevsisnl gmaktgppve dsqslilleyv ngsacttsdg rqttyttrih lvcsrgrlms
901 hpifslnwec vvsflwntea acpiqttdt dqacsirdpn sgfvfnlmpl nssqgynvsg
961 igkifmfnvc gtmpvcgil gkpasgceae tqteelknwk parpvgieks lqlstegfit
1021 ltykgplsak gtadafivrf vcnddvysgp lkflhqdidg qggirntyfe fetalacvps
1081 pvdcqvtdla gneydltgls tvrkpwtavd tsvdgrkrtf ylsvcnplpy ipgcqgsavg
1141 sclvsegns1 nlgvvqmspq aaangslsim yvngdkcgnq rfstritfec aqisgspafq
1201 lqdgceyvf1 wrtveacpvv rvegdncevk dprhgnlydl kplglndtiv sageytyyfr
1261 vcgklssdvc ptsdkskvvs scqekrepqg fhkvaglltq kltyengllk mnftggdtch
1321 kvyqrstaif fycdrgrtqr vflktsdcs ylfewrtqya cppfdltecs fkdgagnsfd
1381 lsslsrysdn weaitgtgdp ehylinvcks lapqagtepc ppeaaacllg gskpvnlgvr
1441 rdgppqwr1dgi ivlkyvdgd1 cpdgirkkst tirftcsesq vnsrpfmisa vedceytfaw
1501 ptatacpmks nehddcqvt1 pstghlfdls slsragfta aysekglyvm sicgenencp
1561 pgvgacfgqt risvgkankr lryvdqvlql vykdgs1pcps ksglsyk1svi sfvcrpeagg
1621 tnrpmlisl1d kqtct1lffsw htplacegat ecsvrngssi vdlsp1liht gg1eaydese
1681 ddasdt1npdf yinicqplnp mhavpcpaga avckvp1idgp pidigrvagg pilnpi1nei
1741 ylnfesstpc ladkhfnyts liafhckrgv smgtpk1llrt secdfvfewe tpvvc1pdevr
1801 mdgctltdeq llysfnlss1 ststfkvtrd srtysvgvct favgpegggc kdggvc1llsg
1861 tkgasfgrlq smkldyrhqd eavvlsyvng drcppetddg vpcvf1pfifn gksyeeci1e
1921 sraklwcstt adydrdhewg fcrhsnsyrt ssiifkcded edigrp1qvf1 evrgcdvtfe
1981 wktkvvcppk kleckfvqkh ktydlrl1ss ltgswslvhn gvsy1yinlcq ki1ykgplgcs
2041 erasicrrtt tgdvqvlg1lv htqklgvidg kvvvtyskgy pcggnktass vieltctktv
2101 grpafkrfdi dsctyyfswd sraacavkpq evqmvngtit npingksfsl gdiyfklfra
2161 sgdmrtngdn ylyeiqlssi tssrnpacsg anicqv1kpnd qhfsrkvgts dktkyy1ldg
2221 dldvvfasss kcgkdktksv sstiffhcdp lvedgi1pefs hetad1cy1lf swytsavcpl
2281 gvgfdsenpg ddgqmhkgls ersqav1gavl sl1lval1tcc llal1lyk1e rretviskl1t
2341 tccrrssnvs ykyskvnkee etdenetewl meeig1lpppr qgkegqengh ittksv1kals
2401 slhgddqdse devltipevk vhsgrgagae sshpvrnaqs nalqer1eddr vglvrgekar
2461 kgksssaqgk tvsstklvsf hddsded1lh i

```

SEQ ID NO: 1

```

1 cgagcccagt cgagccgcgc tcacctcggt cccccgctcc gtctccacct ccgcctttgc
61 cctggcggcg cgaccccgtc cgggcgcggc cccagcagct cgcgcgcgct tagcctcgcg
121 cccgcgcgcg agtcggggcc cgggcgcgat ggggcgcgct cgggcgcgag cccccacctg
181 gggccgcgcg ccgcccgcgc cccgcagcgc tctctgctcc tgctgcagct gctgctgctc
241 gtcgctgccc cgggggtccac gcaggcccgag gccgcccgtt tccccgagct gtgcagttat
301 acatgggaag ctggtgatac caaaaataat gtactttata aaatcaacat ctgtggaagt
361 gtggatatgt tccagtgccg gccatcaagt gctgtttgta tgcacgactt gaagacacgc
421 acttatcatt cagtggtgta ctctgttttg agaagtgcaa ccagatctct cctggaatcc
481 aacacaacag tgagctgtga ccagcaaggc acaaatcaca ggtccagag cagcattgcc
541 ttctctgtgt ggaaaaccct ggggaactcct gaatttgtaa ctgcaacaga atgtgtgcac
601 tactttgagt ggaggaccac tgcagcctgc aagaaagaca tatttaaagc aaataaggag
661 gtgccatgct atgtgtttga tgaagagttg aggaagcatg atctcaatcc tctgatcaag
721 cttagtgggt cctacttggt ggatgactcc gatccggaca cttctctatt catcaatgtt
781 tgtagagaca tagacacact acgagaccca ggttcacagc tgcgggcctg tcccccggc
841 actgccgcct gcctggtaag aggacaccag gcgtttgatg ttggccagcc ccgggacgga
901 ctgaagctgg tgcgcaagga caggcttgct ctgagttacg tgagggaga ggcaggaaag
961 ctagactttt gtgatggtca cagccctgct gtgactatta catttgtttg cccgtcggag
1021 cggagagagg gcaccattcc caaactcaca gctaaatcca actgccgcta tgaaattgag
1081 ttgattactg agtaactctg ccacagagat tacctggaaa gtaaaacttg ttctctgagc
1141 ggcgagcagc aggatgtctc catagacctc acaccacttg cccagagcgg aggttcatcc
1201 tataatttcag atggaaaaga atatttgttt tatttgaatg tctgtggaga aactgaaata
1261 cagttctgta ataaaaaaca agctgcagtt tgccaagtga aaaagagcga tacctctcaa
1321 gtcaaagcag caggaagata ccacaatcag accctccgat attcggatgg agacctcacc
1381 ttgatataat ttggagggtga tgaatgcagc tcagggtttc agcggatgag cgtcataaac
1441 tttgagtcca ataaaaccgc aggtaacgat gggaaaggaa ctctgtatt ctcaggggag
1501 gttgactgca cctacttctt cacatgggac acggaatacg cctgtgttaa ggagaaggaa
1561 gacctcctct gcggtgccac cgacgggaag aagcgctatg acctgtccgc gctggtccgc
1621 catgcagaac cagagcagaa ttgggaagct gtggatggca gtcagacgga aacagagaag
1681 aagcattttt tcattaatat ttgtcacaga gtgctgcagg aaggcaaggc acgagggtgt
1741 cccgaggacg cggcagtggt tgcagtggtt aaaaatggaa gtaaaaatct gggaaaattt
1801 attctctctc ccattgaaaga gaaaggaac attcaactct ctattcaga tgggtgatgt
1861 tgtggtcatg gcaagaaaat taaaactaat atcacacttg tatgcaagcc aggtgatctg
1921 gaaagtgcac cagtgttgag aacttctggg gaaggcgggt gcttttatga gtttgagtgg
1981 cgcacagctg cggcctgtgt gctgtctaag acagaagggg agaactgcac ggtctttgac
2041 tcccaggcag ggttttcttt tgacttatca cctctcaca agaaaaatgg tgccataaaa
2101 gttgagacaa agaagtatga cttttatata aatgtgtgtg gcccggtgtc tgtgagcccc
2161 tgtcagccag actcaggagc ctgccagggt gcaaaaagtg atgagaagac ttggaacttg
2221 ggtctgagta atgcgaagct ttcatattat gatgggatga tccaactgaa ctacagaggc
2281 ggcacaccct ataacaatga aagacacaca ccgagagcta cgctcatcac ctttctctgt
2341 gatcagacg cgggagtggt cttccctgaa tatcaggaag aggataactc cacctacaac
2401 ttccggtggt acaccagcta tgccctgccg gaggagcccc tggaatgcgt agtgaccgac
2461 ccctccacgc tggagcagta cgacctctcc agtctggcaa aatctgaagg tggccttgga
2521 ggaaactggt atgccatgga caactcaggg gaacatgtca cgtggaggaa atactacatt
2581 aacgtgtgtc ccactctgaa tccagtgcgc ggctgcaacc gatatgcac ggcttgccag
2641 atgaagtatg aaaaagatca gggctccttc actgaagtgg tttccatcag taacttgga
2701 atggcaaaaga ccggcccggg ggttgaggac agcggcagcc tccttctgga atactgaaat
2761 gggtcggcct gcaccaccag cgatggcaga cagaccacat ataccacgag gatccatctc
2821 gtctgctcca ggggcaggct gaacagccac cccatctttt ctctcaactg ggagtggtgt
2881 gtcagtttcc tgtggaacac agaggctgcc tgtcccatcc agacaacgag ggatacagac
2941 caggcttgct ctataaggga tcccaacagt ggatttggtg ttaactttaa tccgctaaac
3001 agttcgcaag gatataacgt ctctggcatt ggggaagatt ttatgtttaa tgtctgcggc
3061 acaatgcctg tctgtgggac catcctggga aaacctgctt ctggctgtga ggcagaaacc
3121 caaactgaag agctcaagaa ttggaagcca gcaaggccag tcggaattga gaaaagcctc
3181 cagctgtcca cagagggtct catcactctg acctacaaag ggcctctctc tgccaaaggt
3241 accgctgatg cttttatcgt ccgctttgtt tgcaatgatg atgtttactc agggccccctc
3301 aaattcctgc atcaagatat cgactctggt caagggatcc gaaacactta ctttgagttt
3361 gaaaccgcgt tggcctgtgt tccttctcca gtggactgcc aagtcaccga cttggctgga
3421 aatgagtacg acctgactgg cctaagcaca gtcaggaaac cttggacggc tgttgacacc
3481 tctgtcgatg ggagaaagag gactttctat ttgagcgttt gcaatcctct cccttacatt
3541 cctggatgcc agggcagcgc agtggggtct tgcttagtgt cagaaggcaa tagctggaat
3601 ctgggtgtgg tgcagatgag tccccaaagg gcggcgaatg gatctttgag catcatgtat

```

```

3661 gtcaacggtg acaagtgtgg gaaccagcgc ttctccacca ggatcacggt tgagtgtgct
3721 cagatatcgg gctcaccagc atttcagctt caggatggtt gtgagtacgt gtttatctgg
3781 agaactgtgg aagcctgtcc cggtgtcaga gtggaagggg acaactgtga ggtgaaagac
3841 ccaaggcatg gcaacttgta tgacctgaag cccctgggcc tcaacgacac catcgtgagc
3901 gctggcgaat acacttatta ctccgggtc tgtgggaagc ttctctcaga cgtctgcccc
3961 acaagtgaac agtccaaggt ggtctcctca tgtcaggaaa agcgggaacc gcagggattt
4021 cacaaagtgg caggtctcct gactcagaag ctaacttatg aaaatggctt gttaaaaatg
4081 aacttcacgg ggggggacac ttgccataag gtttatcagc gctccacagc catcttcttc
4141 tactgtgacc ggggacacca ggggccagta ttcttaaagg agacttcaga ttgttcctac
4201 ttgtttgagt ggcgaacgca gtatgcctgc ccacctttcg atctgactga atgttcattc
4261 aaagatgggg ctggcaactc cttcgacctc tcgtccctgt caaggtagag tgacaactgg
4321 gaagccatca ctgggacggg ggacccggag cactacctca tcaatgtctg caagtctctg
4381 gccccgcagg ctggcactga gccgtgccct ccagaagcag ccgctgtctc gctgggtggc
4441 tccaagcccg tgaacctcgg cagggttaagg gacggacctc agtggagaga tggcataatt
4501 gtcttgaaat acgttgatgg cgacttatgt ccagatggga ttcggaaaaa gtcaaccacc
4561 atccgattca cctgcagcga gagccaagtg aactccaggc ccatgttcat cagcgccgtg
4621 gaggactgtg agtacacctt tgctggccc acagccacag cctgtcccat gaagagcaac
4681 gagcatgatg actgccaggt caccaaccca agcacaggac acctgtttga tctgagctcc
4741 ttaagtggca gggcgggatt cacagctgct tacagcgaga aggggttggt ttacatgagc
4801 atctgtgggg agaataaaaa ctgccctcct ctcgctgggg cctgctttgg acagaccagg
4861 attagcgtgg gcaaggccaa caagaggctg agatacgtgg accaggtcct gcagctgggtg
4921 tacaaggatg ggtccccttg tccctccaaa tccggcctga gctataagag tgtgatcagt
4981 ttctgtgtga ggcctgaggg cgggccaacc aataggccca tgcctcatctc cctggacaag
5041 cagacatgca ctctctctct ctctctggac acgcccgtgg cctgcgagca agcagccgaa
5101 tgttccgtga ggaatggaa ctctattgtt gacttgtctc cccttattca tcgactgggt
5161 ggttatgagg cttatgatga gagtgaggat gatgcctcgg ataccaaccc tgatttctac
5221 atcaatatatt gtcagccact aaatcccatg cacgcagtgc cctgtcctgc cggagccgct
5281 gtgtgcaaag ttctctattga tgggtccccc atagatatcg gccgggtagc aggaccacca
5341 atactcaatc caatagcaaa tgagatttac ttgaattttg aaagcagtag tccttgctta
5401 gcgggacaagc atttcaacta cactcgcctc atcgcgtttc actgtaagag aggtgtgagc
5461 atgggaacgc ctaagctgtt aaggaccagc gagtgcgact ttgtgttcga atgggagact
5521 cctgtcgtct gtccgatga agtgaggatg gatggctgta cctgacaga tgagcagctc
5581 ctctacagct tcaacttgct cagcctttcc acgagcacct ttaaggtgac tcgagactcg
5641 gcgacctaca gcgttggggt gtgcaccttt gcagtggggc cagaacaagg aggtgttaag
5701 gacggaggag tctgtctgct ctcaggcacc aagggggcat cctttggacg gctgcaatca
5761 atgaaactgg attacaggca ccaggatgaa gcggtcgttt taagttacgt gaatggatg
5821 cgttgccctc cagaaaaccga tgacggcgct ccctgtgtct tcccttcat attcaatggg
5881 aagagctacg aggagtgcac catagagagc agggcgaaagc tgtggtgtag cacaactgag
5941 gctacgaca gagaccagca gtggggcttc tgcagacact caaacagact ccggacatcc
6001 agcatcatat ttaagtgtga tgaagatgag gacattggga ggccacaagt cttaagttaa
6061 gtgcgtgggt gtgatgtgac atttgagtgg aaaacaaaag ttgtctgccc tccaaagaag
6121 ttggagtgca aattcgtcca gaaacacaaa acctacgacc tgcggtgctc ctctctctc
6181 accgggtcct ggtccctggg ccacaacgga gtctcgtact atataaatct gtgccagaaa
6241 atataaaaag ggccctggg ctgctctgaa agggccagca tttgcagaag gaccacaact
6301 ggtgacgtcc aggtcctggg actcgttcac acgcagaagc tgggtgtcat aggtgacaaa
6361 gttgttgtca cgtactccaa aggttatccg tgtggtggaa ataagaccgc atcctccgtg
6421 atagaattga cctgtacaaa gacggtgggc agacctgcat tcaagaggtt tgatatcgac
6481 agctgcactt actacttcag ctgggactcc cgggctgcct gcgccgtgaa gcctcaggag
6541 gtgcagatgg tgaatgggac catcaccaac cctataaatg gcaagagctt cagcctcgga
6601 gatatttatt ttaagctgtt cagagcctct ggggacatga ggaccaatgg ggacaactac
6661 ctgtatgaga tccaactttc ctccatcaca agctccagaa accggcgctg ctctggagcc
6721 aacatatgcc aggtgaagcc caacgatcag cacttcagtc ggaaagtgg aacctctgac
6781 aagaccaagt actaccttca agacggcgat ctogatgtcg tgtttgcctc ttctctaaag
6841 tgcggaaaagg ataagacca gtctgtttct tccaccatct tcttccactg tgaccctctg
6901 gtggaggagc ggatccccga gttcagtcac gagactgccg actgccagta cctcttctct
6961 tggtagacct cagccgtgtg tccctctggg gtgggctttg acagcgagaa tcccggggac
7021 gacgggcaga tgcacaaggg gctgtcagaa cggagccagg cagtggcgcc ggtgtcagc
7081 ctgctgctgg tggcgctcac ctgctgcctg ctggccctgt tgctctacaa gaaggagagg
7141 agggaaacag tgataagtaa gctgaccact tgcgtgagga gaagtcccaa cgtgtcctac
7201 aaatactcaa aggtgaataa ggaagaagag acagatgaga atgaaacaga gtggctgatg
7261 gaagagatcc agctgcctcc tccacggcag ggaaaggaag ggcaggagaa cggccatatt
7321 accaccaagt cagtgaagcc cctcagctcc ctgcatgggg atgaccagga cagtgaggat
7381 gaggttctga ccatcccaga ggtgaaagtt cactcgggca ggggagctgg ggcagagagc

```

```

7441 tccccccag tgagaaacgc acagagcaat gcccttcagg agcgtgagga cgataggggtg
7501 gggctgggtca ggggtgagaa ggcgaggaaa gggaaagtcca gctctgcaca gcagaagaca
7561 gtgagctcca ccaagctggt gtccttccat gacgacagcg acgaggacct cttacacatc
7621 tgactccgca gtgcctgcag gggagcacgg agccgcggga cagccaagca cctccaacca
7681 aataagactt ccactcgatg atgcttctat aattttgcct ttaacagaaa ctttcaaaag
7741 ggaagagttt ttgtgatggg ggagaggggtg aaggaggtca ggccccactc cttcctgatt
7801 gtttacagtc attgaataa ggcattggctc agatcggcca cagggcggtg ccttgtgccc
7861 agggttttgc cccaagtcc cttttaaag cataaggccg gacgcatctc aaaacagagg
7921 gctgcattcg aagaaacct tgctgcttta gtcccgatag ggtatttgac ccgatatat
7981 tttagcattt taattctctc cccctattta ttgactttga caattactca ggtttgagaa
8041 aaaggaaaaa aaaacagcca ccgtttcttc ctgccagcag ggggtgtgatg taccagtttg
8101 tccatcttga gatggtgagg ctgtcagtgt atggggcagc ttccggcggg atggtgaact
8161 ggtcattaat gtgtcccctg agttggagct cattctgtct cttttctctt ttgctttctg
8221 tttcttaagg gcacacacac gtgcgtgcga gcacacacac acatacgtgc acagggctcc
8281 cgagtgccta ggttttggag agtttgcctg ttctatgcct ttagtcagga atggctgcac
8341 ctttttgcat gatattctca agcctgggag tacagagcac atttgtcagt atttttgccc
8401 gctggatgat tcaaacaacc tgcccaaaga ttgatttgtg tgtttgtgtg tgtgtgtgtg
8461 tgtgtgtgtg tgtgtgagtg gagttgaggt gtcagagaaa atgaattttt tccagatttg
8521 gggatatagg ctcatctctt caggttctca tgataccacc tttactgtgc ttattttttt
8581 aagaaaaaag tgttgatcaa ccattcgacc tataagaagc ctttaatttgc acagtgtgtg
8641 acttacagaa actgcatgaa aaatcatggg ccagagcctc ggccctagca ttgcacttgg
8701 cctcatgctg gagggagggt gggcggttac agcgcggagg aggaggagg ccaggcgggc
8761 atggcggtga ggaggaggga ggccggcggtg tcacagcatg gaggaggagg gaggcgctgc
8821 tgggtgttctt attctggcgg cagcgctttt cctgccatgt ttagtgaatg acttttctcg
8881 cattgtagaa ttgtatatag actctggtgt tctattgctg agaagcaaac cgccctgcag
8941 catccctcag cctgtaccgg tttggctggc ttgtttgatt tcaacatgag tgtatttttt
9001 aaaattgatt tttctcttca ttttttttc aatcaacttt actgtaatat aaagtattca
9061 acaatttcaa taaaagataa attattaaaa

```

SEQ ID NO: 2

```

1 nehddcqvt n pstghlfdls slsgragfta aysekglyvm sicgenencp pgvgacfggt
61 risvgkankr lryvdqvlql vykdgspcps ksglsyksvi sfvcrpeagp tnprmlisld
121 kqtctlffsw htplacegat

```

SEQ ID NO: 3

REIVINDICACIONES

1. Un dominio de unión de IGF-II mutante que comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 1511 a 1650 de IGF2R humano con menos de 50 de dichos
5 restos mutados,
en el que E1544 está sustituido por un resto de aminoácido no ácido que es distinto de N, P o G y;
en el que dicho dominio de unión de IGF-II mutante se une a IGF2 con aumento de la afinidad con respecto a los restos 1511 a 1650 de IGF2R humano.
10
2. Un dominio de unión de IGF mutante según la reivindicación 1 que no muestra unión o sustancialmente no se une a IGF1.
3. Un dominio de unión de IGF mutante según la reivindicación 1 o la
15 reivindicación 2, en el que los restos mutados están mutados por sustitución, inserción o delección.
4. Un dominio de unión de IGF mutante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que resto E1544 está sustituido por un resto básico de
20 aminoácido.
5. Un dominio de unión de IGF mutante según la reivindicación 4, en el que E1544 está sustituido por K.
- 25 6. Un dominio de unión de IGF mutante según la reivindicación 4, en el que E1544 está sustituido por R.
7. Un dominio de unión de IGF mutante según la reivindicación 4, en el que E1544 está sustituido por H.
30
8. Un dominio de unión de IGF mutante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que E1544 está sustituido por S.
9. Un dominio de unión de IGF mutante según una cualquiera de las
35 reivindicaciones 1 a 8, en el que los restos F1567 y I1572 no están mutados.

10. Un dominio de unión de IGF mutante según la reivindicación 9, en el que T1570 no está mutado.
- 5 11. Un dominio de unión de IGF mutante según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que P1597 y P1599 no están mutados.
12. Un dominio de unión de IGF mutante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que está constituido por la secuencia de aminoácidos de los
10 restos 1511 a 1650 de IGF2R humano con el resto E1544 sustituido por un resto no hidrófobo.
13. Un polipéptido que comprende un dominio de unión de IGF según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 15 14. Un polipéptido según la reivindicación 13 que comprende dos o más dominios de unión de IGF mutantes según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
- 20 15. Un polipéptido según la reivindicación 13 o la reivindicación 14 que comprende el dominio 13 de IGF2R humano.
16. Un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 que comprende un dominio Fc de inmunoglobulina.
- 25 17. Un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 que comprende una marca de afinidad.
18. Un ácido nucleico que codifica un dominio de unión de IGF-II según una
30 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17.
19. Un vector que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 18.
- 35 20. Una célula huésped que comprende un vector según la reivindicación 19.

21. Un dominio de unión de IGF-II según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, un ácido nucleico según la reivindicación 18, un vector según la reivindicación 5 19 o una célula hospedadora según la reivindicación 20 para uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia.

22. Un dominio de unión de IGF-II según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, un ácido nucleico según la reivindicación 18, un vector según la reivindicación 10 19 o una célula hospedadora según la reivindicación 20 para uso en un procedimiento de tratamiento de cáncer.

23. Uso del dominio de unión de IGF-II según una cualquiera de las 15 reivindicaciones 1 a 12, un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, un ácido nucleico según la reivindicación 18, un vector según la reivindicación 19 o una célula hospedadora según la reivindicación 20 en la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de cáncer.

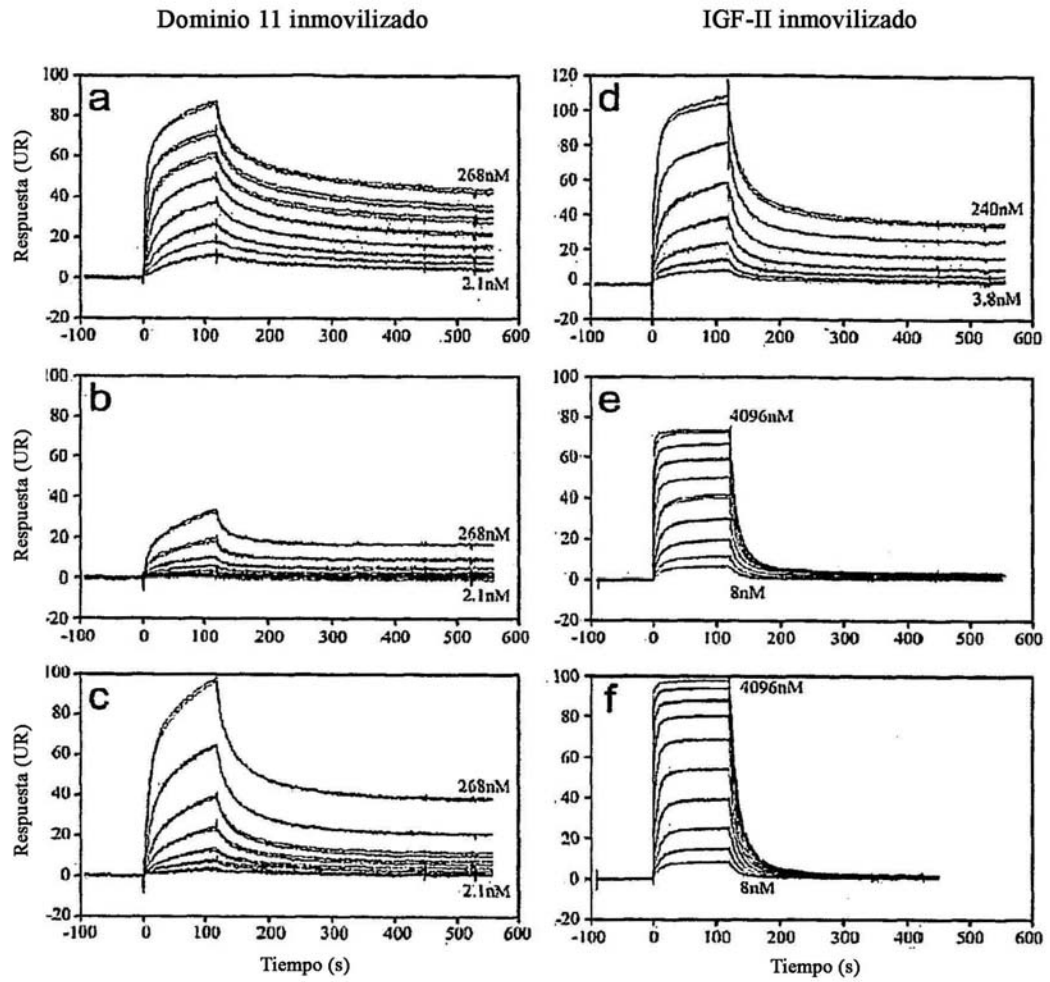


Figura 1

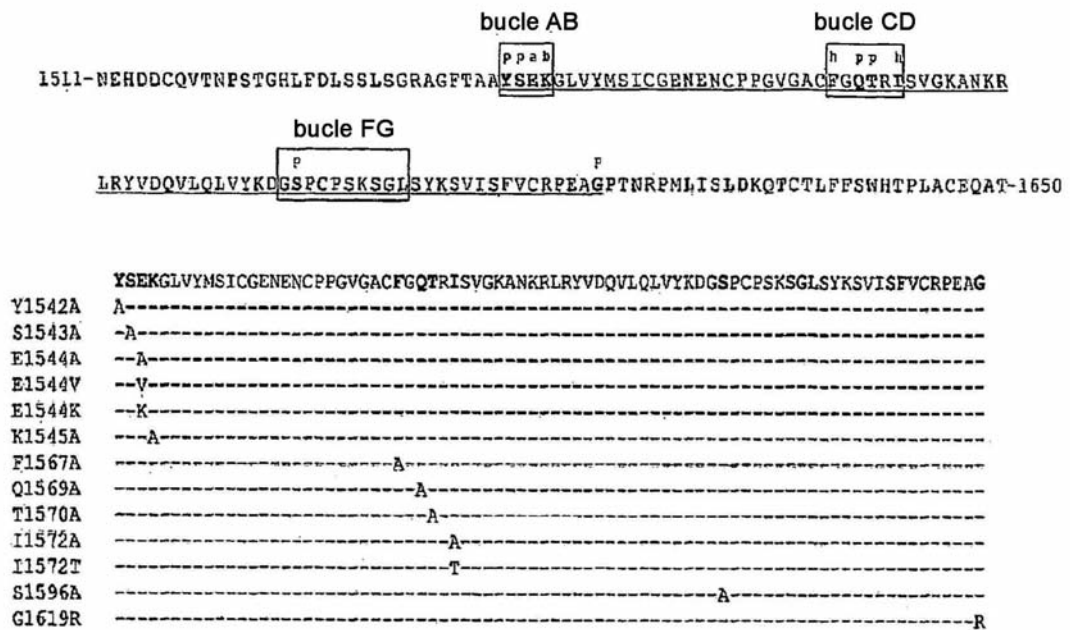


Figura 2

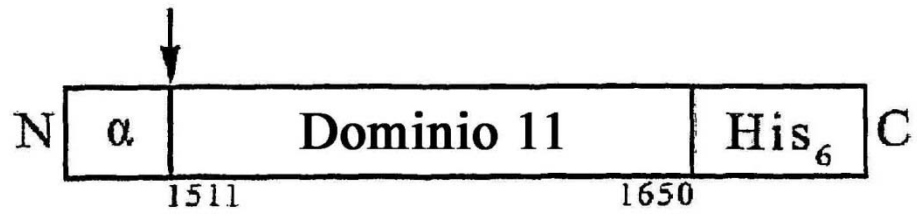


Figura 3

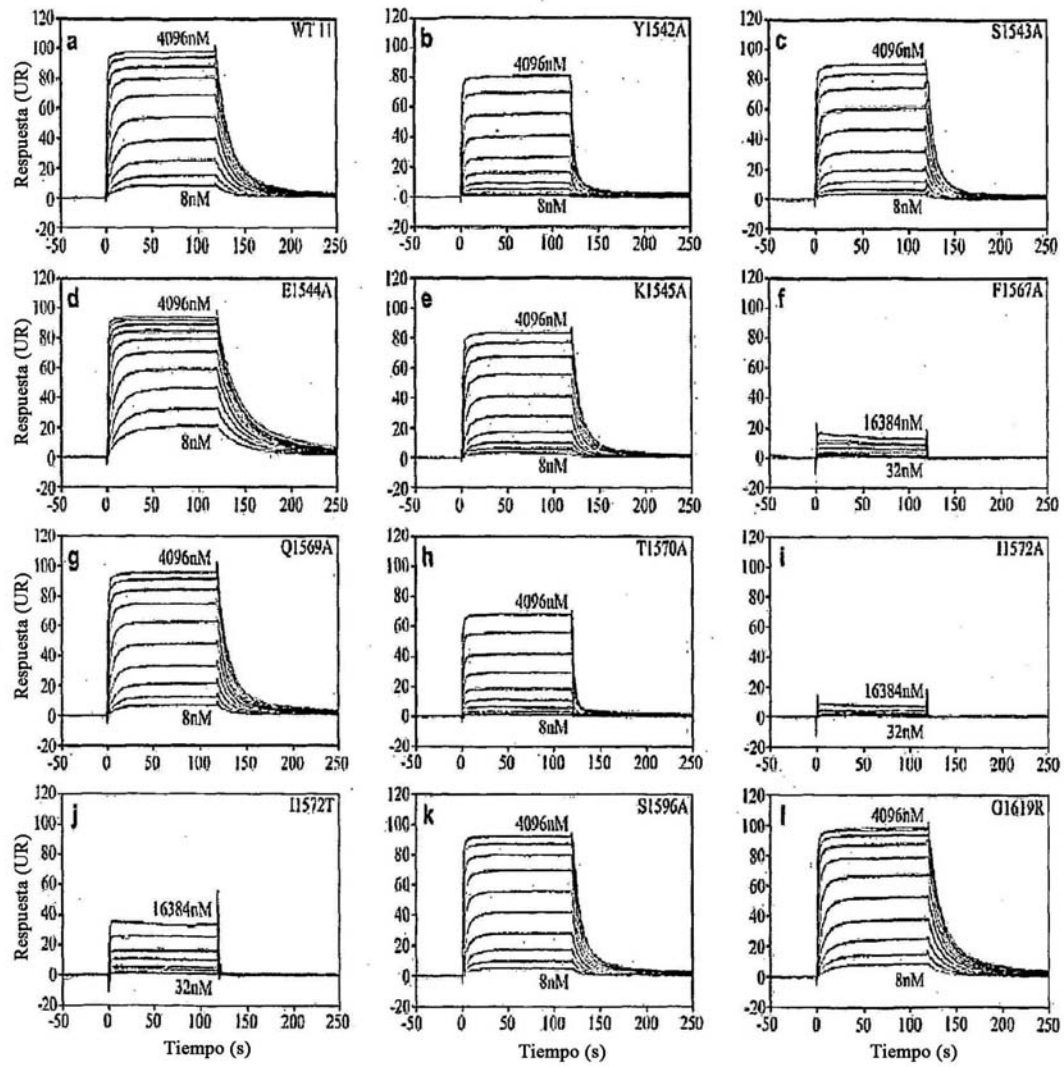


Figura 4

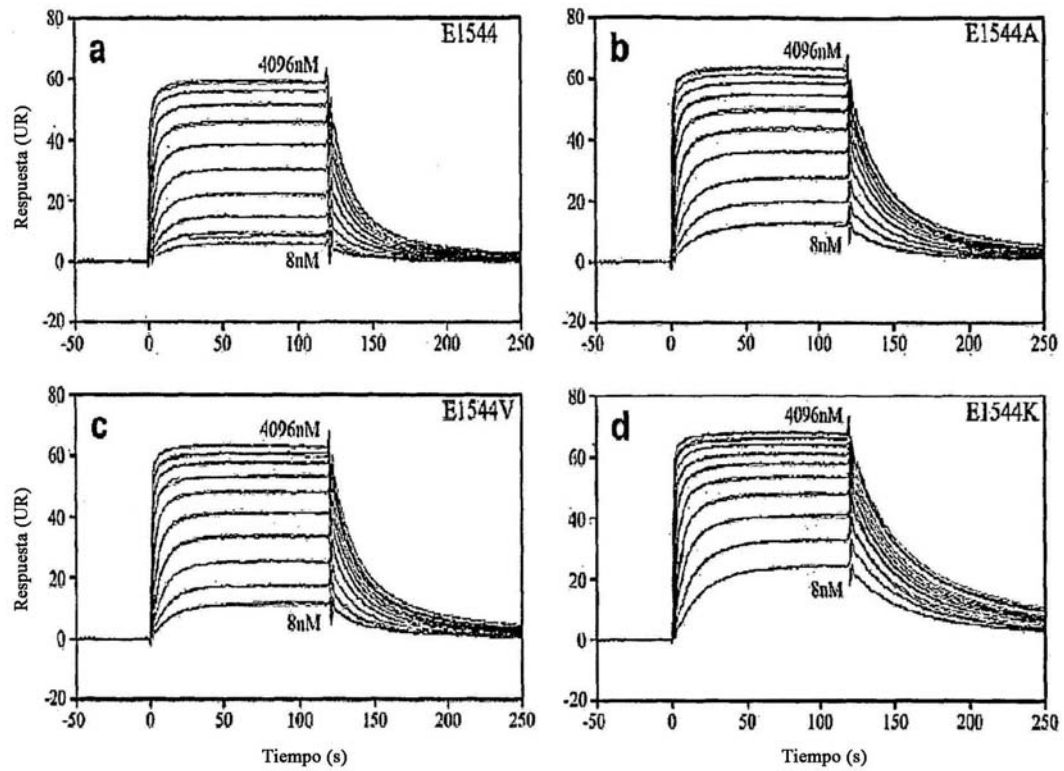


Figura 5

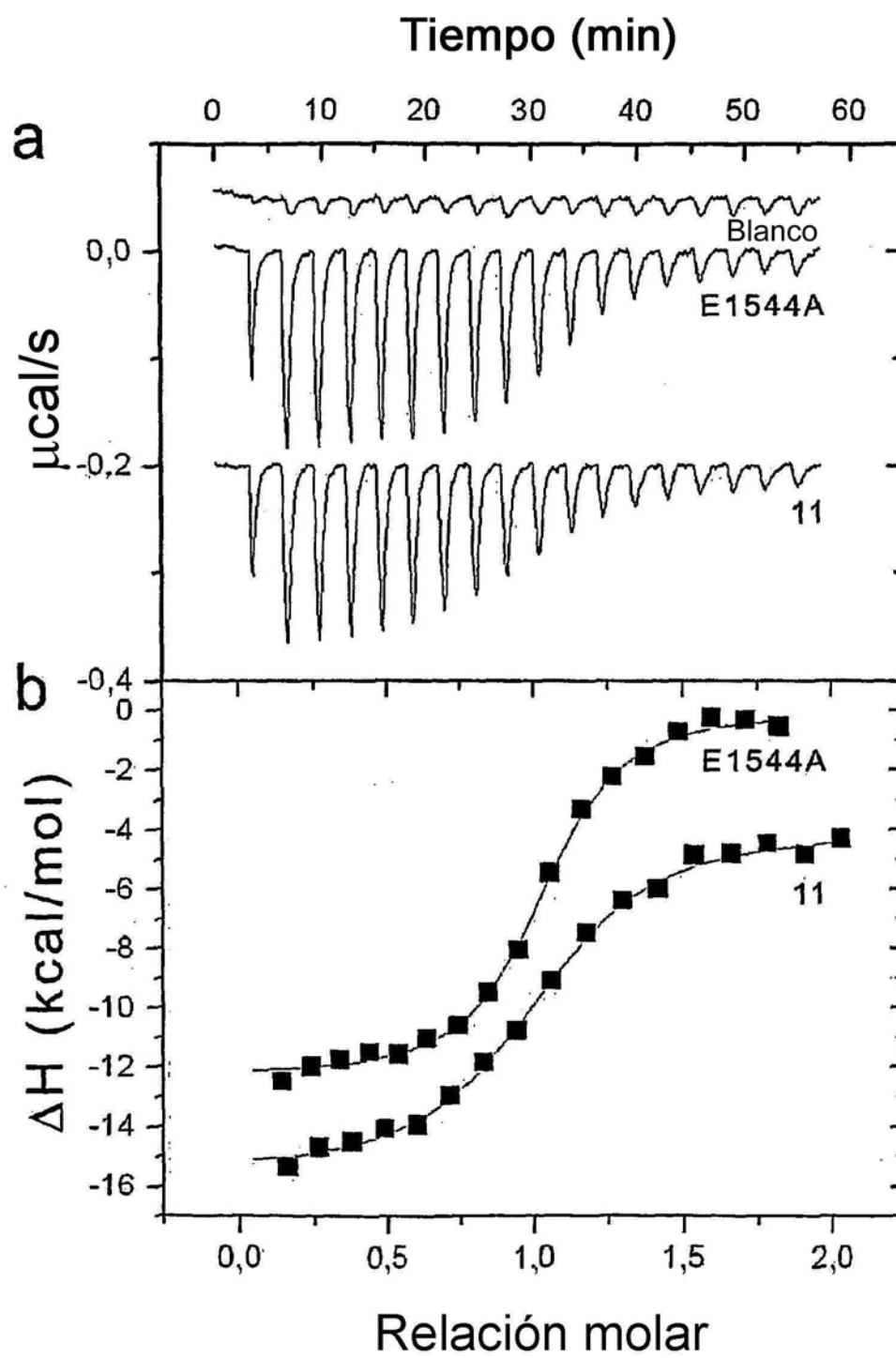


Figura 6

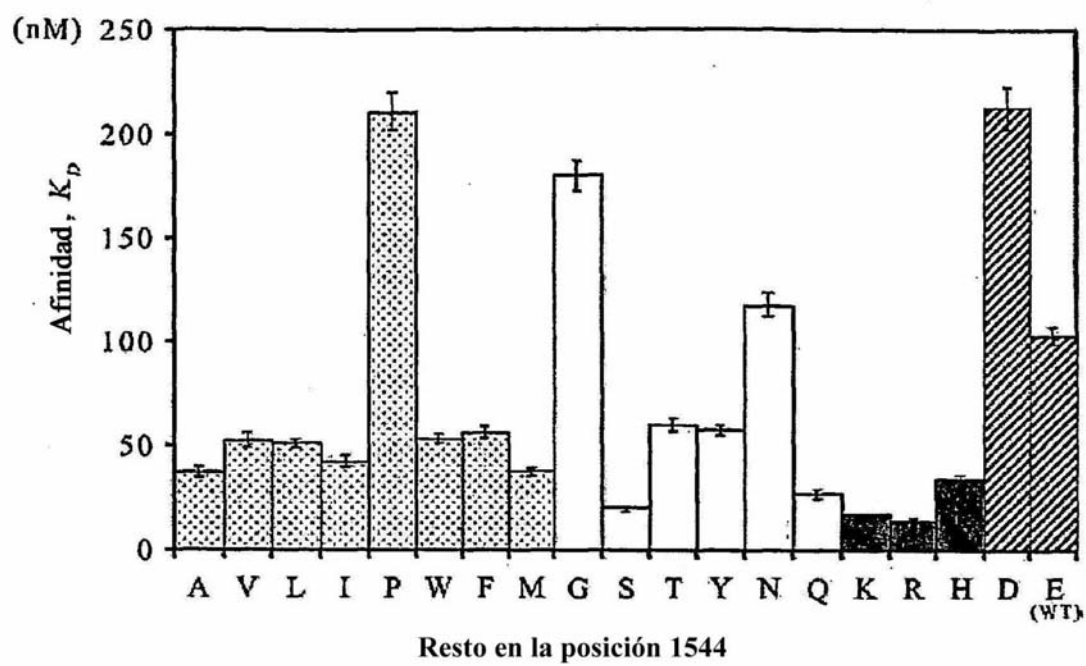


Figura 7

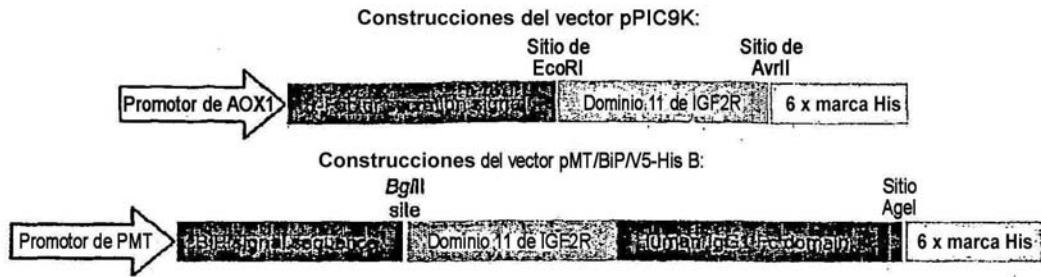


Figura 8

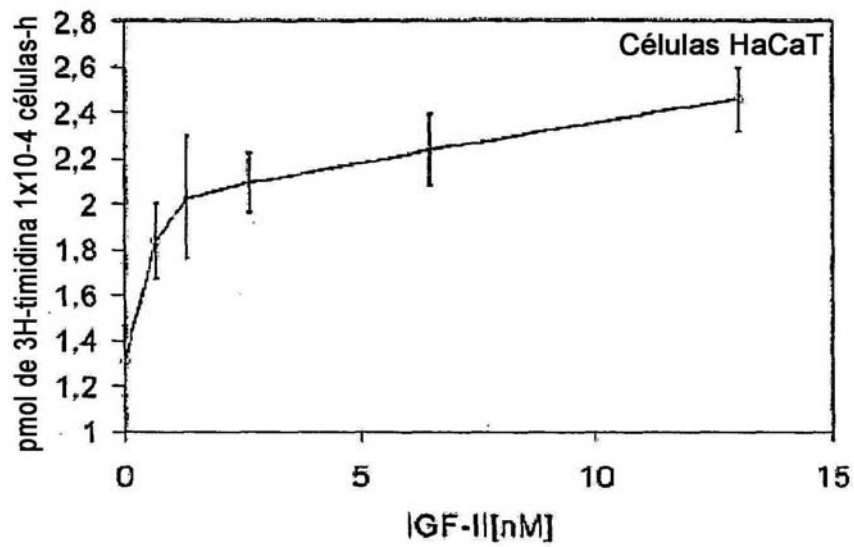


Figura 9

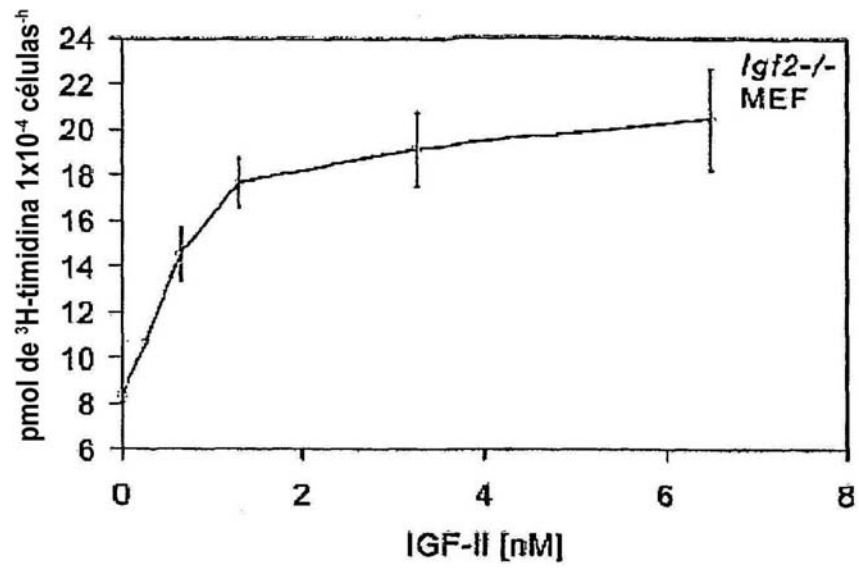


Figura 10

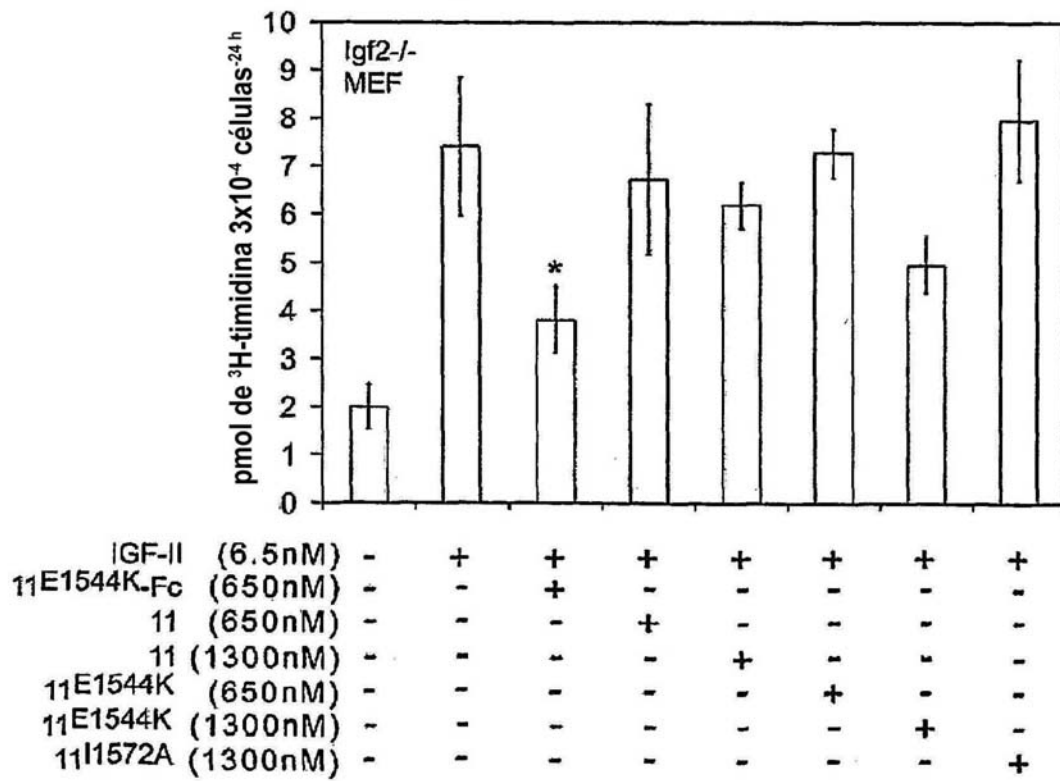


Figura 11

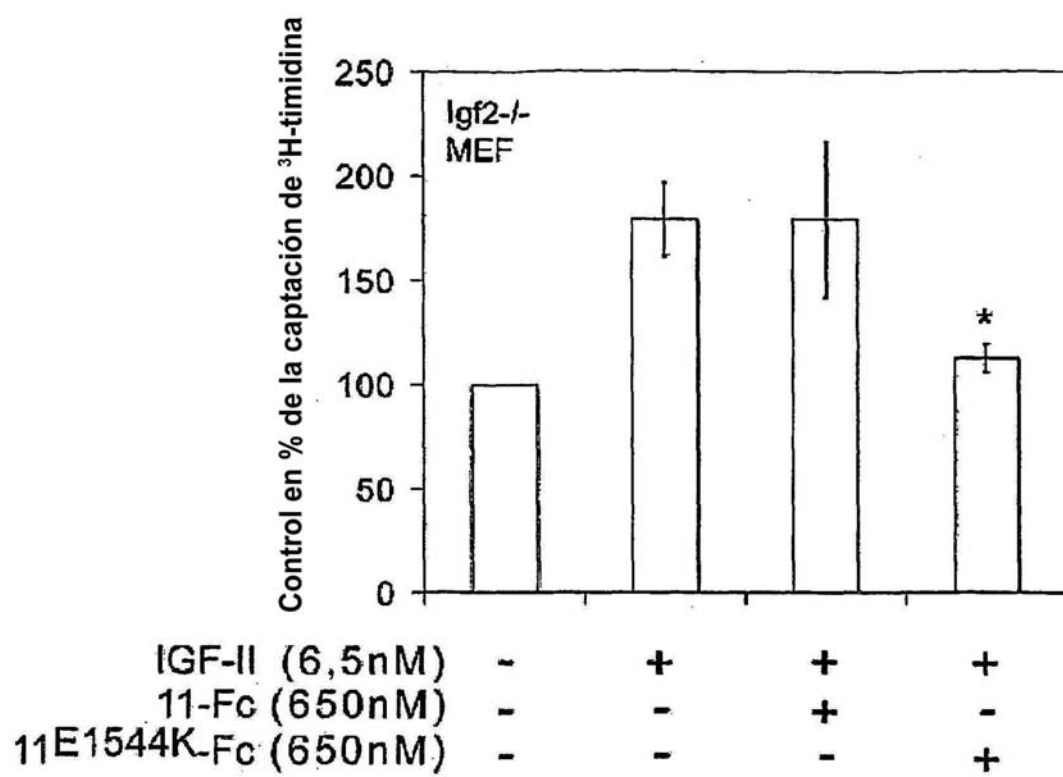


Figura 12

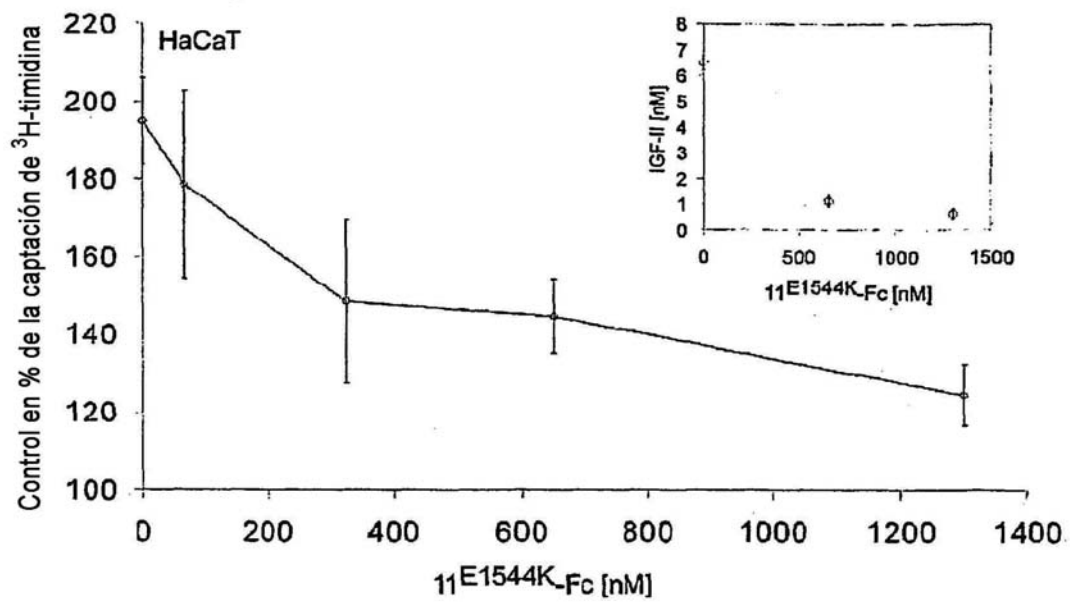


Figura 13

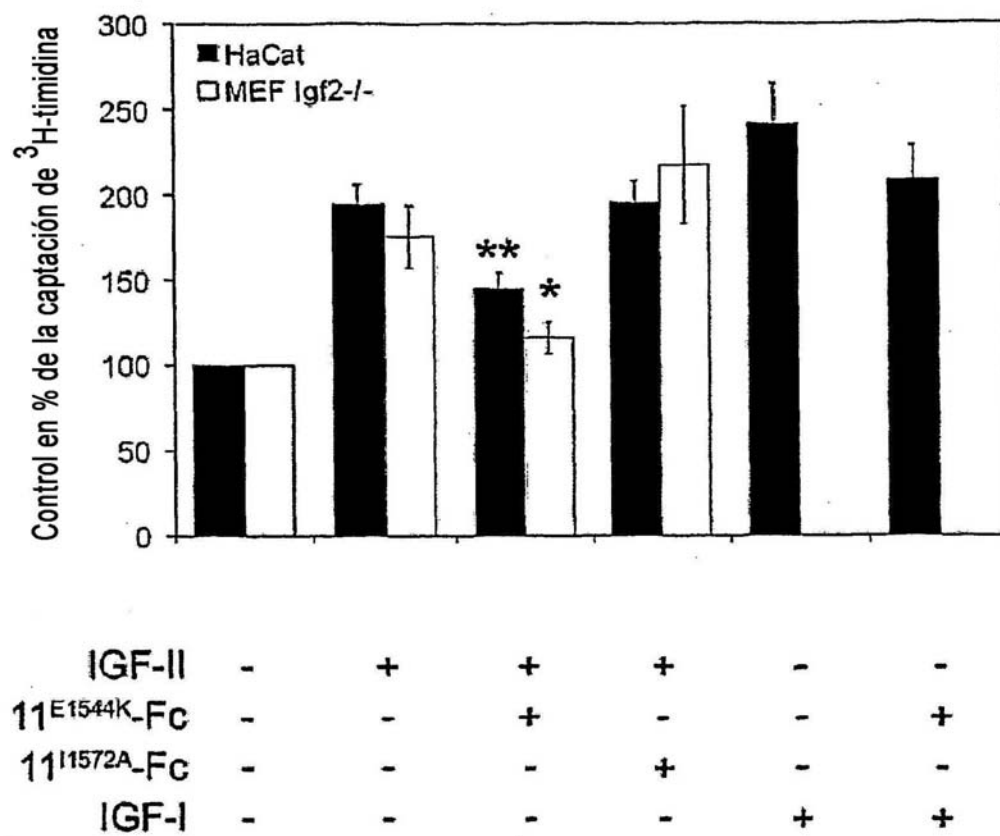


Figura 14

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el
 5 máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- 10 • Altschul et al. J. Mol. Biol, 1990, vol. 215, 405-410 [0016]
- Pearson ; Lipman. PNAS USA, 1988, vol. 85, 2444-2448 [0016]
- Smith ; Waterman. J. Mol Biol, 1981, vol. 147, 195-197 [0016]
- Nucl. Acids Res., 1997, vol. 25, 3389-3402 [0016]
- Murray, P. J. et al. Anal Biochem, 1995, vol. 229, 170-9 [0032]
- 15 • Stammers, D. K. et al. FEBS Lett, 1991, vol. 283, 298-302 [0032]
- Terpe. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2003, vol. 60, 523-533 [0032]
- Russell et al. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0039]
- Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 1992 [0039]
- 20 • Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Company, 1990 [0057]
- Dahms, N. M. et al. Biochim Biophys Acta, 2002, vol. 1572, 317-340 [0111]
- Hassan, A. B. Am J Pathol, 2003, vol. 162, 3-6 [0111]
- Ghosh, P. et al. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, vol. 4, 202-212 [0111]
- Oshima, A. et al. J Biol Chem, 1988, vol. 263, 2553-2562 [0111]
- 25 • Lobel, P. et al. J Biol Chem, 1988, vol. 263, 2563-2570 [0111]
- Olson, L. J. et al. Embo J, 2004, vol. 23, 2019-2028 [0111]
- Brown, J. et al. Embo J, 2002, vol. 21, 1054-1062 [0111]
- Roberts, D. L. et al. Cell, 1998, vol. 93, 639-648 [0111]
- Reddy, S. T. et al. J Biol Chem, 2004, vol. 279, 38658-38667 [0111]
- 30 • Dennis, P. A. et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991, vol. 88, 580-584 [0111]
- Hancock, M. K. et al. J Biol Chem, 2002, vol. 277, 11255-11264 [0111]
- Dahms, N. M. et al. J Biol Chem, 1993, vol. 268, 5457-5463 [0111]
- Garmroudi, F et al. Mol Endocrinol, 1996, vol. 10, 642-651 [0111]
- Schmidt, B. et al. J Biol Chem, 1995, vol. 270, 14975-14982 [0111]
- 35 • Linnell, J. et al. J Biol Chem, 2001, vol. 276, 23986-23991 [0111]
- Baker, J. et al. Cell, 1993, vol. 75, 73-82 [0111]
- Nielsen, F. C. Prog Growth Factor Res, 1992, vol. 4, 257-290 [0111]
- LeRoith, D. et al. Cancer Lett, 2003, vol. 195, 127-137 [0111]
- Foulstone, E. et al. J Pathol, 2005, vol. 205, 145-153 [0111]
- 40 • Oka, Y. et al. J Biol Chem, 1985, vol. 260, 9435-9442 [0111]
- Auletta, M. et al. J Neurosci Res, 1992, vol. 31, 14-20 [0111]
- Grimme, S. et al. J Biol Chem, 2000, vol. 275, 33697-33703 [0111]
- Terasawa, H. et al. Embo J, 1994, vol. 13, 5590-5597 [0111]
- Torres, A. M. et al. J Mol Biol, 1995, vol. 248, 385-401 [0111]
- 45 • Sakano, K. et al. J Biol Chem, 1991, vol. 266, 20626-20635 [0111]

- Forbes, B. E. et al. *Growth Factors*, 2001, vol. 19, 163-173 [0111]
- Haig, D. et al. *Cell*, 1991, vol. 64, ISSN 0092-8674, 1045-1046 [0111]
- Burns, J. et al. *Development*, 2001, vol. 128, 3819-3830 [0111]
- DeChiara, T. M. et al. *Nature*, 1990, vol. 345, 78-80 [0111]
- 5 • Wang, Z. Q. et al. *Nature*, 1994, vol. 372, 464-467 [0111]
- Lau, M. M. et al. *Genes Dev*, 1994, vol. 8, 2953-2963 [0111]
- Ludwig, T. et al. *Dev Biol*, 1996, vol. 177, 517-535 [0111]
- Kono, T. et al. *Nature*, 2004, vol. 428, 860-864 [0111]
- Young, L. E. et al. *Nat Genet*, 2001, vol. 27, 153-154 [0111]
- 10 • Christofori, G. et al. *Nature*, 1994, vol. 369, 414-418 [0111]
- Ravenel, J. D. et al. *J Natl Cancer Inst*, 2001, vol. 93, 1698-1703 [0111]
- Noshio, K. et al. *Clin Cancer Res*, 2004, vol. 10, 7950-7957 [0111]
- El-Badry, O. M. et al. *Cell Growth Differ*, 1990, vol. 1, 325-331 [0111]
- Zhan, S. et al. *Oncogene*, 1995, vol. 11, 2503-2507 [0111]
- 15 • Douc-Rasy, S. et al. *Oncogene*, 1996, vol. 12, 423-430 [0111]
- Kohda, M. et al. *Mol Carcinog*, 2001, vol. 31, 184-191 [0111]
- Gelato, M. C. et al. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990, vol. 71, 1168-1174 [0111]
- Cui, H. et al. *Science*, 2003, vol. 299, 1753-1755 [0111]
- Cruz-Correa, M. et al. *Gastroenterology*, 2004, vol. 126, 964-970 [0111]
- 20 • De Souza, A. T. et al. *Nat Genet*, 1995, vol. 11, 447-449 [0111]
- De Souza, A. T. et al. *Oncogene*, 1995, vol. 10, 1725-1729 [0111]
- Kong, F. M. et al. *Oncogene*, 2000, vol. 19, 1572-1578 [0111]
- Jamieson, T. A et al. *BMC Cancer*, 2003, vol. 3, 4 [0111]
- Devi, G. R. et al. *Cancer Res*, 1999, vol. 59, 4314-4319 [0111]
- 25 • O’Gorman, D. B. et al. *Endocrinology*, 2002, vol. 143, 4287-4294 [0111]
- Souza, R. F. et al. *Oncogene*, 1999, vol. 18, 4063-4068 [0111]
- Lee, J. S. et al. *Int J Cancer*, 2003, vol. 107, 564-570 [0111]
- Li, J. et al. *Oncogene*, 2004 [0111]
- Uson, I. et al. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2003, vol. 59, 57-66 [0111]
- 30 • Olson, L. J. et al. *J Biol Chem*, 1999, vol. 274, 29889-29896 [0111]
- Devi, G. R. et al. *Mol Endocrinol*, 1998, vol. 12, 1661-1672 [0111]
- Myszk, D. G. *Methods Enzymol*, 2000, vol. 323, 325-340 [0111]
- Lynch, G. W. et al. *Eur J Immunol*, 1999, vol. 29, 2590-2602 [0111]
- Reddy, S. T. et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, vol. 309, 643-651 [0111]
- 35 • Killian, J. K. et al. *Hum Mutat*, 2001, vol. 18, 25-31 [0111]
- MacDonald, R. G. et al. *Science*, 1988, vol. 239, 1134-1137 [0111]
- Tong, P. Y. et al. *J Biol Chem*, 1988, vol. 263, 2585-2588 [0111]
- Kreiling, J. L. et al. *J Biol Chem*, 2005, vol. 280, 21067-21077 [0111]
- Clairmont, K. B. et al. *J Biol Chem*, 1989, vol. 264, 16390-16392 [0111]
- 40 • Halperin, I. et al. *Structure (Camb)*, 2004, vol. 12, 1027-1038 [0111]
- Bogan, A. A. ; Thorn, K. S. *J Mol Biol*, 1998, vol. 280, 1-9 [0111]
- Keskin, O. et al. *J Mol Biol*, 2005, vol. 345, 1281-1294 [0111]
- Li, X. et al. *J Mol Biol*, 2004, vol. 344, 781-795 [0111]
- Li, Y. et al. *Structure (Camb)*, 2005, vol. 13, 297-307 [0111]
- 45 • Rajamani, D. et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, vol. 101, 11287-11292 [0111]

- Lowman, H. B. et al. J Mol Biol, 1993, vol. 234, 564-578 [0111]
- Lowman, H. B. et al. Biochemistry, 1991, vol. 30, 10832-10838 [0111]
- Pal, G. et al. J Mol Biol, 2003, vol. 332, 195-204 [0111]
- Wu, A. M. et al. Protein Eng, 2001, vol. 14, 1025-1033 [0111]
- 5 • Zaccheo, O. J. et al. J Mol Biol, 2006, vol. 359, 403-421 [0111]
- Kim, H. J. ; Kim, T. Y. J Invest Dermatol, 2004, vol. 123, 547-555 [0111]
- Barreca, A. et al. J Cell Physiol, 1992, vol. 151, 262-268 [0111]
- Scott, C. D. et al. Endocrinology, 1996, vol. 137, 873-878 [0111]
- Scott, C. D. et al. J Cell Physiol, 2000, vol. 182, 62-68 [0111]
- 10 • Breuhahn, K. et al. Cancer Res, 2004, vol. 64, 6058-6064 [0111]
- Killian J et al. Mol Cell, 2000, vol. 5, 707-716 [0111]