



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112015013708-3 B1



(22) Data do Depósito: 16/12/2013

(45) Data de Concessão: 18/10/2022

(54) Título: POLIPEPTÍDEO COMPREENDENDO UMA PROTEÍNA IGF-1 HUMANA, SEU USO, POLINUCLEOTÍDEO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: C07K 14/65.

(30) Prioridade Unionista: 18/12/2012 US 61/738,475.

(73) Titular(es): NOVARTIS AG.

(72) Inventor(es): MARA FORNARO; THOMAS HUBER; MAURO ZURINI.

(86) Pedido PCT: PCT IB2013060985 de 16/12/2013

(87) Publicação PCT: WO 2014/097116 de 26/06/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 11/06/2015

(57) Resumo: POLIPEPTÍDEOS DE FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE A INSULINA ESTABILIZADOS. Esta invenção está no campo de modificações de IGF-1. Em particular, refere-se a polipeptídeos de IGF-1 modificado e polipeptídeo de precursor de IGF-1s modificado em que a clivagem de E-peptídeo é prevenida. A invenção da mesma forma refere-se ao uso de tais polipeptídeos para tratar doenças e distúrbios musculares.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"POLIPEPTÍDEO COMPREENDENDO UMA PROTEÍNA IGF-1
HUMANA, SEU USO, POLINUCLEOTÍDEO E COMPOSIÇÃO
FARMACÊUTICA".**

CAMPO TÉCNICO

[001] Esta invenção está no campo de modificações de fatores de crescimento 1 semelhantes a insulina (IGF-1). Em particular, refere-se a polipeptídeos de IGF-1 modificados que são ligados a uma região de imunoglobulina Fc humana.

ANTECEDENTE

[002] Fatores de crescimento semelhantes a insulina (IGFs) fazem parte de um sistema complexo que células usam para comunicar-se com seu ambiente fisiológico. Este sistema complexo (frequentemente referido como o eixo de fator de crescimento semelhante a insulina) consiste em dois receptores de superfície de célula (IGF-1R e IGF-2R), dois ligantes (IGF-1 e IGF-2), uma família de seis proteínas de ligação de IGF de alta afinidade (IGFBP 1-6), e enzimas degradantes de IGFBP associadas (protease). Este sistema não é importante apenas para o regulamento de fisiologia normal porém da mesma forma para vários estados patológicos (Glass, Nat Cell Biol 5:87-90, 2003).

[003] O eixo de IGF foi mostrado desempenhar papéis na promoção de proliferação celular e a inibição de morte celular (apoptose). IGF-1 é principalmente segregado pelo fígado como um resultado de estímulo por hormônio de crescimento humano (hGH). Quase toda célula no corpo humano é afetada por IGF-1, especialmente células em músculos, cartilagem, ossos, fígado, rim, nervos, pele e pulmões. Além dos efeitos semelhantes a insulina, IGF-1 pode da mesma forma regular crescimento celular. IGF-1 e IGF-2 são regulados por uma família de produtos de gene conhecidos como as proteínas de ligação de IGF. Estas proteínas ajudam a modular ação de IGF de maneiras complexas

que envolvem igualmente inibição de ação de IGF prevenindo-se ligação aos receptores de IGF bem como promoção de ação de IGF através de liberação de ajuda aos receptores e aumentar meia-vida de IGF na corrente sanguínea. Há pelo menos seis proteínas de ligação caracterizadas (IGFBP1-6).

[004] Em sua forma madura, IGF-1 humano, da mesma forma denominado somatomedina, é uma proteína pequena de 70 aminoácidos que foram mostrados estimular crescimento de uma ampla faixa de células em cultura. A proteína IGF-1 é inicialmente codificada por três mRNAs variantes de união conhecidos. A estrutura de leitura aberta de cada mRNA codifica uma proteína de precursor contendo os 70 aminoácidos IGF-1 (SEQ ID NO.: 1) e um E-peptídeo particular ao C-terminal, dependendo do mRNA de IGF-1 particular. Estes E-peptídeos foram denominados os peptídeos de Ea (rsvraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm; SEQ ID NO.: 2), Eb (rsvraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgw-pkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkk gk; SEQ ID NO.: 3) e Ec (rsvraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgstfeerk; SEQ ID NO.: 4) e variam de 35 a 87 aminoácidos em comprimento e abrangem uma região de sequência comum no N-terminal e uma região de sequência variável no C-terminal. Por exemplo, a estrutura de leitura aberta tipo silvestre para o IGF-1-Ea codifica um polipeptídeo de 135 aminoácidos incluindo a sequência líder e um polipeptídeo de 105 aminoácidos sem a sequência líder (gpetlcgaelvdaqlqvcgdrfyfnkptgygssrrapqtgivdeccfrscdlrrlemyc-aplkpaksarsvraqrh tdmptqkevhlknasrgsagnknyrm; SEQ ID NO.: 5). A expressão fisiológica, os E-peptídeos são clivados fora do precursor por proteases endógenas, para produzir os 70 aminoácidos maduros IGF-1. A disponibilidade e meia-vida de IGF-1 em soro humano são principalmente influenciadas e moduladas por proteínas de ligação de proteases e IGF-1 (IGFBP). IGFBP pode inibir ou potencializar atividades de IGF-1 (Oh Y, e outro, Characterization of the affinities of

insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins 1-4 for IGF-I, IGF-II, IGF-I/insulin hybrid, and IGF-I analogs. *Endocrinology*. 1993 Mar;132(3):1337-44). Estratégias para aumentar a meia-vida de IGF-1 foram descritas na técnica anterior. Estratégias que foram contempladas são

(i) a produção de variantes de IGF-1 compreendendo mutações específicas visando prevenir a clivagem de IGF-1 em soro humano por serina proteases, ou aliviar o impacto negativo de proteínas de ligação de IGF-1 na disponibilidade ou meia-vida de soro de IGF-1 (WO200040613, WO05033134, WO2006074390, WO2007/146689,);

(ii) a produção de proteínas de fusão de IGF-1, em que a proteína IGF-1 madura é fundida em uma região de Fc de imunoglobulina humana (WO2005033134, WO200040613);

(iii) o uso de proteínas de precursor de IGF-1 em que clivagem do E-peptídeo de IGF-1 por uma protease é reduzida por modificação da proteína de precursor (WO2007146689);

(iv) combinações das estratégias descritas acima ((i)/(ii) WO05033134, (i)/(ii) WO200040613, (i)/(iii) WO2007146689).

[005] Apesar das estratégias descritas acima, as variantes precursoras de IGF-1 fundidas em uma região de Fc de imunoglobulina humana permanecem candidatos de fármaco pobres por principalmente duas razões: (i) baixo rendimento de produção em sistema de produção mamífero, e (ii) afinidade de ligação aumentada ao receptor de insulina (InsR) comparado ao IGF-1 tipo silvestre humano não modificado, que pode resultar em hipoglicemia, um evento adverso de preocupação terapêutica.

[006] Consequentemente, existe uma necessidade por uma tecnologia que supera os problemas da técnica anterior descritos acima. A presente invenção remete esta necessidade em vários aspectos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[007] Um primeiro assunto da descrição refere-se a um polipeptídeo compreendendo uma proteína IGF-1 humano (hIGF-1), em que a glicina de aminoácido na posição 42 da referida proteína de hIGF-1 é deletada ou substituída, e em que a numeração dos aminoácidos corresponde a SEQ ID NO.: 1.

[008] Uma modalidade adicional da descrição refere-se a um polipeptídeo compreendendo uma proteína IGF-1 humana fundida em uma região de Fc de imunoglobulina de um IgG humano, em que a glicina de aminoácido na posição 42 da proteína IGF-1 humana é deletada ou substituída, e em que a numeração dos aminoácidos corresponde a SEQ ID NO.: 1.

[009] Outro assunto da descrição refere-se a um polipeptídeo compreendendo uma proteína de precursor de IGF-1 humana, em que a glicina de aminoácido na posição 42 da referida proteína de precursor de IGF-1 humana é deletada ou substituída, e em que a numeração dos aminoácidos corresponde a SEQ ID NO.: 5.

[010] Uma modalidade adicional da descrição refere-se a um polipeptídeo compreendendo uma proteína de precursor de IGF-1 humana fundida em uma região de Fc de imunoglobulina de um IgG humano, em que a glicina de aminoácido na posição 42 da proteína de precursor de IGF-1 humana é deletada ou substituída, e em que a numeração dos aminoácidos corresponde a SEQ ID NO.: 5.

[011] Em uma certa modalidade a descrição refere-se aos polipeptídeos descritos acima, em que a glicina de aminoácido na posição 42 é deletada ou substituída por serina.

[012] Em uma modalidade adicional a proteína IGF-1 humana mencionada acima compreende deleções adicionais ou mutações em aminoácidos G1, P2, E3, R36, R37, K68, S69 e/ou A70.

[013] Em uma modalidade adicional a proteína de precursor de IGF-1 humana mencionada acima compreende um Ea-peptídeo e

deleções adicionais ou mutações de aminoácidos G1, P2, E3, R36, R37, K68, S69, A70, R71, S72, R74, R77 G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 e/ou M105.

[014] Em ainda outra modalidade que pode ser combinada com as modalidades anteriores da descrição a proteína de precursor de IGF-1 humana e a região de Fc são separadas por uma região de articulação de peptídeo.

[015] Desta maneira, a descrição da mesma forma refere-se à proteína de precursor de IGF-1 humana descrita acima, em que a região de articulação de peptídeo é selecionada a partir do grupo consistindo em peptídeos articulação 1 (SEQ ID NO.: 22), articulação 2 (SEQ ID NO.: 23) e articulação 3 (SEQ ID NO.: 24).

[016] Em uma modalidade particular as proteínas de precursor de IGF-1 humano descritas acima ao ser mutadas no Ea-peptídeo em aminoácidos R74, R77 e/ou R104, os referidos aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

[017] Um polipeptídeo compreendendo ou consistindo em uma proteína IGF-1 humana ou uma proteína de precursor de IGF-1 humana como descrito acima, em que

- a. aminoácidos E3, R71 e S72 são deletados,
- b. aminoácido G42 é deletado ou substituído por serina, e
- c. aminoácido R37 é mutado em alanina e em que a numeração dos aminoácidos corresponde a SEQ ID NO.: 5.

[018] Outra modalidade particular da descrição refere-se à proteína de precursor de IGF-1 humana descrita acima, em que o E-peptídeo é o Ea-peptídeo e em que

- a. aminoácidos G1, P2, E3, K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados,
- b. aminoácido G42 é deletado ou mutado em serina, e
- c. aminoácidos R36, R74, R77 e R104 são mutados em

glutamina

d. aminoácido R37 é mutado em alanina e em que a numeração dos aminoácidos corresponde a SEQ ID NO.: 5.

[019] Outra modalidade particular da descrição refere-se à proteína de precursor de IGF-1 humana descrita acima, em que o E-peptídeo é o Ea-petídeo e em que

a. aminoácidos G1, P2, E3, K68, S69, A70, R71, S72, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 e/ou M105 são deletados,

b. aminoácido G42 é deletado ou mutado em serina, e

c. aminoácidos R36, R74 e R77 são mutados em glutamina,

e

d. aminoácido R37 é mutado em alanina e em que a numeração dos aminoácidos corresponde a SEQ ID NO.: 5.

[020] Igualmente, a descrição refere-se à proteína de precursor de IGF-1 humana descrita acima, em que o E-peptídeo é o Ea-petídeo e em que

a. aminoácidos que G1, P2, E3, K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados,

b. aminoácido G42 é deletado ou mutado em serina,

c. aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina, e

d. aminoácido R37 é mutado em ácido glutâmico e em que a numeração dos aminoácidos corresponde a SEQ ID NO.: 5.

[021] Igualmente, a descrição refere-se à proteína de precursor de IGF-1 humana descrita acima, em que o E-peptídeo é o Ea-petídeo e em que

a. aminoácidos G1, P2, E3, K68, S69, A70, R71, S72, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 e/ou M105 são deletados,

- b. aminoácido G42 é deletado ou mutado em serina,
- c. aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina, e
- d. aminoácido R37 é mutado a ácido glutâmico e em que a numeração dos aminoácidos corresponde a SEQ ID NO.: 5.

[022] Em uma modalidade além disso particular a descrição refere-se à proteína de fusão de Fc de precursor de IGF-1 humano descrita acima, em que o E-peptídeo é o Ea-peptídeo e em que

- a. aminoácidos que G1, P2, E3, K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados,
- b. aminoácido G42 é deletado ou mutado em serina, e
- c. aminoácidos R36, R74, R77 e R104 são mutados em glutamina,
- d. aminoácido R37 é mutado em alanina, em que a numeração dos aminoácidos corresponde a SEQ ID NO.: 5, e
- e. em que a proteína de precursor de IGF-1 e a região de Fc são separadas pelo peptídeo de articulação articulação 1 (SEQ ID NO.: 22).

[023] Adicionalmente, a descrição refere-se à proteína de fusão de Fc de precursor de IGF-1 humano descrita acima, em que o E-peptídeo é o Ea-peptídeo e em que

- a. aminoácidos G1, P2, E3, K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados,
- b. aminoácido G42 é deletado ou mutado em serina,
- c. aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina,
- d. aminoácido R37 é mutado a ácido glutâmico, em que a numeração dos aminoácidos corresponde a SEQ ID NO.: 5, e
- e. em que a proteína de precursor de IGF-1 e a região de Fc são separadas pelo peptídeo de articulação, articulação 3 (SEQ ID NO.: 24).

[024] Em uma certa modalidade a descrição refere-se aos polipeptídeos descritos acima, em que a região de Fc é modificada para modular sua ligação a receptor de Fc.

[025] Desta maneira, a descrição refere-se à proteína de fusão de Fc de precursor de IGF-1 humana descrita acima, em que a região de Fc é modificada para

- I. reduzir sua afinidade para receptor de Fc;
- II. reduzir atividade de ADCC; ou
- III. prevenir atividade de ADCC.

[026] Outra modalidade particular da descrição refere-se à proteína de fusão de Fc de precursor de IGF-1 humana descrita acima compreendendo SEQ ID NO.: 8, ou SEQ ID NO.: 9, ou SEQ ID NO.: 10, ou SEQ ID NO.: 11, ou SEQ ID NO.: 12, ou SEQ ID NO.: 13, ou SEQ ID NO.: 14, ou SEQ ID NO.: 27.

[027] Em uma certa modalidade, que pode ser combinada com as modalidades anteriores da descrição a proteína de fusão de Fc de precursor de IGF-1 humana é glicosilada.

[028] Em outro aspecto, a descrição refere-se a um polinucleotídeo compreendendo uma molécula de ácido nucléico codificando a proteína de fusão de Fc de precursor de IGF-1 humana descrita acima. Desta maneira, a descrição refere-se a um polinucleotídeo compreendendo a molécula de ácido nucléico como descrito em SEQ ID NO.: 15 ou SEQ ID NO.: 16 ou SEQ ID NO.: 17 ou SEQ ID NO.: 18 ou SEQ ID NO.: 19 ou SEQ ID NO.: 20 ou SEQ ID NO.: 21.

[029] A descrição além disso fornece para uma composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo compreendendo qualquer uma das proteínas de precursor de IGF-1 humanas descritas acima para uso em terapia.

[030] Em outra modalidade da descrição, o uso terapêutico mencionado acima é o tratamento de um distúrbio muscular em um

paciente em necessidade do mesmo. Em uma modalidade particular da descrição, o uso terapêutico é o tratamento de pacientes de queimadura sofrendo de perda de massa corporal e/ou perda de massa muscular ou o tratamento de pacientes com COPD, ou o tratamento de pacientes de doença de Kennedy, ou o tratamento de pacientes de doença renal crônica.

[031] Em uma modalidade adicional da descrição, o distúrbio muscular descrito acima é atrofia muscular. Desta maneira, em alguns aspectos da descrição, o uso terapêutico é o tratamento de sarcopenia associada a obesidade, sarcopenia, e atrofia muscular associada a diabetes.

[032] A descrição além disso fornece para um método de tratar um distúrbio muscular em um paciente em necessidade do mesmo, o método compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz da proteína de precursor de IGF-1 humana descrita acima da invenção.

[033] Desta maneira, em uma modalidade particular, a descrição refere-se a um método de tratar pacientes de queimadura sofrendo de perda de massa corporal e/ou perda de massa muscular, ou um método de tratar os pacientes com COPD, ou um método de tratar os pacientes com doença de Kennedy, ou um método de tratar os pacientes de doença renal crônica

[034] Além disso, a descrição fornece um método de tratar um distúrbio muscular em um paciente em necessidade do mesmo, em que o distúrbio muscular é uma atrofia muscular selecionada a partir do grupo consistindo em sarcopenia associada a obesidade, sarcopenia, e atrofia muscular associada a diabetes.

[035] Em outra modalidade, a descrição refere-se a um polipeptídeo de IGF-1 ou um polipeptídeo de precursor de IGF-1 como descrito acima, em que a glicina de aminoácido na posição 42 é

deletada. Em outra modalidade, a descrição refere-se a um polipeptídeo de IGF-1 ou um polipeptídeo de precursor de IGF-1 como descrito acima, em que a referida proteína é pegilada.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1: Afinidade de ligação para IGF-1R

[036] Ligação de alta afinidade de hIGF-1 e variantes de IGF-1 em rhIGF1R foi medida usando ressonância de plásmon superficial (Biacore).

Figura 2 (A-D): Fosforilação de IGF-1R em transfectantes de célula NIH3T3-IGF-1R

[037] Células NIH3T3 super-expressam o receptor de IGF-1 humano (NIH3T3-IGF-1R) foram cultivadas durante 24 horas em meio de crescimento, privadas de alimentação durante 18 horas em meio livre de soro e foram estimuladas durante 10 minutos a 37°C com concentrações equimolares dos peptídeos indicados. Níveis de fosforilação de IGF-1R foram analisados por ELISA. Fosforilação de receptor é expressada como % de controle $\pm$ desvio-padrão (SD) (NIH 3T3 células de fibroblasto embrionárias de camundongo vêm de uma linhagem celular isolada e iniciada em 1962 no New York University School of Medicine Department of Pathology; Todaro GJ, Green H . Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. J. Cell Biol. 17: 299-313, 1963)

Figura 3 (A-D): Fosforilação de InsR em transfectantes de célula NIH3T3-InsR

[038] Células NIH3T3 superexpressam o receptor de insulina humano (NIH3T3-InsR) foram cultivadas durante 24 horas em meio de crescimento, privadas de alimentação durante 18 horas em meio livre de soro e estimuladas durante 10 minutos a 37°C com concentrações equimolares dos peptídeos indicados. Níveis de fosforilação de InsR foram analisados por ELISA. Fosforilação de receptor é expressada

como unidades arbitrárias $\pm$ desvio-padrão (SD).

Figura 4 (A-C): Fosforilação de IGF-1R em mioblastos primários humanos e cinomolgos

[039] Células foram cultivadas em meio de crescimento, privadas de alimentação durante 4 horas e em seguida estimuladas com hIGF-1 ou variantes de hIGF-1 durante 15 minutos a 37°C. Níveis de fosforilação de IGF-1R foram analisados por ELISA usando o fósforo-IGF1R humano DuoSet IC. Fosforilação de receptor é expressada como % de controle $\pm$ desvio-padrão (SD).

Figura 5 (A-D): Captação de glicose em miotubos de camundongo e adipócitos

[040] Adipócitos de 3T3-L1 (B e D) e miotubos de C2C12 de camundongo (A e C) célula foi semeada em placas de 24 cavidades e cultivadas em DMEM livre de soro durante 4 horas. DMEM livre de soro foi em seguida substituído com tampão de KRP ou HBS para adipócitos de 3T3-L1 e C2C12, respectivamente. Células foram tratadas durante 1 hora com os peptídeos especificados a 37°C. Captação de glicose foi medida adicionando-se 0,4 (adipócitos) ou 0,8 (C2C12) μ Ci de [³H] 2-desóxi-D-glicose e 0,1 (adipócitos) ou 0,01 (C2C12) mM 2-desóxi-D-glicose durante 10 (adipócitos) ou 5 (C2C12) minutos em temperatura ambiente. Radioatividade foi analisada por contagem de cintilação.

Figura 6: Captação de glicose: curso de tempo em adipócitos

[041] Adipócitos de 3T3-L1 foram semeados em placas de 24 cavidades e cultivados em DMEM livre de soro (Meio de Eagle Modificado de Dulbecco) durante 4 horas. DMEM livre de soro foi em seguida substituído com tampão de KRP e células foram tratadas durante 15, 60, 90 e 120 minutos com os peptídeos especificados a 37°C. Captação de glicose foi medida adicionando-se 0,4 μ Ci de [³H] 2-desóxi-D-glicose e 0,1 mM de 2-desóxi-D-glicose durante 10 minutos em temperatura ambiente. Radioatividade foi analisada por contagem

de cintilação. 3T3-L1 é uma linhagem celular derivada de células 3T3 que são usadas em pesquisa biológica em tecido adiposo; Green H, Kehinde O (1975). "An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion". Cell 5 (1): 19–27.

Figura 7 (A-B):

[042] Ratos machos adultos (n=3/grupo) receberam um bolo de injeção intravenosa (i.v.) ou subcutânea (s.c.) de hIGF-1-Ea-Fc_mut 13/2_A ou hIGF-1-Ea-Fc_mut 04/2_E a 10 mg/kg. Espécimes de sangue seriais foram coletadas em 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 168 e 336 horas depois da administração de material de teste. Concentrações de soro de proteínas recombinantes foram determinadas por ELISA.

Figura 8 (A-C): Efeitos de hIGF-1-Ea-Fc_mutantes contra atrofia muscular induzida por dexametasona.

[043] Mudanças de peso corporal (A), e muscular (B e C) de grupos (A) veículo, (B) Dex, (C) Dex com hIGF-1 em 3,8 mg/kg/dia s.c. infusão de minibomba, (D) Dex com hIGF-1-Ea-Fc_mut_13/2_A em 3 mg/kg/dia s.c. eod, (E) Dex com hIGF-1-Ea-Fc_mut_13/2_A em 10 mg/kg/dia s.c. eod, e (F) Dex com hIGF-1-Ea-Fc_mut_13/2_A em 3 mg/kg/dia s.c. Valores de eod são expressados como meios $\pm$ SEM (n=4-6). *: $P < 0,05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0,001$ versus grupo B, #### $P < 0,001$ versus grupo A (teste de comparação múltiplo de Dunnett seguindo ANOVA).

Figura 9: Produção de variantes de IGF-1 com mutações de G42 diferentes em células de HEK293

[044] Dados de produção de 100 ml de escala cultura de HEK293F transfectada com FuGene. Títulos foram medidos por proteína analítica A HPLC a partir dos sobrenadantes de cultura de célula clareados. Concentrações foram medidas depois da purificação da proteína A. Níveis de agregação de proteínas purificadas foram medidos por SEC-MALS.

Figura 10: Proporção de material cortado de hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc (SEQ ID NO. 6) (cinza escuro) e hIGF1-Ea-hFc_mut13/2_A (SEQ ID NO.9) (cinza claro) expressado de duas linhagens celulares de CHO diferentes. A proporção de material cortado foi determinada a partir da proteína purificada (cromatografia de proteína A) de células derivadas de CHOK1 transfectadas bem como células derivadas de CHO-DUX11. A proporção de cortar foi determinada por análise de LC-MS de fase reversa. A proporção de material cortado é significante mais baixa para hIGF1-Ea-hFc_mut13/2_A em ambas as linhagens celulares.

Figura 11: Crescimento celular de células derivadas de CHO-K1 expressando um anticorpo recombinante (linha em negrito) e células derivadas de CHO-K1 expressando hIGF-1Ea 3mut (SEQ ID NO.: 27) (linha pontilhada) em ciclos de biorreator. B: Porcentagem de células viáveis em ciclos de bioereator (anticorpo de linha em negrito produzindo clone derivado de CHO-K1, hIGF-1Ea de linha pontilhada 3mut expressando clones).

Figura 12: Número de célula viável: A linhagem contínua mostra o crescimento celular de células derivadas de CHO-K1. Durante co-cultivo com IGF-1 tipo silvestre ou hIGF-1Ea 3mut o crescimento celular é inibido (linha pontilhada e tracejada, respectivamente). A média de 3 réplicas biológicas é mostrada. IGF-1/hIGF-1Ea 3mut foi reforçado no dia 2 (reforçado em experiência). B: Viabilidade de célula: As linhas contínuas mostram a viabilidade celular de célula derivada de CHO-K1, tanto a linha pontilhada respectivamente tracejada quanto a viabilidade de célula reduzida depois do reforço de IGF-1/hIGF-1Ea 3mut. A viabilidade celular cai dois dias antes se as células fossem co-incubadas com IGF-1/hIGF-1Ea 3mut. Nenhuma diferença entre IGF-1 e hIGF-1Ea 3mut em crescimento celular ou viabilidade celular poderia ser detectado.

Figura 13: Crescimento celular de células derivadas de CHO-DUXB11 (linha em negrito) e o crescimento celular reduzido durante co-cultivo com IGF-1Ea 3mut (linhas pontilhadas) são mostrados. Depois de adicionar o IGF-1R inibidor de tirosina cinase NVPAEW541 (linha em negrito com asterisco) o crescimento celular é ligeiramente reduzido. Co-cultivo com IGF-1Ea 3mut e adicionando o inibidor de tirosina cinase IGF-1R resultou em nenhuma outra inibição de crescimento celular (linha pontilhada com asterisco).

Figura 14: Em negrito o crescimento celular de células derivadas de CHO-K1 tipo silvestre (WT) e em negrito com círculos o crescimento celular reduzido durante co-cultivo com IGF-1 é mostrado. Com linhas pontilhadas o crescimento celular dos três clones de IGF-1R KO é mostrado. O crescimento celular é ligeiramente melhorado comparado às células derivadas de CHO-K1 tipo silvestre. O co-cultivo com IGF-1 resultou em apenas inibição de crescimento celular menor e crescimento celular é similar a célula derivada de CHO-K1 tipo silvestre sem co-cultivo de IGF-1.

Figura 15: Títulos de proteína de fusão de IGF-1-Fc 14 dias de cultura de batelada (nível de mistura). As expressões de 7 proteínas de fusão de IGF-1-Fc diferentes em 5 linhagens celulares diferentes são realçadas. A expressão de proteínas de fusão de IGF-1-Fc foi 5-20 vezes aumentada em linhagens celulares de IGF-1R-KO derivadas de CHO-K1, linhagens celulares de IGF-1R-KO derivadas de CHO-DUXB11 bem como em shRNA derivado de CHO-DUXB11 (expressão reduzida de IGF-1R e INSR) linhagens celulares comparadas às linhagens celulares tipo silvestre derivadas de CHO-K1 ou CHO-DUXB11.

Figura 16: Títulos de fusão de IGF-1-Fc de culturas de batelada de 14 dias em 50 ml de frascos de agitação. Os títulos da proteína de fusão de IGF-1-Fc: hIGF-1-Ea-fc_mut 13/2_A em 15

melhores clones de IGF-1R-KO derivados de CHO-DUXB11 são aproximadamente 6-7 vezes mais altos comparados ao título da proteína de fusão de IGF-1-Fc: hIGF-1-Ea- Δ 1-3, R37A, Δ 71-72, domínio de R77Q-fc em clones de célula tipo silvestre derivados de CHO-DUXB11.

Figura 17: Produção e desafio de proteína de variantes de IGF-1 em células de HEK293F.

[045] Dados de produção de cultura de HEK293T de escala de 100 ml transfectada com PEI. Rendimento depois da proteína. Uma purificação extrapolada em 1 L de volume de cultura. Agregação medida por SEC-MALS depois da purificação da proteína A. Proteínas purificadas foram incubadas com meio de CHO condicionado de células derivadas de CHOK1 durante 5 dias e células derivadas de CHODUXB11 durante 20 dias. Porcentagem de proteína de tamanho natural restante é mostrada. Método descrito no Exemplo 2.

Figura 18: Fosforilação de InsR em transfectantes de célula de NIH3T3-InsR

[046] Células de NIH3T3 superexpressando o receptor de insulina humano (NIH3T3-InsR) foram cultivadas durante 24 horas em meio de crescimento, privadas de alimentação durante 18 horas em meio livre de soro e estimuladas durante 10 minutos a 37°C com concentrações equimolares dos peptídeos indicados. Níveis de fosforilação de InsR foram analisados por ELISA. Fosforilação de receptor é expressada como unidades arbitrárias $\pm$ desvios padrões (SD).

Figura 19: Captação de glicose em miotubos de camundongo e adipócitos

[047] Célula de adipócitos de 3T3-L1 (A) e miotubos de C2C12 de camundongo (B) foi semeada em placas de 24 cavidades e cultivada em DMEM livre de soro durante 4 horas. DMEM livre de soro foi em seguida substituído com tampão de KRP ou HBS por adipócitos de 3T3-

L1 e C2C12, respectivamente. Células foram tratadas durante 1 hora com os peptídeos especificados a 37°C. Captação de glicose foi medida adicionando-se 0,4 (adipócitos) ou 0,8 (C2C12) µCi de [³H] 2-desóxi-D-glicose e 0,1 (adipócitos) ou 0,01 (C2C12) mM de 2-desóxi-D-glicose durante 10 (adipócitos) ou 5 (C2C12) minutos em temperatura ambiente. Radioatividade foi analisada por contagem de cintilação.

DEFINIÇÕES GERAIS

[048] Para que a presente invenção possa ser mais facilmente entendida, certos termos são primeiro definidos. Definições adicionais são mencionadas ao longo da descrição detalhada.

[049] Compreendendo: o termo “compreendendo” significa “incluindo” por exemplo uma composição “compreendendo” X pode consistir exclusivamente em X ou pode incluir algo adicional por exemplo X + Y.

[050] O símbolo “Δ” ou as letras “d” ou “D”: no contexto de uma descrição de proteína (por exemplo “hIGF-1-Ea- Δ1-3, R37A, Δ 71-72, domínio de R77Q-fc” ou “hIGF-1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, domínio de R77Q-fc”) refere-se a uma deleção de aminoácido. Como um exemplo, o termo “D71-72, 77” (no contexto da proteína hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc) descreve o fato que os aminoácidos 71, 72 e 77 foram deletados.

[051] Proteína de fator de crescimento semelhante a insulina 1 ou uma variante da mesma: a frase “proteína de fator de crescimento semelhante a insulina 1 ou uma variante da mesma” refere-se a proteínas sendo codificadas por genes de fator de crescimento semelhante a insulina 1, particularmente preferida é a proteína de fator de crescimento semelhante a insulina humana 1 (hIGF-1) e variantes da mesma. Uma variante da proteína IGF-1 é uma proteína que difere-se em pelo menos um aminoácido da sequência tipo silvestre de IGF-1, em que o termo “sequência tipo silvestre” refere-se a um polipeptídeo ou

sequência de gene disponível em pelo menos um organismo de ocorrência natural ou um polipeptídeo ou sequência de gene que não foram mudadas, mutadas, ou de outra maneira manipulada pelo homem. O termo variante de IGF-1 e mimético de IGF-1 é usado alternadamente ao longo do documento. Uma variante de IGF-1 é da mesma forma a proteína de precursor de IGF-1 ou o a proteína pro-IGF-1 compreendendo uma sequência líder de peptídeo. Uma variante de IGF-1 é da mesma forma uma proteína de fusão compreendendo uma proteína IGF-1, por exemplo uma proteína compreendendo uma proteína IGF-1 fundida em um região de Fc de imunoglobulina. Exemplos para variantes de IGF-1 são descritos entre outros nos pedidos de patente WO05033134 (proteína IGF-1 estabilizada fundida em um região de Fc de imunoglobulina) e WO2007146689 (proteínas de precursor de IGF-1 estabilizada). Uma variante de IGF-1 como descrito acima retém sua atividade biológica no sentido tal que uma proteína pode ser considerada como um equivalente funcional da IGF-1 tipo silvestre.

[052] Equivalentes funcionais com respeito à proteína IGF-1 têm que ser entendidos como proteínas IGF-1 compreendendo mutação natural ou artificial. Mutações podem ser inserções, deleções ou substituições de um ou mais ácidos nucléico que não diminuem a atividade biológica da proteína IGF-1. Equivalentes funcionais tendo uma identidade de pelo menos 80%, preferivelmente 85%, mais preferivelmente 90%, preferivelmente mais do que 95%, muito especialmente preferivelmente pelo menos 98% de identidade - porém menos do que 100% de identidade para a proteína IGF-1 tipo silvestre, por exemplo a proteína IGF-1 humana SEQ ID NO.: 1. No caso de proteínas de fusão como descrito acima, a identidade de 100% será definida apenas na base da parte de IGF-1 de uma tal proteína de fusão.

[053] Fatores de crescimento semelhantes a insulina (IGFs) fazem

parte de um sistema complexo que células usam para comunicar-se com seu ambiente fisiológico. Este sistema complexo (frequentemente referido como o eixo de fator de crescimento semelhante a insulina) consiste em dois receptores de superfície de célula (IGF-1R e IGF-2R), dois ligantes (IGF-1 e IGF-2), uma família de seis proteínas de ligação de IGF de alta afinidade (IGFBP 1-6), e enzimas degradantes de IGFBP associadas (protease). Este sistema é importante não apenas para a regulação de fisiologia normal porém da mesma forma para vários estados patológicos (Glass, Nat Cell Biol 5:87-90, 2003). O eixo de IGF foi mostrado desempenhar papéis na promoção de proliferação celular e a inibição de morte celular (apoptose). IGF-1 é principalmente segregado pelo fígado como um resultado de estímulo por hormônio de crescimento humano (hGH). Quase toda célula no corpo humano é afetada por IGF-1, especialmente células em músculos, cartilagem, ossos, fígado, rim, nervos, pele e pulmões. Além dos efeitos semelhantes a insulina, IGF-1 pode da mesma forma regular crescimento celular. IGF-1 e IGF-2 são regulados por uma família de produtos de gene conhecidos como as proteínas de ligação de IGF. Estas proteínas ajudam modular ação de IGF de maneiras complexas que envolvem igualmente inibir ação de IGF prevenindo-se ligação aos receptores de IGF bem como promover ação de IGF para ajudar liberação aos receptores e aumentar meia-vida de IGF na corrente sanguínea. Há pelo menos seis proteínas de ligação caracterizadas (IGFBP1-6). IGF-1 é usado em uma ampla faixa de aplicações terapêuticas. Mecasermina (marca Increlex™) é um análogo sintético de IGF-1 que é aprovado para o tratamento de insuficiência de crescimento. Várias companhias avaliaram IGF-1 em tentativas clínicas para uma variedade de indicações adicionais, incluindo diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, esclerose lateral amiotrófica, lesão por queimadura severa e distrofia muscular miotônica.

[054] Por causa de clareza e consistência, a numeração de resíduos de aminoácido em precursor de IGF-1 ou proteínas maduras ao longo deste pedido e nas reivindicações está com base na numeração de sequência de proteína de precursor tipo silvestre semelhante a insulina do fator de crescimento humano 1 (somatomedina C), isoforma CRA_c (no. de acesso EAW97697) sem peptídeo de sinal (isto é SEQ ID NO.: 5).

[055] Célula de mamífero: o termo “célula de mamífero” no contexto do método descrito refere-se a células de mamífero que são adequadas para produção de proteína em escala de fabricação industrial. Essas células são bem conhecidas à pessoa versada e originaram por exemplo de *Cricetulus griseus*, *Cercopithecus aethiops*, *Homo sapiens*, *Mesocricetus auratus*, *Mus musculus* e *Chlorocebus species*. As respectivas linhagens celulares são conhecidas como células de CHO (Ovário de *Hamster* chinês), células de COS (uma linhagem celular derivada de rim de macaco (macaco verde africano), células de Vero (células epiteliais de rim extraídas de macaco verde africano), células de Hela (A linha foi derivada de células de câncer cervical tiradas de Henrietta Lacks), células de BHK (células de rim de *hamster* bebê, células de HEK (Rim Embrionário Humano), células de NS0 (linhagem celular de mieloma de Murino), células de C127 (linhagem celular de camundongo não tumorigênico), células de PerC6® (linhagem celular humana, Crucell), células de CAP (Produção de Amniócito de CEVEC) e células de Sp-2/0 (células de mieloma de Camundongo).

[056] O termo “especificidade de receptor de proteínas da técnica anterior de IGF-1 estabilizado” no contexto deste pedido da mesma forma refere-se à capacidade reduzida de induzir fosforilação de receptor de insulina (potência e/ou eficácia diminuída) das moléculas de IGF-1 das invenções comparadas à variantes de IGF-1 da técnica

anterior, que reduzem o risco de induzir hipoglicemia, um evento adverso de preocupação terapêutica.

[057] Precursor: No seguinte, o termo “precursor” quando usado no contexto da presente invenção deve se referir ao precursor da proteína IGF-1 humana madura sem peptídeo de sinal, porém incluindo o peptídeo Ea, Eb e Ec, respectivamente.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[058] Moléculas compreendendo um Ea-peptídeo fundido em uma região de Fc de imunoglobulina, em que os resíduos de proteína G1, P2, E3, R71 e S72 foram deletados, o aminoácido R77 foi deletado ou substituído por glutamina e o aminoácido R37 foi substituído por alanina (domínio de hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72, 77-fc (SEQ ID NO.: 6) e domínio de hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72, R77Q-fc (SEQ ID NO.: 7)) foi produzido e testado. Expressão de um domínio de hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72del71-72, 77-fc (SEQ ID NO.: 6) em um sistema de célula de mamífero não foi possível, por causa de questões de agregação e degradação (mais do que 90% da proteína produzida foi degradada; veja figura 10)

[059] Além disso, o domínio de hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72del71-72, 77-fc (SEQ ID NO.: 6) proteínas mostraram uma diminuição em especificidade de receptor comparada ao IGF-1 maduro não modificado em um ensaio de fosforilação de NIH3T3 InsR (veja figura 3).

[060] Consequentemente, as variantes de precursor de IGF-1 fundidas em uma região de Fc de imunoglobulina humana são os candidatos de fármaco pobres, porque (i) baixo rendimento de produção em sistema de produção mamífero, e (ii) aumentou afinidade de ligação ao receptor de insulina (InsR) comparado ao IGF-1 tipo silvestre humano não modificado que pode resultar em hipoglicemia um evento adverso de preocupação terapêutica.

[061] A invenção está com base na observação surpreendente que (1) rendimento de produção em sistemas de produção de célula de mamífero e (2) a especificidade de receptor de proteínas IGF-1 nativas ou proteínas da técnica anterior IGF-1 estabilizada podem ser melhoradas introduzindo mutações de aminoácido específicas adicionais, em que mutações diferentes resolvem problemas diferentes e as referidas mutações podem ser combinadas para focalizar questões múltiplas relacionadas a rendimento de produção, eficácia e/ou especificidade de receptor.

[062] Um resultado surpreendente particular foi a observação que proteína IGF-1 humana (SEQ ID NO.: 1) sendo mutada na posição G42 (substituições de G42S) induz captação de glicose mais baixa em miotubo de C2C12 e adipócito (3T3-L1) sistemas *in vitro* comparados a IGF-1 tipo silvestre humano não modificado, que poderia reduzir o risco de hipoglicemia de tratamento de IGF-1 *in vivo* (figura 18).

[063] Um resultado além disso particular surpreendente foi a observação que proteínas da técnica anterior de precursor de IGF-1 humano sendo mutadas na posição G42 (deleção ou substituições específicas) mostra uma capacidade similar de estimular fosforilação de receptor de insulina (InsR) o IGF-1 tipo silvestre humano não modificado que diminui o risco de hipoglicemia das variantes de IGF-1 da técnica anterior (figura 3). Ainda mais surpreendente foi a observação que a mutação de G42S tem um impacto positivo adicional no rendimento de produção de proteínas da técnica anterior de precursor de IGF-1 humano sendo fundidas em um região de Fc de imunoglobulina em célula de mamífero (figura 10/17), isto é a formação de agregados negativamente impactando rendimento de produção poderia ser dramaticamente reduzida introduzindo-se uma mutação de G42S (figura 9/17). Consequentemente, a invenção é alguma extensão com base na constatação surpreendente, que manipulando-se a glicina de

aminoácido 42 em proteína IGF-1 humana ou variantes de precursor de IGF-1 humana do mesmo, duas barreiras técnicas principais no desenvolvimento de variantes de IGF-1 terapêuticas poderiam ter sido superadas. Em outro aspecto a invenção fornece uma solução para o problema que proteínas de precursor de IGF-1 da técnica anterior sendo fundidas em um região de Fc de imunoglobulina de um IgG humano não podem ser produzidas em escala industrial em células de mamífero, porque as referidas proteínas de fusão estão sendo facilmente degradadas por protease de célula de mamífero. Consequentemente, em outro aspecto a invenção está baseado na constatação surpreendente que manipulando-se aminoácidos específicos em variantes de precursor de IGF-1 Ea-peptídeo uma barreira técnica principal adicional no desenvolvimento de variantes de precursor de IGF-1 terapêuticas poderia ter sido superada.

[064] Exemplos de tais moléculas incluem, porém não são limitados, aos seguintes polipeptídeos:

[065] Uma proteína IGF-1 humana (SEQ ID No.: 1) em que o aminoácido G42 é deletado.

[066] Uma proteína IGF-1 humana (SEQ ID No.: 1) em que o aminoácido G42 é substituído pela serina de aminoácido.

[067] Uma proteína IGF-1 humana (SEQ ID No.: 1) em que o aminoácido G42 é substituído pela serina de aminoácido e em que o(s) aminoácido(s)

(a) G1, P2, E3 são deletados e aminoácido R36 é substituído ou deletado; ou

(b) G1, P2, E3 são deletados e aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q); ou

(c) G1, P2, E3 são deletados e aminoácido R37 é substituído ou deletado; ou

(d) G1, P2, E3 são deletados e aminoácido R37 é substituído

por ácido glutâmico (E); ou

(e) G1, P2, E3 são deletados e aminoácido R37 é substituído por alanina; ou

(f) G1, P2, E3 são deletados e aminoácido R37 é substituído por prolina (P); ou

(g) G1, P2, E3 são deletados e aminoácidos R36 e R37 são substituídos ou deletados; ou

(h) G1, P2, E3 são deletados e aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q); ou

G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q) e R37 é substituído por alanina.

[068] Uma proteína IGF-1 humana (SEQ ID No.: 1) em que o aminoácido G42 é substituído pela serina de aminoácido e em que o aminoácido E3 é deletado e aminoácido R37 é substituído por alanina.

[069] Uma proteína IGF-1 humana (SEQ ID No.: 1) em que o aminoácido G42 é substituído pela serina de aminoácido e em que o aminoácido E3 é deletado e aminoácido R37 é substituído por alanina fundida em uma região de Fc de imunoglobulina, particularmente uma região de Fc modificada, particularmente uma região de Fc, que é modificada para modular sua ligação ao receptor de Fc como descrito abaixo.

[070] Outro polipeptídeo da invenção é a proteína IGF-1 humana de SEQ ID NO.: 117.

[071] Outro polipeptídeo da invenção é a proteína de precursor de IGF-1 humana de SEQ ID NO.: 118.

[072] Foi detectado que a mutação ou deleção de aminoácidos R74, R77, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 e/ou M105 das proteínas de precursor de IGF-1 Ea peptídeo da técnica anterior mencionadas acima levam a um rendimento mais alto de proteína não degradada quando expressada por células de mamífero.

Foi além disso detectado que combinação das mutações/deleções mencionadas nas posições R74, R77, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 e/ou M105 resulta em um efeito sinérgico. Portanto, em uma modalidade R74, R77, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 e/ou M105, contanto que a proteína IGF-1 modificada compreenda o Ea-peptídeo (SEQ ID NO.: 2), seja deletada ou mutada nas proteínas de precursor de IGF-1 modificadas descritas aqui. Em uma modalidade, R74, R77 e/ou R104 são mutados em Q nas proteínas de precursor de IGF-1 descritas aqui. Em uma outra modalidade, K68, S69, A70, R71 e/ou R72 pode adicionalmente ser deletada ou mutada nas proteínas de precursor de IGF-1 modificadas descritas aqui.

[073] Desta maneira, a invenção fornece um polipeptídeo contendo uma proteína de precursor de IGF-1 humana, isto é compreendendo o Ea-peptídeo de IGF-1 humano, em que a glicina de aminoácido na posição 42 é deletada ou substituída por outro aminoácido e em que a numeração dos aminoácidos corresponde a SEQ ID NO.: 5. O E-peptídeo pode ser o Ea, Eb, ou Ec peptídeo (SEQ ID NOs: 2-4). Em uma modalidade particular, a glicina de aminoácido na posição 42 é deletada ou substituída pelo aminoácido ou serina.

[074] Em uma modalidade, a proteína de precursor de IGF-1 Ea-peptídeo humana descrita acima sendo mutada na posição G42 como descrito acima (deletada ou mutada em serina) compreende deleções e/ou mutações adicionais em aminoácidos G1, P2, E3, R36, R37, K68, S69, A70, R71, S72, R74, R77, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 e/ou M105, em que a numeração dos aminoácidos corresponde a SEQ ID NO.: 5.

[075] Exemplos de tais moléculas incluem, porém não são limitados, aos seguintes polipeptídeos:

[076] Um polipeptídeo compreendendo uma proteína de precursor

de IGF-1 Ea-peptídeo humana em que o aminoácido G42 é substituído pela serina de aminoácido e em que o(s) aminoácido(s)

(1) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído ou deletado e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

(2) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

(3) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído ou deletado e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

(4) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

(5) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

(6) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por prolina (P) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

(7) G1, P2, E3 são deletados, aminoácidos R36 e R37 são substituídos ou deletados e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

(8) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

(9) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), R37 é substituído por alanina e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

(10) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído ou deletado e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácido R77 é mutado em glutamina (Q).

(11) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído ou deletado e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(12) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído ou deletado e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e Q104 são mutados em glutamina (Q).

(13) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

(14) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(15) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

(16) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácido R77 é mutado em glutamina (Q).

(17) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(18) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

(19) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina (A) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

(20) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina (A) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(21) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina (A) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina

(22) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por prolina (P) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

(23) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por prolina (P) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(24) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por prolina (P) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina

(25) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

(26) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(27) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), R37 é substituído por alanina e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(28) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

(29) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), R37 é substituído por alanina e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

(1a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído ou deletado e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

(2a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são

deletados.

(3a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído ou deletado e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

(4a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

(5a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

(6a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por prolina (P) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

(7a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácidos R36 e R37 são substituídos ou deletados e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

(8a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

(9a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), R37 é substituído por alanina e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

(10a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído ou deletado e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

(11a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído ou deletado e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(12a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído ou deletado e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e Q104 são mutados em glutamina (Q).

(13a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

(14a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(15a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

(16a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

(17a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(18a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

(19a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina (A) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

(20a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina (A) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(21a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina (A) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em

glutamina

(22a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por prolina (P) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

(23a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por prolina (P) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(24a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por prolina (P) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina

(25a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

(26a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(27a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), R37 é substituído por alanina e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(28a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

(29a) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), R37 é substituído por alanina e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

[077] Em outra modalidade a descrição refere-se às proteínas descritas acima compreendendo os polipeptídeos (1)-(29a), em que as referidas moléculas em vez de ser mutadas nas posições 1-3, apenas o aminoácido E3 é deletado (por exemplo a molécula (28a) poderia da mesma forma se referir a um polipeptídeo compreendendo uma proteína de precursor de IGF-1 Ea-peptídeo humana em que o aminoácido G42 é substituído pela serina de aminoácido e em que o aminoácido E3 é deletado, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q), os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).)

[078] Adicionalmente, a descrição refere-se a um polipeptídeo contendo uma proteína de precursor de IGF-1 humana, isto é compreendendo o Ea-peptídeo de IGF-1 humano, que é fundido em uma região de Fc de imunoglobulina e em que a glicina de aminoácido na posição 42 é substituída por outro aminoácido e em que a numeração dos aminoácidos da parte de IGF-1 da referida proteína corresponde a SEQ ID NO.: 5. O E-peptídeo pode ser o peptídeo Ea, Eb, ou Ec e o aminoácido pelo qual a glicina na posição 42 é substituída é serina.

[079] Desse modo, em uma modalidade, a descrição refere-se a um polipeptídeo compreendendo uma proteína de precursor de IGF-1 humana; (a) em que o aminoácido G42 é deletado ou substituído pela serina de aminoácido; e (b) que é ligado a uma região de Fc de imunoglobulina, particularmente uma região de Fc modificada, particularmente uma região de Fc que é modificada para modular sua ligação ao receptor de Fc. Por exemplo, um ou mais aminoácidos podem ser substituídos com um resíduo de aminoácido diferente tal que a região de Fc tem uma afinidade alterada para o receptor de Fc ou o componente de C1 de complemento. Assim chamado regiões de Fc de imunoglobulina silenciadas foram descritas na técnica: LALA e N297A (Strohl, W., 2009, Curr. Opin. Biotechnol. vol. 20(6):685-691); e D265A

(Baudino e outro, 2008, J., Immunol. 181: 6664-69; Strohl, W., supra). Exemplos de anticorpos de IgG1 de Fc silenciosos compreendem o denominado mutante de LALA compreendendo mutação de L234A e L235A na sequência de aminoácido IgG1 Fc. Outro exemplo de um anticorpo de IgG1 silencioso compreende a mutação de D265A. Outro anticorpo de IgG1 silencioso compreende a mutação de N297A, que resulta em anticorpos aglicosilados/não aglicosilados.

[080] A abordagem de LALA mencionada acima é descrita em outro detalhe em US5,624,821 e US5,648,260 ambos por Winter e outro. Desse modo em uma modalidade a proteína de precursor de hIGF-1 descrita é fundida em uma região de Fc compreendendo a mutação de L234A e L235A ou a mutação de D265A ou a mutação de N297A. Tais construtores de Fc LALA, D265A ou N297A reduziram atividade de ADCC

[081] Em uma modalidade, o polipeptídeo contendo uma proteína de precursor de IGF-1 Ea-peptídeo humana fundida em um região de Fc de imunoglobulina, em que a glicina de aminoácido na posição 42 é substituída pela serina de aminoácido, compreende deleções e/ou mutações adicionais em aminoácidos G1, P2, E3, R36, R37, K68, S69, A70, R71, S72, R74, R77 e/ou R104.

[082] Exemplos de tais moléculas incluem, porém não são limitados, aos seguintes polipeptídeos,:

[083] Um polipeptídeo contendo uma proteína de precursor de IGF-1 Ea-peptídeo humana fundida em uma região de Fc de imunoglobulina em que a glicina de aminoácido na posição 42 é substituída pela serina de aminoácido, em que a numeração dos aminoácidos da parte de IGF-1 da referida proteína corresponde a SEQ ID NO.: 5 e em que o(s) (aminoácido(s)

(1b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído ou deletado e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

(2b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

(3b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído ou deletado e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

(4b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

(5b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

(6b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por prolina (P) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

(7b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácidos R36 e R37 são substituídos ou deletados e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

(8b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

(9b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), R37 é substituído por alanina e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

(10b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído ou deletado e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

(11b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído ou deletado e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(12b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído ou deletado e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e Q104 são mutados em glutamina (Q).

(13b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

(14b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(15b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

(16b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácido R77 é mutado em glutamina (Q).

(17b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(18b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

(19b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina (A) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

(20b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina (A) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(21b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina (A) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

(22b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por prolina (P) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

(23b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por prolina (P) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(24b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por prolina (P) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

(25b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

(26b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(27b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), R37 é substituído por alanina e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(28b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q) e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

(29b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), R37 é substituído por alanina e os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

(1c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído ou deletado e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

(2c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

(3c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído ou deletado e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

(4c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

(5c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

(6c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por prolina (P) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

(7c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácidos R36 e R37 são substituídos ou deletados e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

(8c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

(9c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), R37 é substituído por alanina e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

(10c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído ou deletado e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

(11c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído ou deletado e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(12c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído ou deletado e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e Q104 são mutados em glutamina (Q).

(13c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

(14c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(15c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

(16c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

(17c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(18c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q). (19c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina (A) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

(20c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina (A) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(21c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina (A) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina

(22c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por prolina (P) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

(23c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por prolina (P) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(24c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por prolina (P) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

(25c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

(26c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

27c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), R37 é substituído por alanina e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

(28c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

(29c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), R37 é substituído por alanina e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

[084] Em outra modalidade a descrição refere-se às proteínas descritas acima compreendendo os polipeptídeos descritos acima (1b)-(29c), em que as referidas moléculas em vez de ser mutadas nas posições 1-3, apenas o aminoácido E3 é deletado (por exemplo a molécula (28c) poderia da mesma forma se referir a um polipeptídeo compreendendo uma proteína de precursor de IGF-1 humana fundida em um região de Fc de imunoglobulina em que o aminoácido G42 é substituído pela serina de

aminoácido e em que o(s) (aminoácido(s) E3 (é) são deletado(s), aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).)

[085] Em outra modalidade a descrição refere-se aos polipeptídeos descritos acima (por exemplo os polipeptídeos 1-29c), compreendendo um E-peptídeo mutado consistindo nos aminoácidos

a) VQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASG (SEQ ID. NO.: 25), ou

b) VQAQQHTDMPKTQKYQPPATNKNTKSQRRKGS (SEQ ID. NO.: 26).

c) VQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSGAGNKNYQM (SEQ NO: 115)

[086] Em uma outra modalidade, a descrição fornece a proteína de precursor de IGF-1 descrita acima que é fundida em uma região de Fc, em que a região de Fc pode ser diretamente fundida ao polipeptídeo de precursor de IGF-1 modificado ou pode ser conectada por uma região de articulação usando tecnologias de DNA recombinante bem conhecidas na técnica. Se uma região de articulação de DNA for usada, a região de Fc pode ser conectada a qualquer parte do polipeptídeo de precursor de IGF-1 modificado. Em uma modalidade a região de Fc é fundida diretamente ao C-terminal do polipeptídeo de precursor de IGF-1 modificado. Em outra modalidade, a região de Fc é ligada ao C-terminal do polipeptídeo de precursor de IGF-1 modificado por um ligante de Gly Ser (-GS-).

[087] Um ligante de DNA pode ser usado para fornecer um sítio de restrição entre componentes para facilidade de manipulação. Um ligante pode da mesma forma ser fornecido para aumentar expressão do polipeptídeo de uma célula hospedeira, para diminuir bloqueio estérico tal que o componente pode assumir sua estrutura terciária ou quaternária ideal e/ou interagir adequadamente com sua molécula alvo. Para ligantes e métodos de identificar espaçadores desejáveis, veja, por exemplo, George e outro (2003) Protein Engineering 15:871-879.

[088] Uma sequência de ligante pode incluir um ou mais aminoácidos naturalmente conectados a um componente de receptor, ou pode ser uma sequência adicionada para realçar expressão da proteína de fusão, fornece sítios especificamente desejados de interesse, permitindo domínios de componente para formar estrutura terciárias ideais e/ou para realçar a interação de um componente com sua molécula alvo. Em uma modalidade, o ligante compreende uma ou mais sequências de peptídeo que estão entre 1-100 aminoácidos, preferivelmente 1-25 aminoácidos em comprimento. Em uma modalidade, o ligante é 1-5 aminoácidos em comprimento. Em uma modalidade, o ligante é uma sequência de três aminoácidos; mais especificamente, a sequência de três aminoácidos de Gly Pro Gly. Em outra modalidade, o ligante é Gly Ser.

[089] Exemplos de tais moléculas de articulação incluem, porém não são limitados, aos seguintes polipeptídeos:

articulação 1: CPPCPA (SEQ ID NO.: 22)

articulação 2: DKHTHTCPPCPA (SEQ ID NO.: 23)

articulação 3: EPKSCDKHTHTCPPCPA (SEQ ID NO.: 24)

[090] Consequentemente, a descrição refere-se a um polipeptídeo contendo uma proteína de precursor de IGF-1 Ea-peptídeo humana que é fundida em uma região de Fc de imunoglobulina, particularmente uma região de Fc modificada, particularmente uma região de Fc que é modificada para modular sua ligação a receptor de Fc preferivelmente substituindo-se um ou ambos dos aminoácidos 234 e 235 para alanina como descrito acima, em que a glicina de aminoácido na posição 42 é substituída por serina, em que a numeração dos aminoácidos corresponde a SEQ ID NO.: 5 e em que a região de Fc de imunoglobulina é fundida à proteína de precursor de IGF-1 por uma região de articulação.

[091] Exemplos de tais moléculas incluem, porém não são

limitados, aos seguintes polipeptídeos,:

hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E (SEQ ID NO.: 8)

hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A (SEQ ID NO.: 9)

hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C (SEQ ID NO.: 10)

hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F (SEQ ID NO.: 11)

hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E (SEQ ID NO.: 12)

hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A (SEQ ID NO.: 13)

hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F (SEQ ID NO.: 14)

[092] Em uma modalidade particular da descrição, os aminoácidos R71 e S72 das proteínas de precursor de IGF-1 descritas acima podem ser mutados como segue:

- (1) Deleção de um ou ambos de R71 e S72, e/ou,
- (2) Mutação de um ou ambos de R71 e S72 em um aminoácido não básico, tal como alanina, e/ou
- (3) Inserir um ou mais aminoácidos não básicos entre R71 e S72, e/ou,
- (4) Colocar um sítio de glicosilação próximo de R71 e S72 suficiente para mascarar o sítio de protease, e/ou,
- (5) Pegilação sítio-dirigida usando substituição de R71 ou S72, ou inserção próxima ou entre R71 e S72, com um aminoácido não natural.

[093] Métodos para modificação de proteína como mutagênese sítio dirigida, a introdução de sítios de glicosilação ou pegilação sítio dirigida são bem conhecidos por aqueles versados na técnica.

[094] Em uma modalidade, a região de Fc é modificada para modular sua ligação ao receptor de Fc. Em uma modalidade, a região de Fc é modificada para reduzir sua afinidade para receptor de Fc. Em uma modalidade, a região de Fc é modificada para reduzir atividade de ADCC. Em uma modalidade, a região de Fc é modificada para prevenir atividade de ADCC.

[095] Em uma modalidade, a invenção fornece um polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO.: 8 (hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E). Em uma modalidade, a invenção fornece um polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO.: 9 (hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A). Em uma modalidade, a invenção fornece um polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO.: 10 (hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C). Em uma modalidade, a invenção fornece um polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO.: 11 (hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F).

[096] Em uma modalidade, a invenção fornece um polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO.: 12 (hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E).

[097] Em uma modalidade, a invenção fornece um polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO.: 13 (hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A).

[098] Em uma modalidade, a invenção fornece um polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO.: 14 (hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F).

[099] Em uma modalidade, a invenção fornece um polipeptídeo consistindo em SEQ ID NOs.: 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou 14,.

[0100] Em uma modalidade, a revelação presente fornece um polipeptídeo que é pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% idêntico a SEQ ID NO.: 8.

[0101] Em uma modalidade, a presente descrição fornece um polipeptídeo que é pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% idêntico a SEQ ID NO.: 9.

[0102] Em uma modalidade, a presente descrição fornece um polipeptídeo que é pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% idêntico a SEQ ID NO.: 10.

[0103] Em uma modalidade, a presente descrição fornece um polipeptídeo que é pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 96%,

pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% idêntico a SEQ ID NO.: 11.

[0104] Em uma modalidade, a presente descrição fornece um polipeptídeo que é pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% idêntico a SEQ ID NO.: 12.

[0105] Em uma modalidade, a presente descrição fornece um polipeptídeo que é pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% idêntico a SEQ ID NO.: 13.

[0106] Em uma modalidade, a presente descrição fornece um polipeptídeo que é pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% idêntico a SEQ ID NO.: 14.

[0107] Em uma modalidade, os polipeptídeos da presente invenção são glicosilados.

Mutações de aminoácido

[0108] Como referido acima, vários aminoácidos podem ser mutados em outro aminoácido. Tipicamente o aminoácido é substituído com um resíduo de alanina. Entretanto, outros aminoácidos podem ser usados, tal como aminoácidos não naturais ou aminoácidos naturais de outro grupo (isto é polar, ácido, básico ou não polar). Métodos de introduzir uma mutação em aminoácidos de uma proteína são bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Veja, por exemplo, Ausubel (ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. (1994); T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Métodos compreendem, porém não são limitados a, amplificação do DNA codificando a variante funcionalmente ativa de polipeptídeo ou fragmentos da mesma por reação em cadeia de polimerase (PCR)

conduzida com iniciadores mutagênicos e reunindo os fragmentos por reunião de PCR se necessário ou introdução de mutações usando *kits* comercialmente disponíveis tal como "QuikChange.TM. Site-Directed Mutagenesis Kit" (Stratagene). See, e.g., Ausubel (ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. (1994); T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Além disso, sequências mutadas podem ser obtidas por síntese de gene sintética um serviço fornecido por companhias comerciais (por exemplo Geneart, Life Technology). A geração de uma variante funcionalmente ativa de polipeptídeo ou derivado em um polipeptídeo substituindo-se um aminoácido que não influencia a função de um polipeptídeo pode ser realizada por alguém versado na técnica.

Regiões de Fc de imunoglobulina

[0109] Em uma modalidade, a região de Fc é de IgG, IgM ou IgA. Em uma modalidade a região de Fc deriva de IgG. O domínio de Fc de IgG pode ser selecionado a partir dos isótipos IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, bem como qualquer alótipo dentro de cada grupo de isótipo. Em uma modalidade a região de Fc é uma região de Fc humana.

[0110] A região de Fc pode ser alterada substituindo-se pelo menos um resíduo de aminoácido com um resíduo de aminoácido diferente para alterar as funções efectoras da região de Fc. Por exemplo, um ou mais aminoácidos podem ser substituídos com um resíduo de aminoácido diferente tal que a região de Fc tem uma afinidade alterada para o receptor de Fc ou o componente de C1 de complemento. Esta abordagem é descrita em outros detalhe em US5,624,821 e US5,648,260, ambos por Winter e outro. Em particular, resíduos que 234 e 235 podem ser mutados. Em particular, estas mutações podem ser a alanina. Desse modo em uma modalidade o anticorpo da invenção tem uma mutação na região de Fc a um ou ambos de aminoácidos 234

e 235. Em outra modalidade, um ou ambos de aminoácidos 234 e 235 podem ser substituídos em alanina. Uma tal variante de Fc onde resíduos 234 e 235 foram substituídos por alanina é geralmente referida como “LALA.” Tais construtores de Fc LALA reduziram atividade de ADCC. Em uma modalidade, a proteína de precursor de IGF-1 é ligada a um IgG1 LALA Fc.

Ligação

[0111] “Fundido a” ou “ligado a” quando aqui usado no contexto das proteínas descritas fundidas a/ligadas a uma região de Fc de imunoglobulina, significará combinar dois polipeptídeos que não estão naturalmente presentes no mesmo polipeptídeo.

[0112] A região de Fc de imunoglobulina pode ser diretamente fundida ao polipeptídeo de IGF-1 modificado ou pode ser conectada por um ligante usando tecnologias de DNA recombinante bem conhecidas na técnica. Se um ligante de DNA for usado, a região de Fc pode ser conectada a qualquer parte do polipeptídeo de IGF-1 modificado. Em uma modalidade a região de Fc é fundida diretamente ao C-terminal do polipeptídeo de IGF-1 modificado. Em outra modalidade, a região de Fc é ligada ao C-terminal do polipeptídeo de IGF-1 modificado por um ligante de Gly Ser (-GS-) e/ou uma região de articulação (SEQ IDs NO.: 22 a 24) tal como para hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E (SEQ IDs NO.: 8), hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A (SEQ IDs NO.: 9), hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C (SEQ IDs NO.: 10), hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F (SEQ IDs NO.: 11), hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E (SEQ IDs NO.: 12), hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A (SEQ IDs NO.: 13) ou hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F (SEQ IDs NO.: 14).

[0113] Um ligante de DNA podem ser usados para fornecer um sítio de restrição entre componentes para facilidade de manipulação. Um ligante pode da mesma forma ser fornecido para realçar expressão do polipeptídeo a partir de uma célula hospedeira, para diminuir bloqueio estérico tal que o componente pode assumir sua estrutura terciária ou

quaternária ideal e/ou interagir adequadamente com sua molécula alvo. Para ligantes e métodos de identificar espaçadores desejáveis, veja, por exemplo, George e outro (2003) Protein Engineering 15:871-879.

[0114] Uma sequência de ligante pode incluir um ou mais aminoácidos naturalmente conectados para um componente de receptor, ou pode ser uma sequência adicionada usada para realçar expressão da proteína de fusão, fornece especificamente sítios desejados de interesse, permitindo domínios de componente para formar estruturas terciárias ideais e/ou realçar a interação de um componente com sua molécula alvo. Em uma modalidade, o ligante compreende uma ou mais sequências de peptídeo que estão entre 1-100 aminoácidos, preferivelmente 1-25 aminoácidos em comprimento. Em uma modalidade, o ligante é 1-5 aminoácidos em comprimento. Em uma modalidade, o ligante é uma sequência de três aminoácidos; mais especificamente, a sequência de três aminoácidos de Gly Pro Gly. Em outra modalidade, o ligante é Gly Ser.

Ácidos Nucléicos

[0115] A invenção da mesma forma fornece moléculas de ácido nucléico que codificam os polipeptídeos da invenção. Sequências de ácido nucléico preferidas são aquelas codificando hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E, hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A, hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C, hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F, hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E, hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A ou hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F (SEQ ID NOs.: 15-21).

[0116] Moléculas de ácido nucléico da presente invenção podem estar na forma de RNA, tal como mRNA, ou na forma de DNA, incluindo, por exemplo cDNA ou DNA sintético. As moléculas de ácido nucléico podem ser de filamento duplo ou filamento único. O DNA de filamento único pode ser o filamento de codificação, conhecida como o filamento de sentido, ou pode ser o filamento de não codificação, da mesma forma referido como o filamento de sentido negativo.

[0117] A degeneração do código genético é bem conhecida. Desse modo duas ou mais sequências de ácido nucléico diferentes podem codificar para a mesma sequência de polipeptídeo. Tais sequência de ácido nucléico variantes estão incluídas dentro do escopo do pedido. Realmente, pode ser preferível fazer modificações conservadoras em uma sequência de ácido nucléico para melhorar expressão de um polipeptídeo da invenção.

[0118] A invenção também fornece um vetor compreendendo um ácido nucléico da invenção. O vetor pode ser um vetor de clonagem ou expressão. Em uma modalidade, o ácido nucléico pode ser compreendido dentro de um vetor de expressão transportando elementos necessários para expressão eficiente bem conhecida pela pessoa versada na técnica. Elementos incluem um promotor por exemplo, tal como por exemplo o realçador-promotor de Citomegalovírus (CMV), um sequência de sinal para secreção, tal como a natural ou qualquer outra sequência conhecida para facilitar secreção, um sinal de poliadenilação e terminador de transcrição, por exemplo derivado de gene de Hormônio de Crescimento Bovino (BGH), um elemento permitindo replicação episomal e replicação em procariontes (por exemplo origem de SV40 e ColE1 ou outros conhecidos na técnica) e elementos para permitir seleção, tal como gene de resistência a ampicilina e marcador de zeocina ou higromicina.

[0119] Em uma modalidade a invenção fornece uma molécula de ácido nucléico isolada compreendendo uma sequência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo consistindo em:

a) a sequência de polinucleotídeo mencionada em SEQ ID NO.: 15 ou um complemento da mesma;

b) uma sequência de polinucleotídeo compreendendo uma sequência tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade

de sequência para a totalidade da sequência mencionada em SEQ ID NO.: 15;

c) a sequência de polinucleotídeo mencionada em SEQ ID NO.: 16 ou um complemento da mesma;

d) uma sequência de polinucleotídeo compreendendo uma sequência tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência para a totalidade da sequência mencionada em SEQ ID NO.: 16;

e) a sequência de polinucleotídeo mencionada em SEQ ID NO.: 17 ou um complemento da mesma;

f) uma sequência de polinucleotídeo compreendendo uma sequência tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência para a totalidade da sequência mencionada em SEQ ID NO.: 17;

g) a sequência de polinucleotídeo mencionada em SEQ ID NO.: 18 ou um complemento da mesma;

h) uma sequência de polinucleotídeo compreendendo uma sequência tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência para a totalidade da sequência mencionada em SEQ ID NO.: 18;

i) a sequência de polinucleotídeo mencionada em SEQ ID NO.: 19 ou um complemento da mesma;

j) uma sequência de polinucleotídeo compreendendo uma sequência tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência para a totalidade da sequência mencionada em SEQ ID NO.: 19;

k) a sequência de polinucleotídeo mencionada em SEQ ID NO.: 20 ou um complemento da mesma;

l) uma sequência de polinucleotídeo compreendendo uma sequência tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência para a totalidade da sequência mencionada em SEQ ID NO.: 20;

m) a sequência de polinucleotídeo mencionada em SEQ ID NO.: 21 ou um complemento da mesma;

n) uma sequência de polinucleotídeo compreendendo uma sequência tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência para a totalidade da sequência mencionada em SEQ ID NO.: 21.

[0120] Em outra modalidade a descrição refere-se aos polipeptídeos variantes de IGF-1 descritos acima, em que as referidas proteínas de precursor de IGF-1 humanas são pegiladas. A pegilação é particularmente preferida para proteínas de precursor de IGF-1 que não são fundidas em uma região de Fc de imunoglobulina de um IgG humano. Conjugação para poli(etileno) glicol (PEG; pegilação) provou ser benéfica em prolongamento da meia-vida de fármacos de proteínas terapêuticos. É esperado que pegilação dos polipeptídeos de precursor de IGF da invenção pode resultar em vantagens farmacêuticas similares. Métodos de pegilação de IGF-1 são bem conhecidos na técnica. Veja, por exemplo Publicação de Pedido de Patente US 2006/0154865, que descreve as propriedades benéficas de lisina-IGF-1 monopegilado. Tal lisina-monopegilação pode ser adaptada para os polipeptídeos de precursor de IGF da invenção. Além disso, pegilação podem ser obtida em qualquer parte de um polipeptídeo da invenção pela introdução de um aminoácido não natural. Certos aminoácidos não

naturais podem ser introduzidos pela tecnologia descrita em Deiters e outro, J Am Chem Soc 125:11782-11783, 2003; Wang e Schultz, Science 301:964-967, 2003; Wang e outro, Science 292:498-500, 2001; Zhang e outro, Science 303:371-373, 2004 ou em Patente US No. 7,083,970. Brevemente, alguns destes sistemas de expressão envolvem mutagênese sítio-dirigida para introduzir um códon sem sentido, tal como uma TAG ambarino, na estrutura de leitura aberta codificando um polipeptídeo da invenção. Tais vetores de expressão são em seguida introduzidos em um hospedeiro que pode utilizar um tRNA específico para o códon sem sentido introduzido e carregado com o aminoácido não natural de escolha. Aminoácidos não naturais particulares que são benéficos para propósito de conjugar porções aos polipeptídeos da invenção incluem aqueles com acetileno e cadeias laterais de azido. Os polipeptídeos de precursor de IGF contendo estes novos aminoácidos podem ser em seguida pegilados nestes sítios escolhidos na proteína. Além disso, tais moléculas de IGF pegiladas sem o E-peptídeo são da mesma forma úteis como terapêuticos.

Produção das variantes de IGF-1 da invenção em células de mamífero

[0121] A produção de IGF-1 humano nativo em sistemas de expressão procarióticos é bem conhecida à pessoa versada na técnica. Expressão em células eucarióticas, em particular células hospedeiras de mamífero, é algumas vezes preferida porque tais células eucarióticas são mais prováveis do que células procarióticas reunir e segregar uma proteína propriamente dobrada e imunologicamente ativa.

[0122] Células hospedeiras de mamífero para expressar os anticorpos recombinantes da invenção incluem Ovário de *Hamster* Chinês (células de CHO) (incluindo dhfr - células de CHO, descrito Urlaub e Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 usado com um marcador selecionável DH FR, por exemplo como descrito em R.J. Kaufman e P.A. Sharp 1982 Mol. Biol. 159:601-621), células de

HEK293 (células Rim Embrionário Humano 293), NSO células de mieloma de murino, células de COS e células de SP2. Células hospedeiras preferidas são células derivadas de CHO K1. Entretanto, expressão IGF-1 recombinante em linhagem celular de CHO resulta em inibição de crescimento celular e baixo títulos (veja figura 11/12). Redução/nocauté estável de IGF-1-R em células de CHO usando tecnologia de “nuclease de dedo de zinco” resultou em um crescimento celular melhorado e títulos de proteína de IGF-1 mais altos (figura 14, 15, 16). Células de CHO com expressão reduzida de IGF-1-R (redução de si/shRNA) que foram transfectadas estáveis com plasmídeos codificando IGF-1 produziu aproximadamente 5 vezes título de mistura mais alto comparado a células de CHO tipo silvestre transfectadas estáveis. Título de mistura ainda mais alto poderia ser medido depois da transfecção estável de linhagens de célula nocauté IGF-1-R. Um aumento de título de 5-20 vezes de IGF-1 recombinante poderia ser detectado comparado a linhagem celular de CHO tipo silvestre. Em resumo estes dados mostram que redução ou nocauté dos genes de receptor de IGF-1 em linhagens celulares de mamífero pode significativamente melhorar a produção de IGF-1 e variantes do mesmo.

[0123] Consequentemente, um método adequado para a produção IGF-1 recombinante ou variantes do mesmo em células de mamífero, por exemplo uma célula de CHO, em que a referida célula de mamífero sendo deficiente na expressão de receptor de fator de crescimento semelhante a insulina funcional 1 (IGF-1R) compreende a seguinte etapa:

- a. Produzir uma célula de mamífero sendo deficiente na expressão do receptor de fator de crescimento semelhante a insulina 1;
- b. Transformar a célula da etapa a. com um vetor de expressão compreendendo uma molécula de ácido nucléico codificando um IGF-1 ou uma variante do mesmo;

- c. Selecionar uma célula da etapa b. sendo transformada;
 - d. Cultivar a célula selecionada na etapa c. sob condições permitindo a expressão do IGF-1 ou uma variante do mesmo; e
 - e. Colher o IGF-1 ou uma variante do mesmo a partir das células de mamífero cultivadas na etapa d,
- em que alternativamente a ordem das etapas a. e b. pode ser invertida ou ambas as etapas podem ser realizadas ao mesmo tempo.

[0124] A pessoa versada sabe transformar, selecionar e cultivar células de mamífero geneticamente modificadas, por exemplo Células de CHO, como células derivadas de CHO-K1, células derivadas de CHO-DUXB11 ou células de CHO-DG44. Protocolos de seleção são habitualmente usados para facilitar seleção de células que são prováveis de ter integrado a codificação de DNA recombinante a proteína terapêutica desejada, como fatores de crescimento, por exemplo IGF-1. Resistência a antibiótico ou a capacidade de crescer em um meio nutricionalmente seletivo conferido por um gene co-integrado no vetor de transformação é habitualmente usada. (veja Weber, W., e Fussenegger, M., (2003) Inducible gene expression in mammalian cells, in Gene transfer and expression in mammalian cells, (Makrides, S.C., Ed.), Elsevier: Amsterdam, pp. 589-604.) (Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector: Niwa Hitoshi, Yamamura Ken-ichi, Miyazaki Jun-ichi). Os dois sistemas de expressão de CHO mais comuns para produção de proteína recombinante utiliza seleção de metotrexato (MTX) com base em diidrofolato reductase (DHFR) ou seleção de metionina sulfoximina (MSX) com base em glutamina sintetase (GS) (Rita Costa A, Elisa Rodrigues M, Henriques M, Azeredo J, Oliveira R., Eur J Pharm Biopharm. Fevereiro de 2010; 74(2):127-38. Epub 22 de outubro de 2009. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production).

[0125] Vetores particularmente adequados para produzir polipeptídeos em células de mamífero, particularmente células de roedor tal como células de CHO defeituosas de gene de CHO e DHFR foram descritas no pedido de patente WO09080720A. Há vários métodos apropriados conhecidos na técnica anterior por introduzir um vetor de expressão em uma célula hospedeira de mamífero. Respective métodos incluem porém não são limitados a transfecção de fosfato de cálcio, eletroporação, lipofecção, biolístico e transferência de genes mediadas por polímero. Células hospedeiras adequadas são descritas acima. Depois de introdução do ácido nucléico de vetor de expressão na(s) célula(s) hospedeira(s), os transformantes obtidos são cultivados sob condições seletivas adequadas para analisar a expressão do gene marcador selecionável de mamífero incluídas no cassete de expressão (MSM). Isto significa, que por exemplo quando o gene marcador selecionável de mamífero for um gene de resistência antibiótico, transformantes são cultivados em um meio contendo o antibiótico ativo correspondente em células de mamífero e os transformantes que são viáveis sob tais condições são selecionados, desse modo permitindo a obtenção de transformantes que expressam o gene marcador e desse modo incorporou o vetor. Adicionalmente, uma segunda etapa de seleção pode ser realizada cultivando-se os transformantes em um meio de seleção adaptado para selecionar o gene marcador amplificável, selecionável compreendido no cassete de expressão (MASM). Por exemplo no caso de DHFR ser usado como um gene marcador amplificável, selecionável, os transformantes podem ser cultivados em um meio livre de nucleotídeo ou purino na presença de um inibidor de DHFR. No caso de um promotor induzível ser usado em pelo menos um cassete de expressão, um sinal de indução correspondente deveria ser fornecido para começar expressão do polipeptídeo. Para fazer uso do sistema de seleção/amplificação de DHFR, as referidas células

hospedeiras podem ser cultivadas na presença de um inibidor de DHFR. Inibidores de DHFR adequados são antifolatos tal como por exemplo MTX. A concentração de antifolato/MTX usada depende da célula hospedeira e a variante de DHFR incorporada no vetor. A faixa de concentração pode ser escolhida para procedimentos de amplificação de multi-etapa em células hospedeiras de DHFR" por exemplo em valores em torno de 5nM - 20nM variando em valores de 500nM a 1000nM ou ainda mais alto para etapas de amplificação secundárias ou outras. Concentrações de partida de células DHFR+ são normalmente mais altas na faixa de 100nM a 750nM, preferivelmente 500nM na primeira etapa e 500nM a 1000nM e acima para outras etapas de amplificação. Variantes de DHFR adequadas são descritas acima.

[0126] Para fazer uso do sistema de seleção/amplificação de GS as referidas células hospedeiras podem ser cultivadas na presença de por exemplo MSX. A concentração de MSX usada depende da célula hospedeira. A faixa de concentração pode ser escolhida entre cerca de 15 a 150 micromolar, 20 a 100 micromolar e 25 a 50 micromolar. Estas faixas são particularmente adequadas para células de NSO e CHO.

Composições farmacêuticas

[0127] Em outro aspecto, a presente invenção fornece uma composição, por exemplo uma composição farmacêutica, contendo uma ou uma combinação das variantes de IGF-1 descritas acima, formuladas juntamente com um veículo farmaceuticamente aceitável. Composições farmacêuticas da invenção da mesma forma podem ser administradas em terapia de combinação, isto é combinadas com outros agentes. Por exemplo, as variantes de IGF-1 da presente invenção podem ser combinadas com pelo menos um agente de aumento de massa/resistência muscular, por exemplo, anticorpo anti-ActRIIB, IGF-2 ou variantes IGF-2, um anticorpo anti-miostatina, um propeptídeo de miostatina, uma proteína de armadilha de miostatina que liga-se a

ActRIIB porém não ativa, um agonista beta 2, um agonista de Ghrelin, um SARM, agonistas/miméticos de GH ou folistatina. Exemplos de agentes terapêuticos que podem ser usados em terapia de combinação são descritos em maiores detalhes abaixo na seção em usos das variantes de IGF-1 da invenção.

[0128] O termo "farmaceuticamente aceitável" significa aprovado por uma agência reguladora do governo Federal ou um estadual ou listou na U.S. Pharmacopeia ou outra farmacopéia geralmente reconhecida para uso em animais, e mais particularmente em humanos. O termo "veículo" refere-se a um diluente, adjuvante, excipiente, ou veículo com que o terapêutico é administrado. Tais veículos farmacêuticos podem ser líquidos estéreis, tal como água e óleos, incluindo aqueles de origem de petróleo, animal, vegetal ou sintética, tal como óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo de gergelim e similar. Excipientes farmacêuticos adequados incluem amido, glicose, lactose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha, giz, sílica gel, estearato de sódio, monoestearato de glicerol, talco, cloreto de sódio, leite desnatado em pó, glicerol, propileno, glicol, água, etanol e similar. A composição, se desejado, pode da mesma forma conter quantidades menores de agentes umectantes ou emulsificantes, ou agentes de tamponamento de pH. Estas composições podem tomar a forma de soluções, suspensões, emulsão, comprimidos, pílulas, cápsulas, pós, formulações de liberação prolongada e similar. A composição pode ser formulada como um supositório, com aglutinantes tradicionais e veículos tais como triglicerídeos. Formulação oral pode incluir veículos padrões tal como graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio, etc. Exemplos de veículos farmacêuticos adequados são descritos em "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin.

[0129] Em uma modalidade preferida, a composição é formulada de acordo com procedimentos rotineiros como uma composição farmacêutica adaptada para administração intravenosa a seres humanos. Onde necessário, a composição pode da mesma forma incluir agente de solubilização e uma anestesia local tal como lidocaína para aliviar dor no sítio da injeção. Onde a composição será administrada por infusão, pode ser dispensado com uma garrafa de infusão contendo água de grau farmacêutica estéril ou solução salina. Onde a composição é administrada por injeção, uma ampola de água estéril para injeção ou solução salina pode ser fornecida de forma que os ingredientes podem ser misturados antes da administração.

[0130] Veículo farmacêuticamente aceitável inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, isotônicos e agentes de atraso de absorção, e similar que são fisiologicamente compatíveis. O veículo deveria ser adequado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinhal ou epidérmica (por exemplo por injeção ou infusão). Dependendo da rotina de administração, o composto ativo, isto é anticorpo, imunoconjugado, ou molécula bispecífica, pode ser revestido em um material para proteger o composto da ação de ácidos e outras condições naturais que podem inativar o composto.

[0131] Uma composição farmacêutica da invenção pode da mesma forma incluir um anti-oxidante farmacêuticamente aceitável. Exemplos de anti-oxidantes farmacêuticamente aceitáveis incluem: antioxidantes solúveis em água, tal como ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e similar; antioxidantes solúveis em óleo, tal como palmitato de ascorbila, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propila, alfa-tocoferol, e similar; e agentes de quelação de metal, tal como ácido cítrico, ácido etilenodiamina tetraacético (EDTA),

sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, e similar.

[0132] Exemplos de veículos aquosos e não aquosos adequados que podem ser empregados nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, polióis (tal como glicerol, propileno glicol, polietileno glicol, e similar), e misturas adequadas dos mesmos, óleos vegetais, tal como azeite de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis, tal como oleato de etila. A própria fluidez pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de materiais de revestimento, tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersões, e pelo uso de tensoativos.

[0133] Estas composições podem da mesma forma conter adjuvantes tal como preservativos, agentes umectantes, agentes emulsificantes e agentes dispersantes. Prevenção de presença de microorganismos pode ser garantida igualmente por procedimentos de esterilização, supra, e pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, ácido sórbico de fenol, e similar. Pode da mesma forma ser desejável incluir agentes isotônicos, tal como açúcares, cloreto de sódio, e similar nas composições. Além disso, absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser provocada pela inclusão de agentes que atrasam absorção tal como, monoestearato de alumínio e gelatina.

[0134] Veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem soluções aquosas estéreis ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções injetáveis estéreis ou dispersão. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacêuticamente ativas é conhecido na técnica. Exclua na medida que quando qualquer meio convencional ou o agente seja incompatível com o composto ativo, uso do mesmo nas composições farmacêuticas da invenção é contemplado. Compostos ativos suplementares podem da mesma forma ser incorporados nas composições.

[0135] Composições terapêuticas tipicamente devem ser estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, lipossoma, ou outra estrutura ordenada adequada para concentração de fármaco alta. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, e polietileno glicol líquido, e similar), e misturas adequadas dos mesmos. A própria fluidez pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e pelo uso de tensoativo. Em muitos casos, a pessoa pode incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois tal como manitol, sorbitol, ou cloreto de sódio na composição. Absorção prolongada das composições injetáveis pode ser provocada incluindo-se na composição um agente que atrasa absorção por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

[0136] Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando-se o composto ativo na quantidade requerida em um solvente apropriado com um ou uma combinação de agentes enumerados acima, quando requerido, seguido por microfiltração de esterilização. Geralmente, dispersões são preparadas incorporando-se o composto ativo em um veículo estéril contendo um meio de dispersão básico e os outros agentes requeridos daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparação são secagem a vácuo e secagem por congelamento (liofilização) que produz um pó do agente ativo mais qualquer agente desejado adicional de uma solução previamente filtrada estéril do mesmo.

[0137] A quantidade de agente ativo que pode ser combinada com um material de veículo para produzir uma única forma de dosagem variará, dependendo do indivíduo sendo tratado, e o modo particular de

administração. A quantidade de agente ativo que pode ser combinada com um material de veículo para produzir uma única forma de dosagem geralmente será aquela quantidade da composição que produz um efeito terapêutico. Geralmente, fora de cem por cento, esta quantidade variará de cerca de 0,01 por cento a cerca de noventa e nove por cento de agente ativo, de cerca de 0,1 por cento a cerca de 70 por cento, ou de cerca de 1 por cento a cerca de 30 por cento de agente ativo em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

[0138] Regimes de dosagem são ajustados para fornecer a resposta desejada ideal (por exemplo uma resposta terapêutica). Por exemplo, um único bolo pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas com o passar do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada quando indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parenterais em forma de unidade de dosagem para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. Forma de unidade de dosagem quando aqui usada refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para os indivíduos a ser tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico requerido. A especificação para as formas de unidade de dosagem da invenção é ditada por e diretamente dependente das características únicas do composto ativo e o efeito terapêutico particular a ser obtido, e as limitações inerentes na técnica de composto tal como um composto ativo para o tratamento de sensibilidade em indivíduos.

[0139] Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipeptídeo no contexto de administrar as variantes de IGF-1 da descrição ou composição compreendendo as referidas variantes de IGF-1, varia de cerca de 0,001 a 100 mg/kg, ou 0,01 a 30 mg/kg, e mais normalmente

0,1 a 10 mg/kg do peso corporal do hospedeiro. Por exemplo dosagens podem ser cerca de 0,1 mg/kg de peso corporal, pode ser cerca de 0,2 mg/kg de peso corporal, pode ser cerca de 0,3 mg/kg de peso corporal, pode ser cerca de 1 mg/kg de peso corporal, pode ser cerca de 3 mg/kg de peso corporal, pode ser cerca de 5 mg/kg de peso corporal ou cerca de 10 mg/kg de peso corporal. A pessoa versada sabe identificar uma dose eficaz adequada que variará dependendo da rotina de administração (por exemplo intravenosamente ou subcutaneamente). Um regime de tratamento exemplar requer administração uma vez por dia, uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, uma vez a cada quatro semanas ou uma vez por mês. Tal administração pode ser realizada intravenosamente ou subcutaneamente. Regimes de dosagem para variantes de IGF-1 da invenção incluem 0,1 mg/kg de peso corporal ou 0,2 mg/kg de peso corporal ou 0,3 mg/kg de peso corporal ou 0,5 mg/kg de peso corporal ou 1 mg/kg de peso corporal ou 3 mg/kg de peso corporal ou 10 mg/kg de peso corporal por administração intravenosa. Alternativamente, a composição pode ser uma formulação de liberação prolongada em que caso menos frequente de administração é requerido. Dosagem e frequência variam, dependendo da meia-vida do anticorpo no paciente. A dosagem e frequência de administração podem variar, dependendo em se o tratamento é profilático ou terapêutico. Em aplicações profiláticas, uma dosagem relativamente baixa é administrada em intervalos relativamente infrequentes durante um período longo de tempo. Alguns pacientes continuam a receber tratamento para o resto de suas vidas. Em aplicações terapêuticas, uma dosagem relativamente alta em intervalos relativamente curtos é às vezes requerida até que a progressão da doença seja reduzido ou terminado ou até que o paciente mostra melhora parcial ou completa de sintomas de doença. Depois disso, o paciente pode ser administrado um regime profilático.

[0140] Níveis de dosagem atuais dos agentes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção pode ser variado para obter uma quantidade do agente ativo que é eficaz para obter a resposta terapêutica desejada a um paciente particular, composição, e modo de administração, sem ser tóxico ao paciente. O nível de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores farmacocinéticos incluindo a atividade das composições particulares da presente invenção empregada, ou do éster, sal ou amida do mesmo, da rotina de administração, do tempo de administração, da taxa de excreção do composto particular sendo empregado, da duração do tratamento, outros fármacos, compostos e/ou materiais usados em combinação com as composições particulares empregadas, da idade, sexo, peso, condição, saúde geral e história médica anterior do paciente sendo tratado, e como fatores bem conhecidos nas técnicas médicas.

[0141] Administração de uma dose terapeuticamente eficaz de uma variante de IGF-1 compreendida nas composições da invenção pode resultar em uma diminuição em severidade de sintomas de doença, um aumento em frequência e duração de períodos livres de sintoma da doença, ou uma prevenção de prejuízo ou inaptidão devido à aflição da doença isto é um aumento em muscular e/ou função massa ou diminuição/redução de área de ferida em pacientes de queimadura.

[0142] Pacientes receberão uma quantidade eficaz do ingrediente ativo de polipeptídeo isto é uma quantidade que é suficiente para detectar, tratar, melhorar, ou prevenir a doença ou distúrbio em questão. Efeitos terapêuticos podem da mesma forma incluir redução em sintomas físicos. A quantidade eficaz ideal e concentração de uma proteína terapêutica para qualquer indivíduo particular dependerá de vários fatores, incluindo o tamanho da idade saúde e/ou gênero do paciente, a natureza e extensão da condição, a atividade da proteína terapêutica particular, a taxa de sua liberação pelo corpo, e da mesma

forma em qualquer possível outro(s) terapêutico(s) administrado(s) em combinação com a proteína terapêutica. A quantidade eficaz liberada para uma determinada situação pode ser determinada por experimentação rotineira e está dentro do julgamento de um clínico. Dosagem pode ser por um único horário de dose ou um horário de dose múltiplo.

[0143] Uma composição da presente invenção pode ser administrada por uma ou mais rotinas de administração usando uma ou mais de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Como será apreciado pelo técnico versado, a rotina e/ou modo de administração variará, dependendo dos resultados desejados. Rotinas de administração para as proteínas terapêuticas da invenção incluem rotinas de administração intravenosas, intramusculares, intradérmicas, intraperitoneais, subcutâneas, espinhal ou outras parenterais, por exemplo por injeção ou infusão. A frase “administração parenteral” quando aqui usada significa modos de administração diferentes de enterais e administração tópica, normalmente por injeção, e inclui, sem limitação, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaraquínóide, intraespinhal, injeção epidural e intrasternal e infusão. Em uma modalidade o anticorpo compreendendo composição é administrado intravenosamente. Em outra modalidade o anticorpo é administrado subcutaneamente.

[0144] Alternativamente, uma variante de IGF-1 compreendendo composição da invenção pode ser administrada por uma rotina não parenteral, tal como uma rotina tópica, epidérmica ou mucosal de administração, por exemplo, intranasalmente, oralmente, vaginalmente, rectalmente, sublingualmente ou topicamente.

[0145] Os compostos ativos podem ser preparados com veículos

que protegerão o composto contra liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, emplastros transdérmicos, e sistemas de liberação microencapsulados. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser usados, tal como acetato de etileno vinila, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, e ácido polilático. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são patenteados ou geralmente conhecidos por aqueles versados na técnica. Veja, por exemplo Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

[0146] Composições terapêuticas podem ser administradas com dispositivos médicos conhecidos na técnica. Por exemplo, em uma modalidade, uma composição terapêutica da invenção pode ser administrada com um dispositivo de injeção hipodérmico sem agulha, tal como os dispositivos mostrados em Patente U.S. Nos. 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824 ou 4,596,556. Exemplos de implantes bem conhecidos e módulos úteis na presente invenção incluem: Patente U.S. Nos. 4,487,603 que mostra uma bomba de microinfusão implantável para dispensar medicamento em uma taxa controlada; Patente U.S. Nos. 4,486,194, que mostra um dispositivo terapêutico para administrar medicamentos através da pele; Patente U.S. Nos. 4,447,233 que mostra uma bomba de infusão de medicamento para liberar medicamento em uma taxa de infusão precisa; Patente U.S. Nos. 4,447,224, que mostra um aparato de infusão implantável de fluxo variável para liberação de fármaco contínua; Patente U.S. Nos. 4,439,196, que mostra um sistema de liberação de fármaco osmótico tendo compartimentos de multicâmara; e Patente U.S. Nos. 4,475,196, que mostra um sistema de liberação de fármaco osmótico. Muitos outros tais implantes, sistemas de liberação, e módulos são conhecidos aqueles versados na técnica e inclui aqueles

feitos por MicroCHIPSTM (Bedford, MA).

[0147] Em certas modalidades, a variante de IGF-1 humana compreendendo composição da invenção pode ser formulada para garantir a própria distribuição *in vivo*. Por exemplo, a barreira hematoencefálica (BBB) exclui muitos compostos altamente hidrofílicos. Para garantir que os compostos terapêuticos da invenção cruzam a BBB (se desejado); eles podem ser formulados, por exemplo, em lipossomas. Para métodos de fabricar lipossomas, veja, por exemplo Patentes U.S. 4,522,811; 5,374,548; e 5,399,331. Os lipossomas podem compreender uma ou mais porções que são seletivamente transportadas em células específicas ou órgãos, desse modo aumentam liberação de fármaco alvejada (veja, por exemplo V.V. Ranade, 1989 J., Clin Pharmacol. 29:685). Porções de alvejamento exemplares incluem folato ou biotina (veja, por exemplo Patente U.S. 5,416,016); manosídeos (Umezawa e outro, 1988 Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticorpos (P.G. Bloeman e outro, 1995 FEBS Lett. 357:140; M. Owais e outro, 1995 Antimicrob. Agents Chemoth. 39:180); receptor proteína A de tensoativo (Briscoe e outro, 1995 Am. J. Physiol. 123:134); p120 (Schreier e outro, 1994 J. Biol. Chem. 269:9090); veja da mesma forma K. Keinänen; M.L. Laukkanen, 1994 FEBS Lett. 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler, 1994 Immunomethods 4:273.

Doenças e distúrbios alvos

[0148] A invenção fornece um polipeptídeo, ácido nucléico ou composição farmacêutica da invenção para uso em terapia. A invenção também fornece um polipeptídeo, ácido nucléico ou composição farmacêutica da invenção para uso no tratamento de um distúrbio patológico. A invenção também fornece uso de um polipeptídeo, ácido nucléico ou composição farmacêutica da invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio patológico. A invenção também fornece um método de tratar um paciente sofrendo de um

distúrbio patológico compreendendo administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de um polipeptídeo, ácido nucléico ou composição farmacêutica da invenção ao referido paciente.

[0149] O distúrbio patológico pode ser uma doença ou distúrbio musculoesquelético, tal como atrofia muscular. Há muitas causas de atrofia muscular, incluindo como um resultado de tratamento com um glicocorticóide tal como cortisol, dexametasona, betametasona, prednisona, metilprednisolona, ou prednisolona. A atrofia muscular pode da mesma forma ser um resultado de desnervação devido a trauma de nervo ou um resultado de neuropatia degenerativa, metabólica, ou inflamatória (por exemplo, Síndrome de Guillian-Barré, neuropatia periférica, ou exposição a toxinas ambientais ou fármacos).

[0150] Além disso, a atrofia muscular pode ser um resultado de miopatia, tal como miotonia; um miopatia congênita, incluindo miopatia de nemaleno, miopatia multi/minicore e miopatia miotubular (centronuclear); miopatia mitocondrial; paralisia periódica familiar; miopatia inflamatório; miopatia metabólico, tal como causada por uma doença de glicogênio ou armazenamento de lipídio; dermatomiositise; polimiosite; miosite corporal de inclusão; miosite ossificante; rabdomiólise e mioglobínurias.

[0151] Em outra modalidade da descrição, a composição farmacêutica da invenção pode ser usada para o tratamento de Doença de Kennedy ou doença renal crônica

[0152] A miopatia podem ser causada por uma síndrome de distrofia muscular, tal como Duchenne, Becker, miotônica, fascioscapuloumeral, Esmeril-Dreifuss, oculofaríngea, escapuloumeral, do tipo cinturas, Fukuyama, uma distrofia muscular congênita, ou miopatia distal hereditária. A doença musculoesquelético pode da mesma forma ser osteoporose, uma fratura óssea, baixa estatura, ou nanismo.

[0153] Além disso, a atrofia muscular pode ser um resultado de uma

doença do neurônio motor adulto tal como esclerose lateral amiotrófica; atrofia muscular espinhal infantil, atrofia muscular espinhal juvenil, neuropatia motora autoimune com bloco de condutor multifocal, paralisia devido a acidente vascular cerebral ou lesão da medula espinhal, imobilização do esqueleto devido a trauma, repouso no leito prolongado, inatividade voluntária, inatividade involuntária, estresse metabólico ou insuficiência nutricional, câncer, AIDS, jejum, um distúrbio da glândula tireóide ou glândula supra renal ou glândula pituitária, diabetes, hipotonia congênita benigna, doença de núcleo central, doenças hepáticas (exemplos tal como fibrose, cirrose), sépsis, insuficiência renal, insuficiência cardíaca congestiva, envelhecimento, viagem espacial ou tempo gasto em um ambiente de gravidade zero.

[0154] Em uma modalidade particular, a composição farmacêutica da invenção pode ser usada para o tratamento de pacientes de queimadura incluindo a lesão por queimadura de adulto ou pediátrica, sofrendo de perda de massa corporal e/ou perda de massa muscular.

[0155] Exemplos de condições relacionadas a idade que podem ser tratadas incluem sarcopenia, atrofia de pele, perda de massa muscular, atrofia cerebral, aterosclerose, arteriosclerose, enfisema pulmonar, osteoporose, osteoartrite, incompetência imunológica, pressão alta, demência, doença de Huntington, doença de Alzheimer, cataratas, degeneração macular relacionada a idade, câncer de próstata, acidente vascular cerebral, expectativa de vida diminuída, fragilidade, perda de memória, rugas, função renal prejudicada, e perda de audição relacionada a idade; distúrbios metabólicos, incluindo Diabetes Tipo II, Síndrome Metabólica, hiperglicemia, e obesidade.

[0156] Em uma modalidade particular, a composição farmacêutica da invenção pode ser usada para o tratamento de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD)

[0157] Em outra modalidade da descrição a composição

farmacêutica da invenção pode ser usada para o tratamento de atrofia muscular. Em uma modalidade particular a descrição refere-se ao uso da composição farmacêutica da invenção para o tratamento de atrofia muscular, em que o grupo de atrofia é selecionado a partir do grupo consistindo em sarcopenia associada a obesidade, sarcopenia, e atrofia muscular associada a diabetes.

[0158] Outras condições que podem ser tratadas incluem doença ou insuficiência renal aguda e/ou crônica, fibrose hepática ou cirrose, câncer tal como câncer pancreático, gastrointestinal (incluindo esofágico, gástrico, e cólon), de pulmão, próstata, linfoma, ou de mama; Doença de Parkinson; condições associadas com morte neuronal, tal como ALS (esclerose lateral amiotrófica), atrofia cerebral, ou demência e anemia; infecções crônicas tal como tuberculose, se causada por tuberculose de Micobactéria ou por micobactérias atípicas; infecções fúngicas crônicas; e infecções oportunistas na fixação de supressão imune, se iatrogênica ou devido a AIDS.

[0159] Outras condições incluem caquexia, caquexia associada com uma artrite reumatóide e caquexia associaram com câncer.

[0160] Em outra modalidade a descrição refere-se a método de tratar um distúrbio muscular, o método compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz, como descrito acima, dos polipeptídeos da invenção. A necessidade de tratamento com os polipeptídeos descritos ou composições que os compreendem para aumentar massa muscular pode resultar em uma das condições mencionadas acima, particularmente como uma consequência de uma doença ou distúrbio musculoesquelético, tal como atrofia muscular, em que o distúrbio muscular é uma atrofia muscular selecionada a partir do grupo consistindo em sarcopenia associada a obesidade, sarcopenia, e atrofia muscular associada a diabetes.

[0161] Adicionalmente, a descrição refere-se a método de tratar

uma lesão por queimadura, uma doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), uma condição relacionada a idade como sarcopenia, doença de Kennedy, ou uma doença renal crônica, compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz a um paciente, como descrito acima, dos polipeptídeos da invenção.

[0162] Em outra modalidade, a descrição refere-se a um método para aumentar massa muscular. Em uma modalidade particular a descrição refere-se a um método para aumentar massa muscular em um paciente em necessidade do mesmo. A necessidade de aumentar massa muscular pode resultar em uma das condições mencionadas acima, particularmente como uma consequência de uma doença ou distúrbio musculoesquelético, tal como atrofia muscular. A necessidade para aumentar massa muscular pode da mesma forma resultar em uma lesão por queimadura, uma doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), uma condição relacionada a idade como sarcopenia, doença de Kennedy, ou uma doença renal crônica.

Administração de paciente

[0163] Uma composição farmacêutica da invenção pode ser administrada a um paciente. Administração tipicamente será por meio de uma seringa. Desse modo a invenção fornece um dispositivo de liberação (por exemplo uma seringa) incluindo uma composição farmacêutica da invenção.

[0164] Vários sistemas de liberação são conhecidos e podem ser usados para administrar os polipeptídeos da invenção, por exemplo, encapsulação em lipossomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capazes de expressar a proteína, endocitose mediada por receptor (veja, por exemplo, Wu e Wu, J Biol Chem 262:4429-4432, 1987), construção de um ácido nucléico como parte de um retroviral, vírus adeno-associado, adenoviral, poxviral (por exemplo, avipoxviral, particularmente fowlpoxviral) ou outro vetor, etc. Métodos de introdução

podem ser enterais ou parenterais e incluem porém não são limitados a rotinas intradérmicas, intramusculares, intraperitoneais, intravenosas, subcutâneas, pulmonares, intranasais, intra-oculares, epidurais, e orais. Os polipeptídeos podem ser administrados por qualquer rotina conveniente, por exemplo por infusão ou injeção de bolo, por absorção através de revestimentos epiteliais ou mucocutâneos (por exemplo, mucosa oral, mucosa retal e intestinal, etc.) e podem ser administrados juntamente com outros agentes biologicamente ativos. Administração pode ser sistêmica ou local. Além disso, pode ser desejável para introduzir as composições farmacêuticas da invenção no sistema nervoso central por qualquer rotina adequada, incluindo injeção intraventricular e intratecal; injeção intraventricular pode ser facilitada por um cateter intraventricular, por exemplo, ligado a um reservatório, tal como um reservatório de Ommaya. Em uma modalidade específica, pode ser desejável para administrar as composições farmacêuticas da invenção localmente à área em necessidade de tratamento; isto pode ser obtido, por exemplo, e não por meio de limitação, por infusão local durante cirurgia, aplicação tópica, por exemplo, por injeção, por meios de um cateter, ou por meios de um implante, o implante sendo de um material poroso, não poroso, ou gelatinoso, incluindo membranas, tais como membranas sialásticas, fibras, ou substitutos de pele comerciais.

[0165] Em outra modalidade, a composição farmacêutica pode ser liberada em uma vesícula, em particular um lipossoma (veja Langer, Science 249:1527-1533, 1990). Em ainda outra modalidade, o agente ativo pode ser liberado em um sistema de liberação controlado. Em uma modalidade, uma bomba pode ser usada.

Grupos de pacientes

[0166] Pacientes que podem beneficiar do tratamento proposto incluem pacientes recuperam-se de doença aguda ou crítica requerendo cuidado intensivo ou hospitalização prolongada (mais do

que 1 semana); pacientes idosos frágeis com sarcopenia; adultos jovens recuperam-se de trauma severo, tal como acidentes de automóvel, queimaduras severas, lesões de combate, e outras lesões traumáticas; pacientes com doenças crônicas conhecidas por causar caquexia, como listado acima; e pacientes com doenças musculares, como listado acima. Visto que perda muscular é uma complicação comum da maioria das doenças que são severas ou prolongadas, é antecipado que reversão de perda de massa muscular acelerará a recuperação e retornará a função de pacientes que experimentam perda muscular independente da causa raiz desta perda.

Terapia de combinação

[0167] Este tratamento pode ser combinado com qualquer tratamento apontado na causa primária do processo de perda de massa muscular. Tais combinações podem incluir corticosteróides, agentes suppressivos imunes, agentes anti-citocina, fármacos anticâncer; fatores de crescimento tal como eritropoietina, G-CSF, GM-CSF, ou outros; fármacos usados para o tratamento de diabetes (incluindo insulina e agentes hipoglicêmicos orais), fármacos antituberculose, e antibióticos. Combinações podem incluir igualmente agentes de molécula pequena e biomolécula.

[0168] As composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas como o único agente ativo ou juntamente com, por exemplo como um adjuvante a ou em combinação a, outros fármacos por exemplo um anticorpo de ActRIIB, um anticorpo de ActRIIA, um mimético de isca de ActRIIB solúvel, um anticorpo de antimioestatina, um propeptídeo de mioestatina, uma proteína de isca de mioestatina que liga ActRIIB porém não ativa, um agonista beta 2, um agonista de Grelina, um SARM, agonistas de GH/miméticos ou foliestatina. Por exemplo, o fármaco da invenção pode ser usado em combinação com um anticorpo de ActRIIB como descrito em WO2010125003.

Sequências

SEQ NO.	ID	DNA / PROT.	Descrição	Sequência
1		PROT.	hIGF-1 sem a sequência líder	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA
2		PROT.	Ea Peptídeo	RSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYRM
3		PROT.	Eb Peptídeo	RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNKNTKSQRRKGWPKTHPGGEQKEGTEASLQIRGKKKEQRREIGSRNAECRGKKGK
4		PROT.	Ec Peptídeo	RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNKNTKSQRRKGSTFEERK
5		PROT.	IGF-1-Ea tipo silvestre sem a sequência líder	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYRM
6		PROT.	hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc domínio,	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTGIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAKSAVRAQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYRMGSDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

7	PROT.	hIgF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, domínio de R77Q-fc,	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTGIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAKSAVRAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYRMGSDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
8	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYQMDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
9	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYQMCPPEAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASGCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

11	PROT.	hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
12	PROT.	hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSGAGNKNYQMDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	PROT.	hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSGAGNKNYQMCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	PROT.	hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15	DNA	hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E	acgctctgcggggctgagctggtggatgctcttcagttcgtgtgtggagacaggggctttatttcaacaagcccacagggt atggctccagcagtcaggcggcgccctcagacaagcatcgtggatgagtgctgtcctccggagctgtgatctaaggaggct ggagatgtattgcgacccctcaagcctgccgtccaggcccagcagcacaccgacatgccaagaccagaagga agtacattgaagaacgcaagtagagggagtgacaggaaacaagaactaccagatggacaaaactcacacatgccc accgtgccagcacctgaagcagcggggggaccgtcagttcttcttcccccaaaaaccaaggacaccctcatgat ctcccgacccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgt ggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtca gcgtctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcca gccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcc cgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatgcggtgga gtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctccgtgctggactccgacggctccttctct ctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgttctcatgctccgtgatgcatgaggctct gcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa
16	DNA	hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A	acgctctgcggggctgagctggtggatgctcttcagttcgtgtgtggagacaggggctttatttcaacaagcccaca gggtatggctccagcagtcaggcggcgccctcagacaagcatcgtggatgagtgctgtcctccggagctgtgatctaa ggaggctggagatgtattgcgacccctcaagcctgccgtccaggcccagcagcacaccgacatgccaagac ccagaaggaagtacattgaagaacgcaagtagagggagtgacaggaaacaagaactaccagatgtgcccacc gtgccagcacctgaagcagcggggggaccgtcagttcttcttcccccaaaaaccaaggacaccctcatgat ctcccgacccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtta cgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggt ggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaag ccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctt gccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcg acatgcggtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgctgctggactc cgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgttctcatgct ccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

17	DNA	hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C	acgctctgcggggctgagctggtggatgctcttcagttcgtgtgtggagacaggggctttatttcaacaagcccaca gggatggctccagcagtcaggcggcgccctcagacaagcatcgtggatgagtgctgcttccggagctgtgatctaa ggaggctggagatgtattgcgcacctcaagcctgccgtccaggcccagcagcacaccgacatgccaaagac ccagaaggaagtacatttgaagaacgcaagtgggtgccaccgtgccagcacctgaagcagcggggggacc gtcagtcttcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctccggaccttgaggtcacatgcgtggtggt ggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaga caaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactg gctgaatggcaaggagtacaagtcaaggttccaacaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcca aagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccgggaggagatgaccaagaac caggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcag ccggagaacaactacaagaccacgcctcccggtgctggactccgacgggtccttcttctctacagcaagctcaccg tggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactaca cgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa
18	DNA	hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F	acgctctgcggggctgagctggtggatgctcttcagttcgtgtgtggagacaggggctttatttcaacaagcccaca gggatggctccagcagtcaggcggcgccctcagacaagcatcgtggatgagtgctgcttccggagctgtgatctaa ggaggctggagatgtattgcgcacctcaagcctgccgtccaggcccagcagcacaccgacatgccaaagac ccagaaggaagtacatttgaagaacgcaagtggggacaaaactcacacatgcccaccgtgccagcacctgaa gcagcggggggaccgtcagtcttcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctccggaccttgag gtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggag gtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccg tctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtcaaggttccaacaagccctcccagccccatc gagaaaaccatctcaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccgggag gagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgg gagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccggtgctggactccgacgggtccttcttctc tacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggct ctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

19	DNA	hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E	acgctctgcggggctgagctggtggatgctcttcagttcgtgtgtggagacaggggctttatttcaacaagcccacagggg atggctccagcagtcgggaggcgctcagacaagcatcgtggatgagtgctgctccggagctgtgatctaaggaggct ggagatgtattgcgacccctcaagcctgccgtccaggcccagcagcacaccgacatgcccaagaccagaagga agtacattgaagaacgcaagtagagggagtgacaggaaacaagaactaccagatggacaaaactcacacatgcc accgtgccagcacctgaagcagcggggggaccgtcagttctctctcccccaaaaaccaaggacaccctcatgat ctcccgacccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgt ggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtca gcgtctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcca gccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcc cgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatgcggtgga gtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctccgtgctggactccgacggctccttctct ctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgttctctcatgctccgtgatgcatgaggctct gcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa
20	DNA	hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A	acgctctgcggggctgagctggtggatgctcttcagttcgtgtgtggagacaggggctttatttcaacaagcccaca gggtatggctccagcagtcgggaggcgctcagacaagcatcgtggatgagtgctgctccggagctgtgatctaa ggaggctggagatgtattgcgacccctcaagcctgccgtccaggcccagcagcacaccgacatgcccaagac ccagaaggaagtacattgaagaacgcaagtagagggagtgacaggaaacaagaactaccagatgtgccacc gtgccagcacctgaagcagcggggggaccgtcagttctctctcccccaaaaaccaaggacaccctcatgat ctcccgacccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtga cgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggt ggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaag ccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctt gccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcg acatgcggtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgctgctggactc cgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgttctctcatgct ccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

21	DNA	hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F	acgctctgcggggctgagctggtggatgctcttcagttcgtgtgtggagacaggggctttatttcaacaagcccaca gggtatggctccagcagtcgggaggcgctcagacaagcatcgtggatgagtgctgctccggagctgtgatctaa ggaggctggagatgtattgcgcacccctcaagcctgccgtccaggcccagcagcacaccgacatgccaagac ccagaaggaagtacatttgaagaacgcaagtggggacaaaactcacacatgcccaccgtgccagcacctgaa gcagcggggggaccgtcagtccttcttccccccaaaaccaaggacaccctcatgatctccggaccctgag gtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggag gtgcataatgccaagacaaagccgcggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccg tctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaagggtctccaacaagccctcccagccccatc gagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggag gagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatgccgtggagtgg gagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttctcctc tacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggct ctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa
22	PROT.	articulação 1	CPPCPA
23	PROT.	articulação 2	DKTHTCP CPA
24	PROT.	articulação 3	EPKSCDKTHTCP CPA
25	PROT.	Ea-peptídeo 1 mutado	VQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASG
26	PROT.	E-peptídeo mutado	VQAQQHTDMPKTQKYQPPATNKNTKSQRRKGS
27	PROT.	hlgF1-Ea-mut 03	GPTLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTGIVDECCFRSCDLR RLEMYCAPLKPASAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYRM

28	DNA	hlgF1-Ea-mut 03	ggaccgacgctctgcggggctgagctggtggatgctcttcagttcgtgtgtggagacaggggctttatttcaacaag cccacaggggatggctccagcagtcgggcggcgccctcagacagggcatcgtagtgctgctccggagctgt gatctaaggaggctggagatgtattgcgcacccctcaagcctccaagtcagctgtccgtgccagcgccacacc gacatgcccgaagacccagaaggaagtacatttgaagaacgcaagtagagggagtgaggaaacaagaactac aggatg
29	PROT.	hlgF1-Ea-Fc_mut 02	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYQMGSDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
30	PROT.	hlgF1-Ea-Fc_mut 04	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEM YCAPLKPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYQMGSDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
31	PROT.	hlgF1-Ea-Fc_mut 13	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTGIVDECCFRSCDLRRRL EMYCAPLKPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYQMGSDKTHTC CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK

32	PROT.	Exemplo 8	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
33	PROT.	Exemplo 9	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRL MYCAPLKPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
34	PROT.	Exemplo 10	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLRRL MYCAPLKPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
35	PROT.	Exemplo 11	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFRSCDLRRL MYCAPLKPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
36	PROT.	Exemplo 12	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
37	PROT.	Exemplo 13	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRL MYCAPLKPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
38	PROT.	Exemplo 14	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAKSAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
39	PROT.	Exemplo 15	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
40	PROT.	Exemplo 16	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
41	PROT.	Exemplo 17	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRL MYCAPLKPAKSAVRAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
42	PROT.	Exemplo 18	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRL MYCAPLKPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM

43	PROT.	Exemplo 19	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
44	PROT.	Exemplo 20	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAKSAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
45	PROT.	Exemplo 21	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
46	PROT.	Exemplo 22	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
47	PROT.	Exemplo 23	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAKSAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
48	PROT.	Exemplo 24	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
49	PROT.	Exemplo 25	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
50	PROT.	Exemplo 26	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAKSAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
51	PROT.	Exemplo 27	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
52	PROT.	Exemplo 28	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
53	PROT.	Exemplo 29	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM

54	PROT.	Exemplo 30	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRL MYCAPLKPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
55	PROT.	Exemplo 31	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
56	PROT.	Exemplo 32	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRL MYCAPLKPAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
57	PROT.	Exemplo 33	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLRRL MYCAPLKPAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
58	PROT.	Exemplo 34	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFRSCDLRRL MYCAPLKPAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
59	PROT.	Exemplo 35	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAQVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
60	PROT.	Exemplo 36	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRL MYCAPLKPAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
61	PROT.	Exemplo 37	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
62	PROT.	Exemplo 38	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
63	PROT.	Exemplo 39	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
64	PROT.	Exemplo 40	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRL MYCAPLKPAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM

65	PROT.	Exemplo 41	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
66	PROT.	Exemplo 42	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
67	PROT.	Exemplo 43	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
68	PROT.	Exemplo 44	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
69	PROT.	Exemplo 45	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
70	PROT.	Exemplo 46	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
71	PROT.	Exemplo 47	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
72	PROT.	Exemplo 48	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
73	PROT.	Exemplo 49	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
74	PROT.	Exemplo 50	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
75	PROT.	Exemplo 51	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM

76	PROT.	Exemplo 52	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
77	PROT.	Exemplo 53	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRL MYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
78	PROT.	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q - domínio de fc	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTGIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
79	PROT.	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42A, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q - domínio de fc	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTAIVDECCFRSCDLRRL MYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
80	PROT.	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42Q, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q - domínio de fc	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTQIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
81	PROT.	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42P, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q - domínio de fc	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTPIVDECCFRSCDLRRL MYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
82	PROT.	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42K, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q - domínio de fc	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTKIVDECCFRSCDLRRL MYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
83	PROT.	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42E, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q - domínio de fc	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTEIVDECCFRSCDLRRL MYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM

84	PROT.	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42I, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q - domínio de fc	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTIIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSGAGNKNYQM
85	PROT.	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42Y, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q - domínio de fc	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTYIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSGAGNKNYQM
86	PROT.	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, D42, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q - domínio de fc	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSGAGNKNYQM
87	PROT.	hIGF1-Ea (delGPE, R37A)	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTGIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSGAGNKNYRM
88	DNA	hIGF1-Ea-hFc_mut2 iniciador dianteiro	TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC
89	DNA	hIGF1-Ea-hFc_mut2 iniciador reverso	TCACAGCTCCGGAAGCAGCACTCATCCACGATGCTTGTCTGAGGCGCCGCCC
90	DNA	hIGF1-Ea-hFc_mut3 iniciador dianteiro	TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC
91	DNA	hIGF1-Ea-hFc_mut3 iniciador reverso	TCACAGCTCCGGAAGCAGCACTCATCCACGATGGGTGTCTGAGGCGCCGCCC
92	DNA	hIGF1-Ea-hFc_mut4 iniciador dianteiro	TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC
93	DNA	hIGF1-Ea-hFc_mut4 iniciador reverso	TCACAGCTCCGGAAGCAGCACTCATCCACGATGCCTGTCTGAGGCGCMNNCC GACTGCTGGAGCCATACCCTGTGG

94	DNA	hIGF1-Ea-hFc_mut12 iniciador dianteiro	TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC
95	DNA	hIGF1-Ea-hFc_mut12 iniciador reverso	TGTCTGAGGCGCCCGCGCACTGCTGGAGCCATACCCTGTGGGC
96	DNA	hIGF1-Ea-hFc_mut13 iniciador dianteiro	TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC
97	DNA	hIGF1-Ea-hFc_mut13 iniciador reverso	TGTCTGAGGCGCCGCGCTGACTGCTGGAGCCATACCCTGTGG
98	DNA	G42 iniciador de mutação	CGGTACGTGCTGGCGTACTGCTCCTCCCGCGGCTTTG
99	DNA	derivado de CHOK1 clone 1: cópia Δ2	AGCGTGACCCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGC CATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAA AGGCGTGTGTGTGCCTGCCTGCCCACCTGGCACCTAC (?) ag)GTTTCGAGGGCTGGCGCTGTGTGGACCGCGATTTCTGCGCCAACATCCCCA ACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTCATCCACGATGGCGAGTGCAT GCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCT CTTGTTCCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTTCATATTCCATGATTGTAGGAACC ACCCAGAGGTTTCATCCAG

100	DNA	derivado de CHOK1 nocaute clone 2: cópia Δ5	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGC CATAACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAA AGGCGTGTGTGTGCCTGCCTGCCCACCTGGCACCTACAG (?) gttcg)AGGGCTGGCGCTGTGTGGACCGCGATTTCTGCGCCAACATCCCCAACG CTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTCATCCACGATGGCGAGTGCATGCA AGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTT GTTCCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCAC CCAGAGGTTTCATCCAG
101	DNA	derivado de CHOK1 nocaute clone 3: cópia Δ2	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGC CATAACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAA AGGCGTGTGTGTGCCTGCCTGCCCACCTGGCACCTAC (?) ag)GTTTCGAGGGCTGGCGCTGTGTGGACCGCGATTTCTGCGCCAACATCCCCA ACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTCATCCACGATGGCGAGTGCAT GCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCT CTTGTTCCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTTCATATTCCATGATTGTAGGAACC ACCCAGAGGTTTCATCCAG
102	DNA	derivado de CHOK1 nocaute clone 2: cópia Δ22	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGC CATAACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAA AGGCGTGTGTGTGCCTGCCTGCCCACCTGGC (?) acctacaggttcgagggctggc)GCTGTGTGGACCGCGATTTCTGCGCCAACATCCCCA ACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTCATCCACGATGGCGAGTGCAT GCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCT CTTGTTCCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTTCATATTCCATGATTGTAGGAACC ACCCAGAGGTTTCATCCAG

103	DNA	derivado de CHOK1 nocaute clone 1: cópia 14 nucleotídeos substituídos e 18 adicionados	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGC CATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAA AGGCGTGTGTGTGCCTGCCTGCCCACCTGGtgaggtataggacagtattatagaggtggggc AGGGCTGGCGCTGTGTGGACCGCGATTTCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGA GAGCAGTGA CT CAGATGGCTTTGTCATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAA TGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTTCC CCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCCACCCAGA GGTTCATCCAG
104	DNA	derivado de CHOK1 nocaute clone 3: cópia Δ114	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGC (ctaggcagctgccatacacctgacgacaacacaacctgtgtggcctgccgacactactactacaaaggcgtgtgt gtgcctgcctgccacctggcacctacaggttcgagggc)TGGCGCTGTGTGGACCGCGATTTCT GCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGA CT CAGATGGCTTTGTCATCCA CGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCC CAGAGGTCAGTGGCTCTTGTTCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTTCATATTCC CATGATTGTAGGAACCCACCCAGAGGTTTCATCCAG
105	DNA	derivado de CHO-DUXB11 nocautado clone: sequência Δ22	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGC CATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAA AGGCGTGTGTGTGCCTGCCTGCCCACCTGG (?) cacctacaggttcgagggctgg)CGCTGTGTGGACCGCGATTTCTGCGCCAACATCCCC AACGCTGAGAGCAGTGA CT CAGATGGCTTTGTCATCCACGATGGCGAGTGCA TGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGC TCTTGTTCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTTCATATTCCATGATTGTAGGAAC CACCCAGAGGTTTCATCCAG

106	DNA	derivado de CHO-DUXB11 nocaute clone: sequência $\Delta 7$	AGCGTGACCCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGC CATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAA AGGCGTGTGTGTGCCTGCCTGCCCACCTGGCACCTACA(gggtcga)GGGCTGGC GCTGTGTGGACCGCGATTTCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGA CTCAGATGGCTTTGTCATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAG GCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTTCCCATCCAGG AGGTGAATCTTGTTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCCAGAGGTTTCATCCA G
107	DNA	CHO IGF1R sítios de reconhecimento de dedo de zindo e sítio de corte	CCCACCTGGCACCTACAGGT/TCGAGGGCTGGCGCTGTGTGG
108	DNA	CHO IGF1R iniciador de sequenciamento dianteiro (em íntron 2-3)	CTAGCCTGTCTCTGGGACAC
109	DNA	CHO IGF1R iniciador de sequenciamento reverso (em íntron 3-4)	CTGGATGAACCTCTGGGTGG
110	DNA	CHO IGF1R exon 3	TGTGCCCCAAGTGTGTGCGGAAAGCGAGCGTGCACCCGAGAACAACGAATGCTG CCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGCCATACACCTGACGACAACACAACCTGT GTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGCCTGCCTGCCCAC CTGGCACCTACAGGT/TCGAGGGCTGGCGCTGTGTGGACCGCGATTTCTGCG CCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGA CT CAGATGGCTTTGTCATCCACGAT GGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGA G

111	DNA	CHO IGF1R exon 3 e íntrons de flaqueamento	AAACTTAACGGCACATCCCATAGCAAACCATTTTCATAAGAAAGGACTTGGCAT GTGTTGTGTCCTTTCCCAGTGTGGGCTTCACAGATGGTATTACCTGTGCAGAT TTCAGAGAAAGTGTGTTTTTCCTAGCCTGTCTCTGGGACACCATTTAGTGCTG GTTGTGGCAGCAGATGACCCTGGGGAGGCTGTGTAGTCTCTTCATCTCACCA CCTCCTCCCCCTGTTCCCACAGTGTGCCCAAGTGTGTGCGGAAAGCGAGCGT GCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGCCATAC ACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGC GTGTGTGTGCCTGCCTGCCACCTGGCACCTACAGGT/TCGAGGGCTGGCGC TGTGTGGACCGCGATTTCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACT CAGATGGCTTTGTCATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGG CTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTTCCCATCCAGGA GGTGAATCTTGTTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCCAGAGGTTTCATCCA GATGGGGAGGCTGTTGGAGGGTGCTGACTAAGCTTGTTTTTATGAGAATCTTG GAATGGCTGGTCTGTTCAATTTCTTTGTTTGGCTTGCTTTGTTGTCTTTGAA AGTGCCTTGCTAGCCCTAGAGAGGAAGAATTAGCCTGCTG
112	DNA	Sequência de Kozak	CCCGCCCGCCACC
113	Prot.	hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72, R74Q, R77Q, R104Q-fc,	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTGIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYQMGSDKTH CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLS PGK

114	Prot.	hIGF1-Ea-hFc_mut03	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTPIVDECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYQMGSDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
115	PROT.	Ea-peptídeo 1 mutado	VQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYQM
116	PROT	hIGF1-Ea-hFc_mut 12	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSARAPQTGIVDECCFRSCDLRRLE EMYCAPLKPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYQMGSDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
117	PROT	IGF-1 (G42S)	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTSIVDECCFRSCDL RRLEMYCAPLKPAKSA
118	PROT	hIGF1-Ea-mut 03-G42S	GPTLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLR RLEMYCAPLKPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYRM

MODOS PARA REALIZAR A INVENÇÃO

[0169] Será entendido que a invenção foi descrita por meio de exemplo apenas e modificações podem ser feitas ainda permanecendo dentro do escopo e espírito da invenção.

EXEMPLOS

[0170] As variantes de IGF-1 recombinantes descritas aqui têm uma afinidade de receptor semelhante a proteína tipo silvestre (figura 1), porém mostra um melhor perfil farmacocinético *in vivo* do que IGF-1 tipo silvestre (figura 7) e podem ser usadas para prevenir atrofia muscular com dosagem menos frequente (figura 8). Em contraste com algumas variantes de IGF-1 da técnica anterior, que estimulam fosforilação de receptor de insulina (InsR) levando ao risco de hipoglicemia, as proteínas de precursor de IGF-1 humanas descritas sendo mutadas na posição G42 (deleção ou substituições específicas) mostra uma capacidade semelhante a tipo silvestre para estimular fosforilação de receptor de insulina (InsR), que diminui o referido risco de hipoglicemia (figura 5/6/19). Além disso, em contraste com o hIGF-1 tipo silvestre ou algumas variantes da técnica anterior do mesmo, as variantes de IGF-1 descritas aqui podem ser produzidas, em títulos altos e sem degradação em sistemas de células de mamífero, permitindo uma produção de escala industrial.

PARTE : Metodologia Geral

A1 Reagentes

[0171] IGF-1 humano recombinante foi de Novartis AG e insulina humana recombinante foi comprada de Promocell (#C-60212).

A2 Construção de vetor

[0172] Várias reuniões de vetor de acordo com os ensinamentos da presente invenção são possíveis. Como os elementos individuais do vetor são conhecidos na técnica anterior, vetores adequados podem ser reunidos por exemplo por sequenciamento ou amplificação e clonagem

apropriada dos elementos genéticos básicos e cassetes de expressão na orientação desejada. Métodos de clonagem respectivos são o estado da técnica e da mesma forma a sequência dos elementos genéticos descrito acima são descritos na técnica anterior. Subsequentemente, a geração de construtores de vetor é descrita por meio de exemplo. Entretanto, é entendido por aqueles de experiência na técnica que várias outras modalidades e maneiras para obter os respectivos vetores são adequados e facilmente disponíveis. Todos os vetores de expressão de mamífero (por exemplo pBW679) descritos nesta seção estão com base nos vetores de expressão de mamífero descritos em WO2009080720. A seção de exemplo de WO2009080720, particularmente figura 1, tabela 1 e a seção do exemplo II: construções de vetor (página 21-31) estão aqui incorporadas por referência.

[0173] Novamente síntese de hIGF1-Ea-delGPE-R37A) (SEQ ID NO.: 87) foi ordenado em The Blue Heron Biotech flanqueada por um 5'Kozak (CCCGCCCGCCCACC) (SEQ IDs NO.: 112) e 5'HindIII/BamHI e sítios de restrição de 3'EcoRI foi liberado em um vetor de Blue Heron pUC. Reclonagem em vetor de pcDNA3.1 (Invitrogen, Life Technologies) foi completada por uma reação de ligação com sítios de clonagem 5' BamHI e 3'EcoRI compatíveis. Construção foi sequência completamente controlada usando iniciadores específicos de T7 e BGHA. Em seguida mutagênese sítio dirigida (Quick Change II site directed Mutagenesis Kit, Stratagene) foi feita para remover os dois resíduos de R71 e S72 usando o construtor prévio hIGF1-Ea-delGPE-R37A/pCDNA-3.1. O construtor resultante hIGF1-Ea-delGPE-R37A-delRS foi usado para reclonar hIGF1-Ea (delGPE, R37A, delRS) em vetor de expressão de mamífero pRS5a (vetor de propriedade de Novartis, NPL000961). pRS5a é um vetor de expressão de mamífero sob promotor de CMV, sítio de poliadenilação do gene de BGH (hormônio de crescimento bovino) e resistência de ampicilina. hIGF1-Ea (delGPE, R37A,

delRS)/pRS5a foi arquivado como NPL009759 (Novartis decoro vetor).

[0174] hIGF1-Ea (del GPE, R37A, del RS) foi ampliado de NPL009759. Produto de PCR foi digerido por 5'HindIII/3'BamHI e clonado de em vetor pRS5a-hlgG1 LALA (NPL012935, vetor de propriedade de Novartis). Vários círculos da mutagênese sítio dirigida como descrito acima foram realizados para liberar o plasmídeo para hIGF1-Ea (delGPE, R37A, delRS)-[R74Q-R78Q - R104Q] (NPL017580, vetor de propriedade de Novartis). Este plasmídeo foi usado como base para outras clonagens descritas abaixo.

[0175] **Plasmídeo de hIGF1-Ea-hFc_mut2:** Um fragmento de PCR contendo as mutações de G42S foi ampliado de NPL017580 usando oligos mutagênicos (5' TGACACTATAGAATAACATC CACTTTGCC 3') (SEQ ID NO.: 88) e (5' TCACAGCTCCGGAAGCAGCACTCATCCACG ATGCTTGTCTGAGGCGCCGCCC 3') (SEQ ID NO.: 89). Sítios de restrição de BlnI e BspEI endonuclease foram usados para clonagem do fragmento de PCR gerado outra vez em NPL017580.

[0176] **Plasmídeo de hIGF1-Ea-hFc_mut3:** Um fragmento de PCR que contém as mutações de G42P foi ampliado de NPL017580 usando oligos mutagênicos (5' TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC 3') (SEQ ID NO.: 90) e (5' TCACAGCTCCGGAAGCAGCACTCATCCACGATGGGTGTCTGAGGCGCCGCCC 3') (SEQ ID NO.: 91). Sítios de restrição de BlnI e BspEI endonuclease foram usados para clonar o fragmento de PCR gerado outra vez em NPL017580.

[0177] **Plasmídeo de hIGF1-Ea-hFc_mut4:** Um fragmento de PCR que contém a mutação de A37E foi ampliado de NPL017580 usando oligos mutagênicos (5' TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC 3') (SEQ ID NO.: 92) e (5' TCACAGCTCCGGAAGCAGCACTCATCCACGATGCCTGTCTGAGGCGCMNNCCGACTGCTGGAGCCATACCCTGTGG) (SEQ ID NO.: 93). O códon de oscilação é determinado em nomenclatura de IUPAC, onde M representa as bases A ou C e N

representa as bases A, C, G ou T. O último oligo transportaria um códon de oscilação para posição 37. Sítios de restrição de BlnI e BspEI endonuclease foram usados para clonar o fragmento de PCR gerado outra vez em NPL017580. Substituição de A37E foi selecionada por sequenciamento.

[0178] **Plasmídeo de hIGF1-Ea-hFc_mut12:** Um fragmento de PCR que contém a mutação de R36A-A37R foi ampliado de NPL017580 usando oligos mutagênicos (5' TGACACTATAGAATAACACCACTTTGCC 3') (SEQ ID NO.: 94) e (5' TGTCTGAGGCGCCCGCGCACTGCTGGAGCCATACCCTGTGGGC 3') (SEQ ID NO.: 95). Sítios de restrição de BlnI e SfiI endonuclease foram usados para clonar o fragmento de PCR gerado outra vez em NPL017580.

[0179] **Plasmídeo de hIGF1-Ea-hFc_mut13:** Um fragmento de PCR que contém a mutação de R36Q foi ampliado de NPL017580 (vetor de propriedade de Novartis) usando oligos mutagênicos (5' TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC 3') (SEQ ID NO.: 96) e (5' TGTCTGAGGCGCCCGCCTGACTGCTGGAGCCATACCCTGTGG 3') (SEQ ID NO.: 97); Sítios de restrição de BlnI e SfiI endonuclease foram usados para clonar o fragmento de PCR gerado outra vez em NPL017580.

[0180] As variantes hIGF1-Ea-hFc mut4 e mut13 foram também modificadas para introduzir um ligante diferente (isto é SEQ ID 22 e 23): sequências de ligante abrangendo de sítio de restrição de BspEI endonuclease (correspondendo a resíduo IGF1 F49-R50) a AleI (na porção de Fc) foram ordenadas em Geneart. Ligantes foram clonados por corte padrão e colados para obter plasmídeos para hIGF1-Ea-hFc_mut4_E, hIGF1-Ea-hFc_mut13_E e hIGF1-Ea-hFc_mut13_A. Em uma próxima etapa, a mutação que G42S foi introduzida.

[0181] **Plasmídeo de hIGF1-Ea-hFc_mut4/2_E e hIGF1-Ea-hFc_mut13/2_E:** Um fragmento de PCR que contém as mutações de

G42S foi ampliado de plasmídeo de hIGF1-Ea-hFc_mut2 usando oligos (5' TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC 3') (SEQ ID No.: 88) e (5' CGGTACGTGCTGGCGTACTGCTCCTCCCGCGGCTTTG 3') (SEQ ID No.: 98). sítios de restrição de BspEI e SfoI endonuclease foram usados para fazer clonar o fragmento de PCR gerado nos plasmídeos de hIGF1-Ea-hFc_mut4_E e hIGF1-Ea-hFc_mut13_E.

[0182] **Plasmídeo de hIGF1-Ea-hFc_mut13/2_A:** Fragmentos de PCR que contêm mutações de G42S-R36Q foram ampliadas a partir do plasmídeo de hIGF1-Ea-hFc_mut13/2_E usando oligos (5' TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC 3') (SEQ ID No.: 88) e (5' CGGTACGTGCTGGCGTACTGCTCCTCCCGCGGCTTTG 3') (SEQ ID No.: 98). Sítios de restrição de BspEI e SfoI endonuclease foram usados para clonar o fragmento de PCR gerado no plasmídeo de hIGF1-Ea-hFc_mut13_A.

A3 Produção de Proteína Recombinante

Produção em escala pequena:

[0183] Dois métodos de transfecção diferentes, com base em FuGene e polietilenimina (PEI), foram usados para produzir as variantes de IGF1-Fc.

[0184] 100 ml de cultura de HEK 293F foi transfectado com (PEI) como segue: 100 µg de DNA de plasmídeo em água foram diluídos em 7 ml de médio de expressão de FreeStyle (GIBCO, Cat. 12338026) durante 10 minutos em temperatura ambiente. 300 µg de PEI (de 1 mg/mL de matéria prima de PEI) foram diluídos em 7 ml de meio de expressão FreeStyle em temperatura ambiente. O DNA e soluções de PEI foram em seguida misturados juntos e incubados durante 15 minutos antes de adicionar a 36 ml de cultura de célula HEK 293F em uma densidade de cerca de $1,4 \times 10^6$ células/mL em um 500 ml de frasco de agitação. A cultura foi incubada em um Kuehner-Shaker ISF1-X (Kuehner) fixo em 100 rpm, 6% de CO₂ e 37 °C durante 6 dias.

Variantes de IGF1-Fc foram em seguida purificadas a partir de sobrenadantes de cultura de célula clareado por cromatografia de Proteína A usando coluna HiTrap MabSelect Sure 1ml (GE Healthcare) em um AKTA Avant (GE Healthcare). Depois da lavagem de linha de base com PBS, material ligado foi eluído com 50 mM de citrato, pH 3,0, 150 mM de NaCl e imediatamente neutralizado.

[0185] 100 ml de cultura de HEK 293F foi transfectado com Reagente de Transfecção de FuGENE HD (Roche) como segue: 100 µg de DNA de plasmídeo em água foram diluídos em 1 ml de meio de expressão FreeStyle (GIBCO, Cat. 12338026) mantido em temperatura ambiente. 400 µl de FuGENE foram adicionados ao DNA diluído e a mistura foi incubada durante 15 minutos em temperatura ambiente. O 1.4 ml de mistura de DNA-FuGENE foi em seguida adicionado a 98,6 mL de cultura de célula HEK 293F (Invitrogen) em um frasco de 500 ml tendo uma densidade de célula de cerca de $0,5 \times 10^6$ células/mL. A cultura foi incubada em um Kuehner-Shaker ISF1-X (Kuehner) fixo em 100 rpm, 6% de CO₂ e 37 °C durante 7 dias. Variantes de IGF1-Fc foram em seguida purificadas a partir de sobrenadantes de cultura de célula clareados por cromatografia de Proteína A usando coluna HiTrap MabSelect Sure 1ml (GE Healthcare) em um AKTA Avant (GE Healthcare). Depois de lavar linha de base com PBS, material ligado foi eluído com 50 mM de citrato, pH 3,0, 150 mM de NaCl e imediatamente neutralizado.

Produção em Meia escala:

[0186] 9,5 L de cultura de HEK 293 foi transfectado com polietilenimina (PEI) como segue: 10 mg de DNA de plasmídeo em tampão de TE foi incubado em 250 mL em meio de OptiMEM1 em temperatura ambiente [Gibco Cat. No #11058-021] durante 5 minutos. 20 mg de Polietilenimina PEI (de 1 mg/mL de matéria prima de PEI) foi adicionado a 250 mL meio de OptiMEM1 em temperatura ambiente

(Gibco Cat.no #11058-021). O DNA e soluções de PEI foram em seguida misturados juntos e incubados durante 15 minutos. O 500 mL de mistura de DNA-PEI foi em seguida adicionado a 9,5 L de cultura de HEK em uma densidade entre $0,75 \times 10^6$ células/mL e $1,25 \times 10^6$ células/mL. Células transfectadas foram inoculadas a 37°C entre um Wave Cellbag de 20 L (GE Healthcare, #CB0020L10-03). O Cellbag foi colocado em um Wave System 20/50 EHT fixo em 25 rpm, ângulo de balanço 7°, 7% de CO₂, 0.50 lpm ar, e 37°C. Construtores de fusão de Fc foram capturados a partir de sobrenadantes de cultura concentrados por cromatografia de Proteína A. Depois da lavagem de linha de base com PBS, material ligado foi eluído com 50 mM de citrato, pH 2,7, 140 mM de NaCl e imediatamente neutralizado. A fração neutralizada foi em seguida concentrada por ultrafiltração e de tamanho acima de Superdex 200 em PBS para remover alguns agregados de contaminação. Pureza do material foi >95% como julgado igualmente por SDS-PAGE e análise de LC-MS.

A4 Avaliar Nível de Agregação por SEC-MALS

[0187] Variantes de IGF-1-Fc purificadas de proteína foram testadas para nível de agregação por cromatografia de exclusão de tamanho acoplada com detector de dispersão da luz de multiângulo (SEC-MALS) medidas foram realizadas em um sistema de HPLC Agilent 1200 (Agilent Technologies) conectado a um detector de dispersão da luz de três ângulos (miniDAWN Treos, Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA). A concentração da amostra foi seguida *on-line* com um refractômetro diferencial (Optilab rEX, Wyatt Technology) usando um valor de incremento de índice refrativo específico (dn/dc) de 0,186 ml/g. Volumes de amostras de 50 µl foram injetadas em uma coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare). Os dados foram registrados e processados usando o software ASTRA V (Wyatt Technology). Para determinar os volumes de atraso de detector e coeficientes de

normalização para o detector de MALS, uma amostra de BSA (Sigma, A8531) foi usada como referência. Nem seleção nem uma correção de ampliação de faixa foi aplicada.

A5 Cultura de célula

[0188] Células de músculo esquelético humano (skMC) foram obtidas de Cambrex (#CC-2561). Mioblastos primários humanos foram cultivados em meio de crescimento [SkGM contendo 20% de soro bovino fetal (FBS, #2-01F40-1, Amimed) e 0,1% de gentamicina]. Depois de 4-5 dias (a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade) células foram semeadas em meio de crescimento em uma densidade de 150.000 células/cavidade e cultivadas (a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade). No dia 3 depois de semear mioblastos de skMC foram usados para sinalizar experiências. NIH3T3-IGF-1R e NIH3T3-InsR foram mantidos em D-MEM contendo 10% de FBS, 100U/ml de penicilina, e 100 µg/ml de estreptomicina. Mioblastos de cinomolgos primários foram isolados do gastrocnêmio de um *Macaca fascicularis*, macaco cinomolgo. Células foram cultivadas em SkBM contendo 20% de soro bovino fetal (FBS, #2-01F40-1, Amimed) e 0,1% de gentamicina (Life Technologies, #15750-037). adipócitos de 3T3-L1 e células de C2C12 foram obtidos a partir de American Type Culture collection (ATCC-CL-173 e ATCC; #91031101, respectivamente). Adipócitos de 3T3-L1 em DMEM, Glicose Alta, 1,5 g/Litro de NaHCO₃ (ATTC #30-2002) e diferenciação foi iniciado por adição de DMEM, contendo 10% de FCS, 1% de penicilina/estreptomicina, 0,5 mM de IBMX, 1 µM de dexametasona. Mioblastos de C2C12 foram diferenciados no dia 3 depois de semear. Para fazer, células foram lavadas uma vez com meio de diferenciação (DM) consistindo em DMEM suplementado com 2% de soro de cavalo inativado por calor (HS; #US 14-403F, Cambrex), 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de glutamina e em seguida incubadas em DM durante 72 horas a 37° C, 5% de CO₂ e 95% de umidade.

A6 Biacore

[0189] As propriedades de ligação foram caracterizadas por SPR usando um instrumento Biacore T200 a 25 °C. Três fragmentos de CM5 (GE, BR-1005-30) foram preparados aplicando-se o procedimento de acoplamento de amina padrão. Célula de fluxo 1 foi imobilizada vazias para servir como referência, visto que IGF-1 e hIGF-1-Ea-Fc_mut_13/2_A foram imobilizados nas células de fluxo de medição 2 e 3. Níveis de imobilização foram adaptados à interação individual e variaram de 20-143 RU (IGF-1) e de 32-113 RU (hIGF-1-Ea-Fc_mut_13/2_A). Séries de diluição de rec. IGF-1R humano (Sistemas de R&D, 391-GR) foram preparadas em tampão fluente, 1x HBS-EP+ (Teknova, H8022) contendo 30 mM de citrato e 0,05% de BSA, e injetadas no fragmento em uma taxa de fluxo de 50 µl/min. As faixas de concentração de analisado foram adaptadas à interação individual e variaram de 1000 – 3,9 nM (IGF-1R). Ligantes foram regenerados injetando-se tampão de eluição Ag/Ab suave (Thermo Scientific, 21027) durante 90 segundos a 50 µl/min. Constantes de taxa cinéticas e KD foram calculados ajustando-se sensorgramas referenciados duplos em um modelo de ligação de 1:1.

A7 ELISA

[0190] Para análise de fosforilação de IGF-1R, células semeadas em placas de 6 cavidades foram cultivadas em meio de crescimento durante 24 (NIH3T3-IGF-1R) ou 72 horas (mioblastos primários humanos e de cinomolgos). Células foram privadas de alimentação durante 24 (NIH3T3-IGF-1R) ou 4 (mioblastos primários humanos e de cinomolgos) horas e em seguida estimuladas com os peptídeos indicados durante 15 minutos a 37°C. Células foram lisadas com tampão de PhosphoSafe (Sinalização Celular) contendo vários inibidores de protease e clareadas por centrifugação a 14,000 x g durante 15 minutos a 4°C e Níveis de fosforilação de IGF-1R foram analisados por ELISA

usando *kit* de fósforo-IGF-1R humano DuoSet IC (R&D Systems).

[0191] Para análise de fosforilação de receptor de insulina células de NIH3T3-InsR foram semeadas em uma densidade de $0,2 \times 10^6$ células por cavidade de uma placa de 6 cavidades e foram cultivadas em meio de crescimento durante 24 horas. Células foram privadas de alimentação durante 18 horas em meio livre de soro e em seguida estimuladas com ligantes diferente a 37°C durante 10 minutos. Células foram lisadas como descrito acima e Níveis de fosforilação de InsR foram analisados por ELISA usando kit de ELISA de fósforo-InsR humano DuoSet IC (R&D Systems).

A8 Captação de glicose

[0192] Para medir captação de glicose adipócitos de 3T3-L1 e célula de miotubos de camundongo de C2C12 foram semeados em placas de 24 cavidades e cultivados em DMEM livre de soro durante 4 horas. DMEM livre de soro foi em seguida substituído com tampão de KRP (130 mM de NaCl, 1,3 mM de MgSO₄, 1,3 mM de CaCl₂, 5 mM de KCl e 10 mM de Na₂HPO₄) ou HBS (140 mM de NaCl, 2,5 mM de MgSO₄, 1,0 mM de CaCl₂, 5 mM de KCl e 10 mM de Hepes) para adipócitos de 3T3-L1 e C2C12, respectivamente. Células foram tratadas durante 1 hora com os peptídeos especificados a 37°C. Captação de glicose foi medida adicionando-se 0,4 (adipócitos) ou 0,8 (C2C12) µCi e [3H] 2-desóxi-D-glicose e 0,1 (adipócitos) ou 0,01 mM (C2C12) de 2-desóxi-D-glicose durante 10 (adipócitos) ou 5 (C2C12) minutos em temperatura ambiente. Meio foi aspirado e o ensaio foi terminado adicionando-se tampão de KRP ou HBS contendo 1 µM de citocalasina B. Células foram em seguida lavadas com PBS gelado e lisadas usando 0,2 M de NaOH e radioatividade analisada por contagem de cintilação (veja figura 5/6).

A9 Perfis farmacocinéticos

[0193] Ratos machos adultos (n=3/grupo) receberam uma injeção

de bolo intravenosa (i.v.) ou subcutânea de hIGF-1-Ea-Fc_mut 13/2_A ou hIGF-1-Ea-Fc_mut 04/2_E a 10 mg/kg ou hIGF-1 (1 mg/kg). Espécimes de sangue seriais foram coletadas em 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 168 e 336 horas depois da administração de variantes de IGF-1 ou 0,083, 0,25, 0,5, 2, 4, 8 e 24 horas depois da administração de hIGF-1. Concentrações de soro de proteínas recombinantes foram determinadas por ELISA.

A10 Efeitos de hIGF-1-Ea-Fc mut 13/2 A contra atrofia muscular induzida por dexametasona.

[0194] Dexametasona (Dex) foi dissolvida em PBS para obter uma dose de 0,075 mg/kg/dia com o Alzet modelo 2ML2 durante 28 dias. Dex foi combinada nas minibombas com hIGF-1 em uma dose de 3,8 mg/kg/dia no grupo C. Tratamento de Dex foi combinado com cada outro dia de tratamento subcutâneo de hIGF1-Ea-Fc_13/2_A nos grupos D, E e F em doses de 3, 10 e 30 mg/kg, respectivamente. Bombas foram carregadas com a solução e mantidas durante várias horas a 37°C em PBS até a implantação cirúrgica. Ratos foram tratados subcutaneamente com Temgesic em uma dose de 0,02 mg/kg com um volume de 1 mL/kg pelo menos 30 minutos antes da cirurgia, e em seguida as bombas com a solução indicada acima foram subcutaneamente implantadas na parte de trás dos ratos sob anestesia com isoflurano em uma concentração de 3%. Temgesic foi administrado subcutaneamente aos ratos 24 h e 48 h depois da cirurgia. Ratos nos grupos A, B e C foram tratados com injeção subcutânea diária de PBS. Pesos corporais foram medidos duas vezes por semana. Quatro semanas depois que os ratos de tratamento foram eutanizados com CO₂, e músculos foram dissecados e pesados.

PARTE B: Exemplos de Trabalho

[0195] Uma molécula da técnica anterior compreendendo um Ea-peptídeo, em que os resíduos de proteína E3, R71 e S72 foram

deletados e o aminoácido R37 foi substituído por alanina (hIGF1-Ea-Fc-mut 3) (SEQ ID NO.: 27) foi produzido e testado.

Exemplo 1: Preparação de cetores de expressão de DNA

1.1 Um vetor de expressão de DNA codificando o polipeptídeo de precursor de hIGF-1-Ea contendo as seguintes modificações foi construído como descrito acima: hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A (incluindo a porção de Fc de hlgG1 transportando a mutação de silenciamento de função efetora L234A L235A ("LALA") (SEQ ID No.: 9); em que G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), R37 é substituído por alanina e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q); e que é ligado a um região de Fc de IgG1 LALA.

[0196] Isto resulta na seguinte sequência de proteína segregada: (SEQ ID NO.: 9)

TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCF
RSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSGAG
NKNYQMCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

1.2 Um vetor de expressão de DNA codificando o polipeptídeo de precursor de hIGF-1-Ea compreendendo as seguintes modificações foi construído como descrito na seção A2 acima:

[0197] hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E (incluindo a região de Fc de hlgG1 LALA): uma proteína de precursor de IGF-1 humana, em que G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E) e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q); e que é ligado a uma região de Fc de IgG1 LALA.

[0198] Isto resulta na seguinte sequência de proteína segregada:
(SEQ ID NO.: 12)

TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFR
SCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSGAGN
KNYQMDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0199] Na base dos princípios esboçados acima, as seguintes proteínas adicionais foram produzidas:

Exemplo 54 (hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E; SEQ ID NO.: 8)

Exemplo 56 (hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C; SEQ ID NO.: 10)

Exemplo 50 (hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F; SEQ ID NO.: 11)

Exemplo 58 (hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A; SEQ ID NO.: 13)

Exemplo 59 (hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F; SEQ ID NO.: 14)

1.3 Um vetor de expressão de DNA codificando o polipeptídeo de hlgF-1 contendo as seguintes modificações foi construído usando construção de vetor de DNA / métodos de manipulações de DNA conhecidos na técnica: hlgF1 G42S (SEQ ID No.: 117);

[0200] Isto resulta na seguinte sequência de proteína:
(SEQ ID NO.: 117)

GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTSIVDE
CCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA

1.4 Um vetor de expressão de DNA codificando o polipeptídeo de hlgF-1 contendo as seguintes modificações foi construído usando construção de vetor de DNA / métodos de manipulações de DNA conhecidos na técnica: hlgF1-Ea-mut 03-G42S (SEQ ID No.: 118);

[0201] Isto resulta na seguinte sequência de proteína:

(SEQ ID NO.: 118)

GPTLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDEC
CFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASR
GSAGNKNYRM

Exemplo 2: Desafio de protease de variantes de IGF-1-Fc

[0202] Proteínas produzidas em sistemas de expressão de célula de mamífero, tal como por exemplo CHO, podem sofrer de degradação proteolítica durante expressão. Para eficazmente avaliar a suscetibilidade de protease potencial durante produção de uma maneira unificada, nós desenvolvemos um ensaio de desafio de protease usando proteína purificada e meios condicionados de culturas de célula de CHO. Comparação daquele ensaio para padrão de clivagem observado para uma variante de IGF-1-Fc produzida em célula de CHO forneceu uma validação de ensaio. Em resumo, células de CHO foram cultivadas (37°C, 6% CO₂, 85% de umidade de rel, 90 -150 rpm) em meio de CHODM122 de 2E5 células/ml em uma densidade de até 1E7 células/ml. O sobrenadante clareado fornece os meios condicionados usados para o ensaio. Variantes de IGF-1-Fc foram purificadas como descrito acima (A3) e reforçadas em a uma concentração de 100 ug/ml em meios condicionados ou PBS como controle. Amostras foram incubadas a 37°C até 20 dias e amostras a ser analisadas em vários pontos de tempo depois da filtração estéril foram tiradas. Os produtos de degradação diferentes poderiam ser bem isolados por técnicas de SDS-PAGE padrões (NuPAGE Bis-Tris, Invitrogen) e a intensidade das faixas de degradação foi quantificada densitometricamente. Os resultados são mostrados na Figura 17.

Exemplo 3: Ligação de alta afinidade de hIGF-1 e análogos em IGF-1R recombinante humano

[0203] Ligação de alta afinidade de variantes de hIGF-1 e IGF-1 a rhIGF1R foi medida usando ressonância de plásmon superficial

(Biacore). Um ensaio de ligação direto foi realizado. IGF-1-Ea_Fc_Mut_13/2_A humano e hIGF-1 foram imobilizados em um fragmento o receptor de IGF-1 serviu como analisado em solução. Os sensorgramas resultantes foram ajustados em um modelo de interação de 1:1 para calcular as constantes de dissociação de equilíbrio (KD). Os resultados mostram que ligação de hIGF-1-Ea_Fc_Mut_13/2_A a IGF-1R é comparável a hIGF-1 (Figura 1).

Exemplo 4: Indução de fosforilação de IGF-1R

[0204] A capacidade de variantes de hIGF-1 e hIGF-1 para estimular fosforilação do IGF-1R foi primeiro avaliada em células de NIH3T3 superexpressando IGF-1R humano (NIH3T3-IGF-1R) por ELISA. Nestes células fosforilação de IGF-1R foi induzida de uma maneira dependente de concentração por todos os peptídeos testados. Ajuste de curva logístico dos dados de ELISA dimensionados mostrou que a potência (EC_{50}) de hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, R77Q-Fc e hIGF1-Ea -Fc_mut_04/2_E foi diminuído comparado a hIGF-1 (Figura 2A-B). Entretanto, ajuste de curva logístico dos dados de ELISA dimensionados produziu um valor de resposta máximo muito comparável para todos os peptídeos testados (Figura 2C-D). A capacidade de variantes de hIGF-1 e hIGF-1 para estimular fosforilação de IGF-1R endógeno foi avaliada em mioblastos humanos primários e em mioblastos de cinomolgos. Nestas células fosforilação de IGF-1R foi induzida de uma maneira dependente de concentração por todos os peptídeos testados (Figura 4B-C). Ajuste de curva logístico dos dados de ELISA dimensionados mostrou que a potência (EC_{50}) de variantes de hIGF-1 foi E foi diminuída comparado a hIGF-1 (Figura 4A). Entretanto, ajuste de curva logístico dos dados de ELISA dimensionados produziu um valor de resposta máximo muito comparável por todos peptídeos testados (Figura 4).

Exemplo 5: Especificidade versus receptor de insulina

[0205] Para testar se as modificações de aminoácido de variantes de IGF-1 afetam especificidade de receptor, os efeitos de peptídeos de variantes de IGF-1 em fosforilação de InsR foram analisados em NIH3T3 superexpressando o InsR humano por ELISA. Nós tratamos transfectantes de célula NIH3T3-InsR com concentrações diferentes de variantes de IGF-1, hIGF-1 e insulina. Concentrações equimolares dos peptídeos indicados foram usadas. Os resultados destas experiências são mostrados na Figura 3/18. Modificações afetaram especificidade de receptor da maioria das variantes de IGF-1 com a exceção de variantes suportando a mutação de G42S (hIGF1-Ea -Fc_mut_02, hIGF1-Ea -Fc_mut_03, hIGF1-Ea -Fc_mut_04/2_E e hIGF1-Ea -Fc_mut_13/2_A) que foram mostrados manter especificidade de receptor e ser indutores de semana de fosforilação de InsR ainda em concentrações em que insulina daria respostas máximas. Surpreendentemente, hIGF1-Ea Fc_mut_13/2_A e hIGF1-Ea Fc_mut_04/2_E foram mostrados ser significativamente menos potentes do que IGF-1 em funções efectoras dirigidas por ligação de receptor de insulina rápida (por exemplo captação de glicose em adipócitos diferenciados) como mostrado na Figura 5B e D e na Figura 6. Em contraste, hIGF1-Ea Fc_mut_13/2_A e hIGF1-Ea Fc_mut_04/2_E e hIGF-1 foram equipotentes para funções mediadas por IGF-1R tal como captação de glicose em miotubos de C2C12 (Figura 5A e C). Introdução da mutação de G42S na proteína IGF-1 (resultando na variante de IGF-1 G42S de SEQ ID NO.: 117) bem como na proteína hIGF1-Ea-mut 03 (resultando na variante de hIGF1-Ea-mut 03 - G42S de SEQ ID NO.: 118) reduziu a fosforilação de InsR (Figura 18) nas células de NIH3T3-InsR. Além disso, as referidas mutações têm um impacto na captação de glicose em adipócitos e miotubos de C2C12, respectivamente (Figura 19)

Exemplo 6: Determinação de Concentração de Soro

[0206] Concentrações de soro de hIGF1-Ea-Fc-mut_13/2_A e

hIGF1-Ea.Fc_mut_04/2_E depois de única administração de dose i.v. e s.c. em ratos Fischer machos (n=3) foi determinada por ELISA específico para hIGF-1Ea 3mut (para detalhes veja A5 acima). Os resultados destas experiências são mostrados nas Figuras 7-A e 7-B. A meia-vida terminal está em torno de 75,3 e 50,1 horas, respectivamente. A concentração máxima foi alcançada depois de 8 e 24 horas (Tmax) de administração de dose s.c., respectivamente. Em contraste, seguindo administração intravenosa de hIGF-1 (1,0 mg/kg), os níveis de hIGF-1 foram quantificáveis durante uma faixa de tempo de 0-8 horas. Depois que Tmax (0,083 h) foi alcançado um declínio rápido da concentração de soro do peptídeo foi observado resultando em uma meia-vida terminal aparente de 1,81 h. Seguindo administração subcutânea de hIGF-1 (1,0 mg/kg), níveis de soro foram quantificáveis até 8 horas pós dosagem e a concentração máxima foi observada em 0,5 h pós dose. Desse modo os análogos de IGF-1 exibem um perfil farmacocinético muito melhorado comparado a IGF-1 humano.

Exemplo 7: Efeitos de hIGF-1-Ea-Fc mut 13/2 A contra atrofia muscular induzida por dexametasona

[0207] Visto que IGF-1 foi mostrado estimular síntese de proteína e inibir degradação de proteína em músculo esquelético, nós testamos se administração de hIGF-1-Ea_Fc_mut_13/2_A em ratos tratados com dexametasona poderia prevenir atrofia muscular. Ratos de Wistar machos foram continuamente infundidos por bomba de Alzet com 75 µg de dexametasona/kg/dia sozinho ou junto com veículo (PBS), ou hIGF-1. Um grupo adicional de animais infundidos com dexametasona como descrito acima recebeu qualquer outro dia injeção s.c de hIGF-1-Ea_Fc_mut_13/2_A. Todos os animais foram tratados durante vinte e oito dias e em seguida sacrificados. Peso corporal foi monitorado no início da experiência e em seguida no dia 28 pós injeção.

[0208] Como esperado reduções significantes em peso corporal e

muscular foram observadas em ratos tratados com dexametasona quando comparado a controle de veículo (Figura 8). Injeção de hIGF-1-Ea_Fc_mut_13/2_A significativamente reduziu a perda de peso corporal e muscular (Figura 8).

[0209] Além das variantes de polipeptídeos de precursor hIGF-1-Ea descritas acima, as seguintes variantes de proteína adicionais podem ser produzidas e usadas de acordo com a invenção:

Exemplo 8

[0210] (2b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), G42 é substituído por serina e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

tlcgaelvdaqlqfvcgdrqfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav
raqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 32).

Exemplo 9

[0211] (4b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E), G42 é substituído por serina e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

tlcgaelvdaqlqfvcgdrqfyfnkptgygsssqreapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav
raqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 33).

Exemplo 10

[0212] (5b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina, que G42 é substituído por serina e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

tlcgaelvdaqlqfvcgdrqfyfnkptgygsssqraapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav
raqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 34).

Exemplo 11

[0213] (6b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por prolina (P), G42 é substituído por serina e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

tlcgaelvdaqlqfvcgdrqfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav

raqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 35).

Exemplo 12

[0214] (8b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q), G42 é substituído por serina e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 36).

Exemplo 13

[0215] (9b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), R37 é substituído por alanina, G42 é substituído por serina e os aminoácidos R71 e S72 são deletados.

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 37).

Exemplo 14

[0216] (13b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), G42 é substituído por serina, os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 38).

Exemplo 15

[0217] (14b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), G42 é substituído por serina, os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 39).

Exemplo 16

[0218] (15b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), G42 é substituído por serina, os

aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdaqlqfvcgdrghfynkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav
qaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.: 40).

Exemplo 17

[0219] (16b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E), G42 é substituído por serina, os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácido R77 é mutado em glutamina (Q).

tlcgaelvdaqlqfvcgdrghfynkptgygsssqreapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav
raqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 41).

Exemplo 18

[0220] (17b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E), G42 é substituído por serina, os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdaqlqfvcgdrghfynkptgygsssqreapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav
qaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 42).

Exemplo 19

[0221] (18b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E), G42 é substituído por serina, os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdaqlqfvcgdrghfynkptgygsssqreapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav
qaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.: 43).

Exemplo 20

[0222] (19b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina (A), G42 é substituído por serina, os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

tlcgaelvdaqlqfvcgdrghfynkptgygsssqraapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav

qaqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 44).

Exemplo 21

[0223] (20b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina (A), G42 é substituído por serina, os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrsraapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav
qaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 45).

Exemplo 22

[0224] (21b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina (A), G42 é substituído por serina, os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrsraapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav
qaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.: 46).

Exemplo 23

[0225] (22b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por prolina (P), G42 é substituído por serina, os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrsrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav
qaqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 47).

Exemplo 24

[0226] (23b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por prolina (P), G42 é substituído por serina, os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrsrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav
qaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 48).

Exemplo 25

[0227] (24b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é

substituído por prolina (P), G42 é substituído por serina, os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav
qaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.: 49).

Exemplo 26

[0228] (25b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q), G42 é substituído por serina, os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav
vqaqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 50).

Exemplo 27

[0229] (26b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q), G42 é substituído por serina, os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav
vqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 51).

Exemplo 28

[0230] (27b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), R37 é substituído por alanina, G42 é substituído por serina, os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksav
vqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 52).

Exemplo 29

[0231] (28b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q), G42 é substituído por serina, os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104

são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqhtdmpktqkevhlnasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.: 53).

Exemplo 30

[0232] (29b) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), R37 é substituído por alanina, G42 é substituído por serina, os aminoácidos R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqhtdmpktqkevhlnasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.: 54).

Exemplo 31

[0233] (2c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), G42 é substituído por serina, os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavraqrhtdmpktqkevhlnasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 55).

Exemplo 32

[0234] (4c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E), G42 é substituído por serina, os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfnkptgygsssqreapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavraqrhtdmpktqkevhlnasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 56).

Exemplo 33

[0235] (5c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina, que G42 é substituído por serina, os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfnkptgygsssqraapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavraqrhtdmpktqkevhlnasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 57).

Exemplo 34

[0236] (6c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído

por prolina (P), G42 é substituído por serina, os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

tlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavraq
rhtdmpktqkevhlnasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 58).

Exemplo 35

[0237] (8c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q), G42 é substituído por serina e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

tlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaqvrq
qrhtdmpktqkevhlnasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 59).

Exemplo 36

[0238] (9c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), R37 é substituído por alanina, G42 é substituído por serina, os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados.

tlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavraq
rhtdmpktqkevhlnasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 60).

Exemplo 37

[0239] (13c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), G42 é substituído por serina e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

tlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavraq
rhtdmpktqkevhlnasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 61).

Exemplo 38

[0240] (14c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), G42 é substituído por serina e os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavraq
qhthdmpktqkevhlnasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 62).

Exemplo 39

[0241] (15c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), G42 é substituído por serina, os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaq
qhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.: 63).

Exemplo 40

[0242] (16c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E), G42 é substituído por serina, os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssrqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaq
rhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 64).

Exemplo 41

[0243] (17c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E), G42 é substituído por serina, os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssrqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaq
qhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 65).

Exemplo 42

[0244] (18c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E), G42 é substituído por serina, os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssrqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaq
qhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.: 66).

Exemplo 43

[0245] (19c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é

substituído por alanina (A), G42 é substituído por serina, os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssssraapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaq
rhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 67).

Exemplo 44

[0246] (20c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina (A), G42 é substituído por serina, os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssssraapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaq
qhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 68).

Exemplo 45

[0247] (21c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por alanina (A), G42 é substituído por serina, os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssssraapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaq
qhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.: 69).

Exemplo 46

[0248] (22c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por prolina (P), G42 é substituído por serina, os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaq
rhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 70).

Exemplo 47

[0249] (23c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por prolina (P), G42 é substituído por serina, os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 72 são deletados e aminoácidos R74 e R77

são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaq
qhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 71).

Exemplo 48

[0250] (24c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R37 é substituído por prolina (P), G42 é substituído por serina, os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaq
qhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.: 72).

Exemplo 49

[0251] (25c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q), G42 é substituído por serina, os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácido R74 é mutado em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqa
qrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 73).

Exemplo 50

[0252] (26c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q), G42 é substituído por serina, os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqa
qqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 74).

Exemplo 51

[0253] (27c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), R37 é substituído por alanina, G42 é substituído por serina, os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74 e R77 são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqa

qqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.: 75).

Exemplo 52

[0254] (28c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q), G42 é substituído por serina, os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqa
qqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.: 76).

Exemplo 53

[0255] (29c) G1, P2, E3 são deletados, aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q), R37 é substituído por alanina, G42 é substituído por serina, os aminoácidos K68, S69, A70, R71 e S72 são deletados e aminoácidos R74, R77 e R104 são mutados em glutamina (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqa
qqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.: 77).

Exemplo 54: Expressão de IGF-1 recombinante em linhagens celulares deficientes de Receptor de IGF-1 de CHO.

[0256] Expressão recombinante IGF-1 em linhagens celulares de CHO resultou em inibição de crescimento celular e baixos títulos. Na figura 11 medidas de título de hIGF-1Ea 3mut (SEQ ID NO.: 27) durante um processo de bioreactor é mostrada. A medida de título máxima de hIGF-1Ea 3mut foi 8 ug/ml que corresponde a 100 mg/L de um título de anticorpo (com base em massa molar). As medidas de título médias de um anticorpo recombinante em processo de bioreactor estão em torno 3 g/L. Uma causa do baixo título de IGF-1 é crescimento celular reduzido e baixa viabilidade de célula de células expressando IGF-1. Durante um processo de expressão de anticorpo, células de célula derivadas de CHO-K1 crescem até $2-2,5 \times 10^7$ células/ml e a viabilidade de célula está acima de 97% durante as primeiras 230-260 horas de tempo de cultivo. Em contraste células derivadas de CHO-K1 expressando IGF-1

crecem apenas até $0,5-0,9 \times 10^7$ células/ml e a viabilidade de célula cai já depois de 80 horas abaixo de 97% (veja figura 11).

[0257] O crescimento celular reduzido poderia da mesma forma ser detectado durante co-cultivo de células derivadas CHO-K1 não transfectadas com IGF-1. Figura 12 mostra que células derivadas de CHO-K1 parentais crescem até $2,5 \times 10^7$ células/ml. Durante co-cultivo de células derivadas de CHO-K1 com IGF-1 ou hIGF-1Ea 3mut tipo silvestre (50 mg/L) crescimento celular é da mesma forma inibido significativamente ($0,9 \times 10^7$ células/ml).

[0258] Na próxima etapa um inibidor de tirosina cinase específico de IGF-IR (NVPAEW541 (atividade antitumor *in vivo* de NVPAEW541-A inibidor novo, potente, e seletivo do IGF-IR cinase; Carlos García-Echeverría e outro; Cancer Cell; Publicado On-line em 26 de fevereiro, 2004 DOI: 10.1016/S1535610804000510) foi adicionado durante experiências de co-cultivo de IGF-1 em células derivadas de CHO-DUXB11. A inibição de crescimento celular poderia ser prevenida (veja figura 13). Isto verifica que IGF-1-R ativa um sinal na célula resultando em inibição de crescimento celular.

[0259] Na próxima etapa um nocaute de IGF-1R usando técnica de nuclease de dedo de zinco (ZFN) foi realizado em célula derivada de CHO-K1 e linhagens celulares derivadas de CHO-DUXB11. ZFN que são ligação específica na região de exon 3 de IGF-1R foram designados. Dois plasmídeos, cada um deles codificando para uma subunidade do ZFN específico de IGF-1R, foi co-transfectado em célula derivada de CHO-K1 ou células derivadas de CHO-DUXB11. Cada subunidade de ZFN liga 18 sequências logas de par de base específicas; portanto total uma sequência de 36 bp é específica reconhecida (evitando corte aleatório em outros locais do genoma). O domínio de endonuclease de FokI é reprojetoado para funcionar apenas como heterodímero para clivar o DNA. O dímero de ZFN cria quebras

de filamento duplo alvejadas em exon 3 de IGF-1R. Através do processo celular propenso a erro de ligação final não homóloga, esta quebra de filamento duplo pode resultar em modificação da sequência de DNA e por isto cria um nocaute funcional do gene alvejado. Para célula derivada de CHO-K1 três clones nocaute foram gerados (nocaute em ambas as mutações de troca de alelos e estrutura): Clone 1: $\Delta 2$ (SEQ ID NO.: 99), clone 2: $\Delta 5$ (SEQ ID NO.: 100) e clone 3: $\Delta 2$ (SEQ ID NO.: 101), clone 1: +18 (e substituição de 14 bps) (SEQ ID NO.: 103), clone 2: $\Delta 22$ (SEQ ID NO.: 102) e clone 3: $\Delta 114$ (SEQ ID NO.: 104).

[0260] Linhagem celular derivada de CHO-DUXB11 está em contraste com célula derivada de CHO-K1 policlonal e poliploidia que fizeram o nocaute do desafio de IGF-1R (mais do que 2 cópias/genoma de IGF-1R tiveram que ser nocauteados). Nós geramos vários clones nocaute únicos com mutação de troca de estrutura e validados dois deles com clonagem TOPO e sequenciamento. Clone 12: $\Delta 7$ (50%) (SEQ ID NO.: 106) / $\Delta 22$ (50%) (SEQ ID NO.: 105), clone 19: $\Delta 7$ (14,5%) / $\Delta 16$ (44%) / $\Delta 22$ (18%) / $\Delta 22\text{mut}$ (15%). As porcentagens em parênteses estão com base na frequência com que frequência esta mutação está ocorrendo fora de 32 colônias bacterianas sequenciadas. Para clone 19 pode ser assumido que 6 alelos de IGF-1R são existentes (3 x $\Delta 16$, 1 x $\Delta 7$, 1 x $\Delta 22$, 1 x $\Delta 22\text{mut}$). Os três clones KO de IGF-1R de célula derivada de CHO-K1 foram co-cultivados com IGF-1 e nenhuma inibição de crescimento celular poderia ser detectada (veja figura 14).

[0261] O dois clones derivados de CHO-DUXB11 de IGF-1R KO foram da mesma forma cultivados na presença/ausência de IGF-1. Similar como clones IGF-1R KO de CHO-K1 um crescimento celular melhorado poderia ser detectado para os clones KO em comparação às células derivadas de CHO-DUXB11 tipo silvestre (veja figura 15). Um dos clones KO não mostrou inibição de crescimento celular na presença de IGF-1 e o outro clone KO teve na presença de IGF-1 uma contagem

celular viável máxima similar como a célula derivada de CHO-DUXB11 sem co-cultivo de IGF-1.

Estratégia de clonagem de vetor pBW806 (hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A).

[0262] Vetor PBW806, codificando o hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A, foi preparado seguindo duas etapas de clonagem consecutivas. Em uma primeira etapa, plasmídeo 11ARNASC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_E_pMA-T (vetor de propriedade de Novartis) foi digerido com XbaI e AscI para extrair a região de Fc sintetizado novamente. Em paralelo pBW679 (vetor de propriedade de Novartis) foi digerido com AscI e XbaI gerando o fragmento de cadeia principal correspondente transportando elementos reguladores transcrpcionais e translacionais bem como um marcador de seleção/amplificação de G418/DHFR. Ambos os elementos digeridos foram ligados pelos seus fins compatíveis resultando no vetor intermediário pBW805. Em uma segunda etapa plasmídeo 11ARNAUC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A_pMA-T (vetor de propriedade de Novartis) foi digerido com XbaI e Sse232I para extrair a região n-terminal da proteína de fusão hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A. Em paralelo o vetor intermediário pBW805 foi subsequentemente digerido com Sse232I e XbaI liberando a fração de cadeia principal desejada que finalmente foi ligada com o fragmento de 11ARNAUC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A_pMA-T resultando no vetor de expressão final pBW806.

Estratégia de clonagem do vetor pBW807 (hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_C).

[0263] Vetor PBW807, codificando o hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_C, foi preparado seguindo duas etapas de clonagem consecutivas. Em uma primeira etapa plasmídeo 11ARNASC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_E_pMA-T (vetor de propriedade de Novartis) foi digerido com XbaI e AscI para extrair o região de Fc sintetizada novamente. Em paralelo pBW679 (vetor de propriedade de Novartis) foi digerido com AscI e XbaI gerando o fragmento de cadeia principal correspondente transportando elementos reguladores transcrpcionais e translacionais bem como um

marcador de seleção/amplificação de G418/DHFR. Ambos os elementos digeridos foram ligados por seus fins compatíveis resultando no vetor intermediário pBW805. Em uma segunda etapa plasmídeo 11ARNAWC_hlgF1-Ea-fc_mut 13/2_C_pMA-T (vetor de propriedade de Novartis) foi digerido com XbaI e Sse232I para extrair a região n-terminal da proteína de fusão hlgF1-Ea-fc_mut 13/2_C. Em paralelo o vetor intermediário pBW805 foi subsequentemente digerido com Sse232I e XbaI liberando a fração de cadeia principal desejada que finalmente foi ligada com o fragmento de 11ARNAUC_hlgF1-Ea-fc_mut 13/2_C_pMA-T (vetor de propriedade de Novartis) resultando no vetor de expressão final pBW807.

Estratégia de clonagem de vetor pBW808 (hlgF1-Ea-Fc mut 13/2 F).

[0264] Vetor pBW808, codificando o hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F (vetor de propriedade de Novartis), foi preparado seguindo duas etapas de clonagem consecutivas. Em uma primeira etapa plasmídeo 11ARNASC_hlgF1-Ea-fc_mut 13/2_E_pMA-T (vetor de propriedade de Novartis) foi digerido com XbaI e AscI para extrair a região de Fc sintetizada novamente. Em paralelo pBW679 (vetor de propriedade de Novartis) foi digerido com AscI e XbaI gerando o fragmento de cadeia principal correspondente transportando elementos reguladores transcricionais e translacionais bem como um marcador de seleção/amplificação de G418/DHFR. Ambos os elementos digeridos foram ligados por seus fins compatíveis resultando no vetor intermediário pBW805. Em uma segunda etapa plasmídeo 11ARNAYC_hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F_pMA-T (vetor de propriedade de Novartis) foi digerido com XbaI e Sse232I para extrair a região n-terminal da proteína de fusão hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_Fc. Em paralelo o vetor intermediário pBW805 foi subsequentemente digerido com Sse232I e XbaI liberando a fração de cadeia principal desejada que finalmente foi ligada com o fragmento de 11ARNAUC_hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F_pMA-T (vetor de propriedade de

Novartis) resultando no vetor de expressão final pBW808.

Estratégia de clonagem de vetor pBW809 (hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_E).

[0265] Vetor pBW809, codificando a sequência de fusão de Fc de HIGF1-EA-FC_MUT 04/2_E, foi preparado seguindo duas etapas de clonagem consecutivas. Em uma primeira etapa plasmídeo 11ARNASC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_E_pMA-T (vetor de propriedade de Novartis) foi digerido com XbaI e AscI para extrair a região de Fc sintetizada novamente. Em paralelo pBW679 (vetor de propriedade de Novartis) foi digerido com AscI e XbaI gerando o fragmento de cadeia principal correspondente transportando elementos reguladores transcricionais e translacionais bem como um marcador de seleção/amplificação de G418/DHFR. Ambos os elementos digeridos foram ligados por seus fins compatíveis resultando no vetor intermediário pBW805. Em uma segunda etapa plasmídeo 11ARNA2C_hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_E_pMA-T (vetor de propriedade de Novartis) foi digerido com XbaI e Sse232I para extrair a região n-terminal da proteína de fusão hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_E. Em paralelo o vetor intermediário pBW805 foi subsequentemente digerido com Sse232I e XbaI liberando a fração de cadeia principal desejada que finalmente foi ligada com o fragmento de 11ARNAUC_hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_E_pMA-T (vetor de propriedade de Novartis) resultando no vetor de expressão final pBW809.

Estratégia de clonagem de vetor pBW810 (hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_A).

[0266] Vetor pBW810, codificando a hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_A, foi preparado seguindo duas etapas de clonagem consecutivas. Em uma primeira etapa plasmídeo 11ARNASC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_E_pMA-T (vetor de propriedade de Novartis) foi digerido com XbaI e AscI para extrair a região de Fc sintetizada novamente. Em paralelo pBW679 (vetor de propriedade de Novartis) foi digerido com AscI e XbaI gerando o fragmento de cadeia principal correspondente transportando elementos reguladores transcricionais e translacionais bem como um

marcador de seleção/amplificação de G418/DHFR. Ambos os elementos digeridos foram ligados por seus fins compatíveis resultando no vetor intermediário pBW805. Em uma segunda etapa plasmídeo 11ARNA2C_hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_A_pMA-T (vetor de propriedade de Novartis) foi digerido com XbaI e Sse232I para extrair a região n-terminal da proteína de fusão hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_A. Em paralelo o vetor intermediário pBW805 foi subsequentemente digerido com Sse232I e XbaI liberando a fração de cadeia principal desejada que finalmente foi ligada com o fragmento de 11ARNAUC_hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_A_pMA-T (vetor de propriedade de Novartis) resultando no vetor de expressão final pBW810.

Estratégia de clonagem de vetor pBW410 (hIGF-1Ea 3mut).

[0267] Vetor 0610900pGA4 (vetor de propriedade de Novartis), codificando a sequência de hIGF-1Ea 3mut foi digerido com XbaI e MluI para extrair a sequência de IGF de codificação sintetizada novamente. Em paralelo pBW165 (vetor de propriedade de Novartis) foi digerido com MluI e XbaI gerando o fragmento de cadeia principal correspondente transportando elementos reguladores transcrpcionais e translacionais bem como um marcador de seleção/amplificação de G418/DHFR. Ambos os elementos digeridos foram ligados por seus fins compatíveis resultando no vetor de expressão final pBW410.

Estratégia de clonagem de vetor pBW664 (domínio de fc hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77).

[0268] Vetor 0905915 (vetor de propriedade de Novartis), codificando a sequência de domínio de fc hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77 foi digerido com XbaI e AscI para extrair a sequência de IGF de codificação sintetizada novamente. Em paralelo pBW596 (vetor de propriedade de Novartis) foi digerido com AscI e XbaI gerando o fragmento de cadeia principal correspondente transportando elementos reguladores transcrpcionais e translacionais bem como um marcador de

seleção/amplificação de G418/DHFR. Ambos os elementos digeridos foram ligados por seus fins compatíveis resultando no vetor de expressão final pBW664.

Estratégia de clonagem de vetor pBW666 (domínio de fc hIGF1-Ea- Δ 1-3, R37A, Δ 71-72, R77Q).

[0269] Vetor 0950919 (vetor de propriedade de Novartis), codificando a sequência de domínio de fc hIGF1-Ea- Δ 1-3, R37A, Δ 71-72, R77Q foi digerido com XbaI e AscI para extrair a sequência de IGF de codificação sintetizada novamente. Em paralelo pBW596 (vetor de propriedade de Novartis) foi digerido com AscI e XbaI gerando o fragmento de cadeia principal correspondente transportando elementos reguladores transcrpcionais e translacionais bem como um marcador de seleção/amplificação de G418/DHFR. Ambos os elementos digeridos foram ligados por seus fins compatíveis resultando no vetor de expressão final pBW666.

[0270] O clone KO de IGF-1R de célula derivada de CHO-K1 Δ 5/ Δ 22 bem como o clone KO de IGF-1R derivado de célula de CHO-DUXB11 Δ 7/ Δ 22 foram transfectados com 5 candidatos de fusão de IGF-1-FC diferentes (veja figura 15). Um aumento de título de 5-17 vezes proteína IGF-1-FC recombinante poderia ser detectado em nível de mistura comparado à célula derivada de CHO-K1 tipo silvestre/linhagem celular derivada de célula de CHO-DUXB11 transfectada com um candidato de fusão de IGF-1-FC diferente.

[0271] Dois dos candidatos de fusão de IGF-1-FC (hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A e hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_E) expressados em IGF1R-KO de célula derivada de CHO-K1 ou linhagem celular de IGF1R-KO derivada de CHO-DUXB11 foi cultivado em 100 L de bioreator de onda (processo de batelada alimentada e troca de temperatura). Misturas IGF1RKO de célula derivada de CHO-K1 expressando hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A/4 estão crescendo até um densidade de célula viável

máxima de 3×10^7 células/ml, que é mais alta do que um processo de AB médio (densidade de célula média é $2,2 \times 10^7$ células/ml. Em comparação às células do tipo silvestre derivadas de CHO-K1 expressando IGF-1 é um aumento de 3-6 vezes em números de célula viável (veja figura 11). Células de IGF1RKO derivadas de CHO-DUXB11 expressando hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A/4 estavam crescendo até uma densidade de célula máxima de $1,5-2 \times 10^7$ células/ml que é mais alto que densidade de célula máxima comparada ao linhagem celular derivada de CHO-DUXB11 tipo silvestre.

[0272] As células de IGF1R KO derivadas de CHO-DUXB11 expressando hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A foram únicas células classificadas e título de batelada em 24 cavidades bem como em culturas de vatelada de 50 ml determinado. Na figura 15 o título de 24 cavidades dos 30 melhores clones de hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A em clones de IGF-1R KO derivados de CHO-DUXB11 bem como dos 30 melhores domínios de Fc de hIGF-1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, que 77 expressando clones derivados de CHO-DUXB11 tipo silvestre são mostrados; na figura 16 o título de frasco de agitação dos 15 melhores clones de cada grupo são mostrados. Em geral os clones de IGF-1R KO derivados de célula de CHO-DUXB11 têm um título de 24 cavidades 8 vezes maior e um título de frasco de agitação 7 vezes maior.

Exemplo 55: Cultivo de células de CHO transformadas expressando IGF-1 em biorreator.

[0273] Para cultivo de células transformadas expressando IGF-1 em biorreator um processo de batelada alimentada foi aplicado. Os eventos de processo tal como início da alimentação e troca de temperatura foram cronometrados para suportar crescimento celular e estender a fase de produção mantendo-se viabilidade (Niraj Kumar, Patrick Gammell, Martin Clynes (2007) Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture;

Cytotechnology (2007) 53:33–46).

Exemplo 56: Colheita de IGF-1 a partir de células de CHO.

[0274] Como procedimento de colheita uma técnica de separação de célula padrão com filtração em profundidade seguido por filtração estéril foram aplicadas. As células de CHO foram cultivadas e colhidas de acordo com métodos padrões conhecidos à pessoa versada na técnica (por exemplo Curr. Protoc. Protein Sci. 2001 May;Chapter 5: Unidade 5.10. Produção de proteínas recombinantes em células de mamífero. Chen S, D Gray, Ma J, Subramanian S; (Mahesh Prashada, Klaus Tarrach (2006) Depth filtration: Cell clarification of bioreactor offloads, Filtration & Separation Volume 43, Issue 7, September 2006, Pages 28–30).

Exemplo 57: Projeto/produção e uso de ZFNs que são específicos para exon 3 de IGF-1R:

[0275] Exon 3 de IGF-1R e os íntrons de flaqueamento foram sequenciados em nossa linhagem celular de CHO (SEQ ID NO.: 110/111). Primeiro, exon 3 foi sequenciado usando um DNA de *hamster* contíguo revestindo uma parte de cDNA de IGF-1R que compreende exon 3, bem como a sequência de camundongo do gene de IGF-1R. Iniciadores de PCR foram designados em partes conservadas e produtos de PCR resultantes foram sequenciados. A sequência de exon 3 obtida foi determinada em em Sigma para sequenciar os íntrons de flaqueamento de exon 3 bem como projetar dois ZFNs criados alvejando IGF-1R exon 3. Cada ZFN á alvejado e ligado a 18 nucleotídeos no reverso (no 5 ') respectivamente o filamento de DNA dianteiro (no 3'). Os dois sítios de ligação são separados pelos cinco nucleotídeos do sítio de corte (SEQ ID NO.: 107). Uma descrição de produto e métodos está disponível em Sigma em um documento chamado '74188 CompoZr Custom ZFN Tech Bulletin'. Sigma da mesma forma designou os iniciadores de PCR dianteiros e reversos nas

sequências de íntron circundantes (SEQ ID NO.: 108 e 109) para ampliar IGF-1R exon 3 no gDNA, dando origem a um produto de PCR de 501bp. Sigma forneceu o *kit* CompoZr™ ((Custom Zinc Finger Nucleases, número de produto CSTZFN-1KT, número do lote 08021019MN) compreendendo 20-25µg de dois vetores de DNA, codificando para o reverso (pZFN1) respectivamente o dianteiro (pZFN2) ZFN criado de reconhecimento de filamento.

[0276] E.Coli foi transformado de acordo com protocolos de transformação bem conhecidos com qualquer vetor e disperso em 25µg/ml de canamicina contendo placas de agarose. Para cada vetor, 4 colônias bacterianas foram escolhidas e expandidas. As sequências de ZFN das quatro amostras de plasmídeo de DNA purificado de cada pZFN foram validadas usando iniciador de T7 e iniciadores reversos de BHG e misturados. 6µg ou 10µg de uma mistura homogênea de vetores pZFN1 e pZFN2 circulares foram transfectados em célula derivada de CHO-K1 e células parentais derivadas de CHO-DUXB11, três vezes para cada quantidade, tal que seis misturas foram geradas (mais controle de negativo de transfecção) com cada linhagem celular. Para medir a eficiência de clivagem de ZFNs nas piscinas, o ensaio de Detecção de Mutação Surveyor (Transgenomics, catálogo 706025) foi usado em dias 3 e 10 depois da transfecção (contado como dia zero), como descrito em um protocolo confidencial fornecido por Sigma. O DNA genômico das misturas foi isolado usando o *kit* GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma, catálogo G1N70-1KT), o exon 3 ampliado em uma reação de PCR usando os iniciadores de sequenciamento dianteiros e reversos de IGF-1R situado nas sequência de íntron de flanqueamento. O produto de PCR foi em seguida desnaturado sob altas temperaturas. Quando a temperatura foi gradualmente diminuída, algum produto tipo silvestre e mutado hibridizam para formar DNA de filamento duplo com desequilíbrios ao

redor do sítio de clivagem, que foi clivado por uma enzima chamada Surveyor®. Os produtos finais foram analisados usando um sistema de eletroforese em gel chamado lab901. Para todas as 6 misturas transfectadas, adicional ao produto de PCR combinado perfeito de 501bp, duas faixas menores de aproximadamente 277bp e 224bp foram detectadas, correspondendo aos fragmentos em qualquer lado do sítio de corte, desse modo atestando a atividade de ZFN em nossas células. Sete dias depois da transfecção, as misturas foram célula única clonada em placas de 10 x 96 cavidades.

[0277] Na linhagem celular derivada de pZFN transfectada por CHO-K1, 507 clones foram cultivados em placas de 96 cavidades e foram avaliados para mutações usando o ensaio de Detecção de Mutação Surveyor descrito acima (DNA genômico de clones é extraído em placas de 96 cavidades usando *kit* de PCR Extract-N-Amp Blood de Sigma, catálogo XNAB2). 42 clones foram positivos (duas faixas menores detectadas), significando seu genoma contém pelo menos uma cópia mutada de exon 3, e seu exon 3 de IGF-1R de ampliado PCR é sequenciado. Como esperado para clones gerados de uma linhagem celular derivada de CHO-K1 pseudo-diplóide, os cromatogramas de sequenciamento de DNA mostraram no máximo dois sinais de sobreposição de mesma intensidade, indicando duas cópias da sequência alvo. 6 clones tiveram mutações em ambas as cópias, entre as quais 3 clones tiveram mutações ativando códons de parada próximos em ambas as cópias (SEQ ID NO.: 99 e 100) ou códons de parada próximos em uma cópia e uma deleção grande na outra (SEQ ID NO.: 101). As sequências das duas cópias naqueles 3 clones foram confirmadas por clonagem de TOPO (kit de clonagem de TA, Invitrogen, cat. K4575-40; 6 colônias bacterianas escolhidas). Todos os 3 clones K.O. foram cultivados em densidades de célula significativamente mais altas do que as células parentais, e quando IGF-1 (hIGF-1Ea de '3mut '

(SEQ ID NO.: 27) foi reforçado a 50mg/L em meio padrão, foram cultivados em densidades similares aquelas células parentais em meio padrão (figura 8). O clone com o genótipo $\Delta 5$ / $\Delta 22$ (SEQ ID NO.: 100/102) foi selecionado para transfecção com a proteína de fator de crescimento 1 semelhante a insulina, por exemplo o IGF-1 humano (SEQ ID NO.: 1 ou 5) ou uma variante do mesmo (por exemplo SEQ ID NOs.: 8-14).

[0278] Na linhagem celular derivada por CHO-DUXB11 transfectada por pZFN, apenas 117 clones foram cultivados em placas de 96 cavidades e foram avaliados para mutações com ensaio Surveyor. 28 clones tiveram pelo menos uma cópia mutada de exon 3 (duas faixas menores detectadas), porém sequenciamento indicou que todos esses clones ainda tiveram cópias tipo silvestre; a sequência tipo silvestre teve uma intensidade mais alta em cromatogramas de sequenciamento do que a sequência mutada. A linhagem celular derivada de CHO-DUXB11 é mutagenizada e policlonal; cariótipos mostram até oito cópias de um cromossomo em algumas células, fazendo a estimativa do número de cópia esperado de um gene difícil. Dois clones em que a sequência mutada detectada ($\Delta 22$ ou $\Delta 16$) ativou códons de parada próximos, foram selecionados para um segundo círculo de transfecção com pZFNs; 3 misturas por clones originais foram geradas usando 10 μ g de pZFNs misturado. Sete dias depois da transfecção, as misturas foram clonadas por FACS em placas de 6 x 96 cavidades. 379 clones foram cultivados, dos quais 211 foram sequenciados para exon3 de IGF-1R (nenhum ensaio Surveyor possível mais como já uma sequência mutada) e sequências de sobreposição visualmente analisadas em cromatogramas. A maioria dos clones sequenciados foram heterozigotos com o tipo silvestre e sequência mutada esperado ($\Delta 22$ ou $\Delta 16$); ~20% dos clones tiveram um tipo silvestre e 2 sequências mutadas (principalmente com deleções ao redor do sítio de corte); em

dois clones 4 sequências diferentes foram detectadas (confirmadas com clonagem de TOPO, porém uma da sequência foi tipo silvestre ou apenas uma inserção de nucleotídeo); 2 clones foram clones K.O., ambos com 2 sequências detectadas ($\Delta 16 / \Delta 22$ e $\Delta 16 / \Delta 5$), porém seu crescimento na presença de IGF-1 foi muito pequena melhor do que em linhagem celular derivada de CHO-DUXB11 parental. Desse modo três clones, com o genótipo $\Delta 22 / \Delta 7$ /tipo silvestre, $\Delta 16 / \Delta 7$ /tipo silvestre e $\Delta 16 / \Delta 22$ /tipo silvestre, foram selecionados para um terceiro círculo de transfecção com pZFNs (suas sequências são confirmadas por clonagem de TOPO, com 32 colônias bacterianas reforçadas e sequenciadas por clone). Cada um dos três clones foi transfectado 2 vezes com 8 μ g pZFNs. Uma vez que duas misturas de cada clone recuperado (viabilidade >91%, depois de 7-9 dias), eles foram misturados e co-cultivados cerca de 6-8 semanas na presença de 50mg/l IGF-1 (para selecionar as células mais resistentes). Dois dias antes da clonagem de FACS eles foram divididos sem IGF-1 (para permitir ligação de IGF-1-Cy5 e selecionar os 5% de células menos fluorescentes). As três misturas foram clonadas por FACS em um total de placas de 9 x 96 cavidades.

[0279] Um iniciador de PCR ligando a sequência de sítio de corte tipo silvestre em exon 3 de IGF-1R foi designado, permitindo uma avaliação eficiente de clones mutados. O PCR foi realizado juntamente com o iniciador de sequenciamento dianteiro para IGF-1R; assumindo que o PCR sempre funciona, se um clone fosse PCR negativo, não houve sequência tipo silvestre, ou o clone não cresceu bem (DNA muito pequeno extraiu tão poucas células cultivadas). A partir dos 389 clones cultivados tal avaliado, 58 eram negativos e sequenciados. Em 30 daqueles clones a sequência tipo silvestre não foi detectada, e para 22 clones mutações são trocas de estrutura (13 clones com as duas sequências $\Delta 22 / \Delta 7$, do clone $\Delta 22 / \Delta 7$ /tipo silvestre). Seu crescimento

com e sem 50mg/l de IGF-1 foi avaliado, e o melhor clone crescente com IGF-1 (da mesma forma entre o melhor clone crescente sem IGF-1), com as sequências $\Delta 22$ / $\Delta 7$ (verificou por clonagem de TOPO), foi selecionado para transfecção com construtores de DNA codificando as proteínas de SEQ IDs No.: 8-14.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que compreende uma proteína IGF-1 humana, em que o aminoácido glicina na posição 42 da referida proteína IGF-1 é mutado para serina, e em que a numeração dos aminoácidos da referida proteína IGF-1 humana corresponde a SEQ ID NO: 1.

2. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a proteína IGF-1 humana compreende as seguintes modificações:

- a. o aminoácido E3 é deletado,
- b. o aminoácido G42 é mutado para serina, e
- c. o aminoácido R37 é mutado para alanina.

3. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a proteína IGF-1 humana compreende as seguintes modificações:

- a. os aminoácidos G1, P2 e E3 são deletados,
- b. o aminoácido G42 é mutado para serina, e
- c. o aminoácido R37 é mutado para alanina.

4. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a proteína IGF-1 humana compreende as seguintes modificações:

- a. os aminoácidos G1, P2 e E3 são deletados,
- b. o aminoácido G42 é mutado para serina,
- c. o aminoácido R36 é mutado para glutamina, e
- d. o aminoácido R37 é mutado para alanina.

5. Proteína IGF-1 humana, caracterizada pelo fato de que o aminoácido glicina na posição 42 é substituído pelo aminoácido serina, e em que o(s) aminoácido(s):

(a) G1, P2, E3 são deletados e o aminoácido R36 é substituído ou deletado; ou

(b) G1, P2, E3 são deletados e o aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q); ou

(c) G1, P2, E3 são deletados e o aminoácido R37 é substituído ou deletado; ou

(d) G1, P2, E3 são deletados e o aminoácido R37 é substituído por ácido glutâmico (E); ou

(e) G1, P2, E3 são deletados e o aminoácido R37 é substituído por alanina; ou

(f) G1, P2, E3 são deletados e o aminoácido R37 é substituído por prolina (P); ou

(g) G1, P2, E3 são eliminados e os aminoácidos R36 e R37 são substituídos ou deletados; ou

(h) G1, P2, E3 são deletados e os aminoácidos R36 e R37 são ambos substituídos por glutamina (Q); ou

(i) G1, P2, E3 são deletados e o aminoácido R36 é substituído por glutamina (Q) e R37 é substituído por alanina.

6. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que compreende uma molécula de ácido nucléico de qualquer uma das SEQ ID NOs: 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 21.

7. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o polipeptídeo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, para uso em terapia.

8. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que é para o tratamento de um distúrbio muscular em um paciente em necessidade do mesmo.

9. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que o distúrbio muscular é atrofia muscular.

10. Uso de um polipeptídeo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que é para

preparação de uma composição para tratar um distúrbio muscular.

11. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o distúrbio muscular é atrofia muscular.

K_D (nM)	hIGF1-Ea-Fc_mut_13/2_A	hIGF-1
IGF-1R	373	204

FIG. 1

A

Ligante	EC ₅₀ nM ± SEM
hIGF-1	1.8 ± 0.1
hIGF1-Ea-Fc_mut_02	2.7*
hIGF1-Ea-Fc_mut_03	9.8**
hIGF1-Ea-Fc_mut_04	3.04*
hIGF1-Ea-Fc_mut_12	3.81*
hIGF1-Ea-Fc_mut_13	4.17*
hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, R77Q-Fc	5.26 ± 0.7#

*n=2; **n=1; #P<0.0001 versus hIGF-1, teste t

B

Ligante	EC ₅₀ nM ± SEM
hIGF-1	1.8 ± 0.1
hIGF1-Ea-Fc_mut_04/2_E	7.4 ± 1.3#
hIGF1-Ea-Fc_mut_04_E	5.5*
hIGF1-Ea-Fc_mut_13/2_A	5.7*
hIGF1-Ea-Fc_mut_13_A	4.1*

*n=2; #P<0.0001 versus hIGF-1, teste t

C

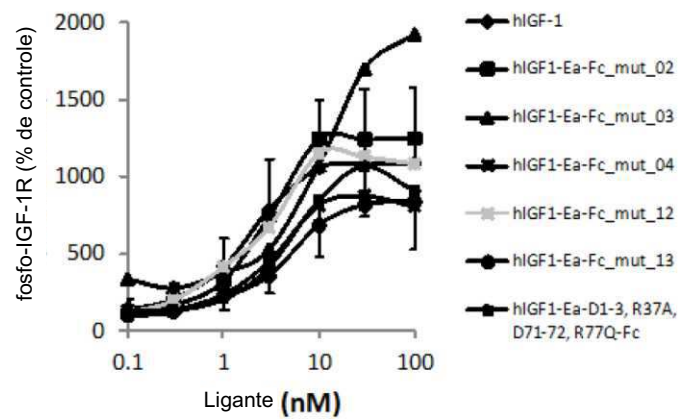


FIG. 2

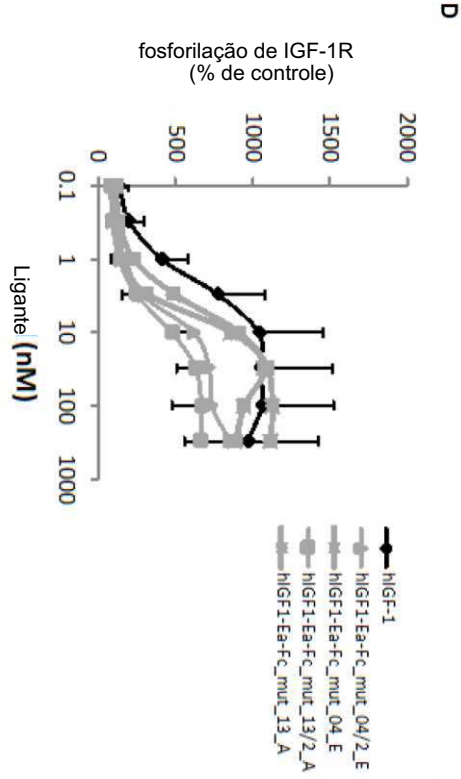


FIG. 2 (continuação)

A

Ligante	Aumento de vezes máxima médio versus controle $\pm$ SD
Insulina	20.8 $\pm$ 6.1
hIGF-1	3.9 $\pm$ 0.8 [#]
hIGF1-Ea-Fc_mut_02	5.9 $\pm$ 1.1 ^{#:\$}
hIGF1-Ea-Fc_mut_03	8.6 [*]
hIGF1-Ea-Fc_mut_04	12.5 [*]
hIGF1-Ea-Fc_mut_12	21.9 [*]
hIGF1-Ea-Fc_mut_13	15.2 [*]
hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, R77Q- Fc	18.8 $\pm$ 3.4

*n=2; [#]P<0.001 versus Insulina; ^{\$}P<0.05 versus IGF-1

B

Ligante	Aumento de vezes máxima médio versus controle $\pm$ SD
Insulina	20.8 $\pm$ 6.1
hIGF-1	3.9 $\pm$ 0.8 [#]
hIGF1-Ea-Fc_mut_04/2_E	5.2 [*]
hIGF1-Ea-Fc_mut_04_E	9.4 [*]
hIGF1-Ea-Fc_mut_13/2_A	5.4 [*]
hIGF1-Ea-Fc_mut_13_A	12.4 [*]

*n=2; ; [#]P<0.001 versus Insulina

FIG. 3

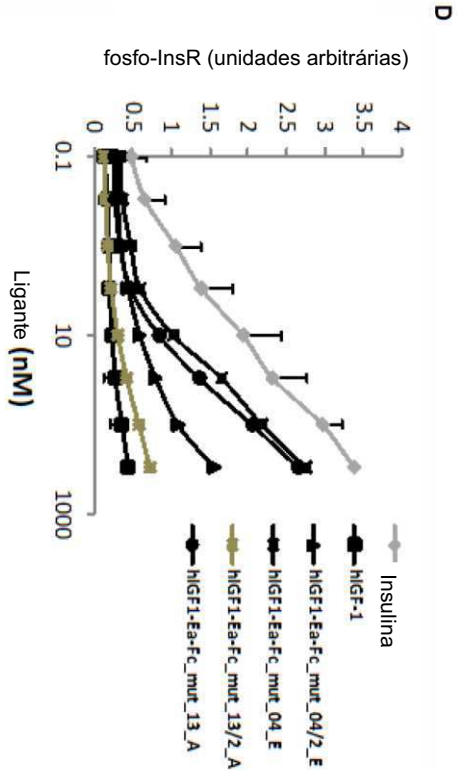
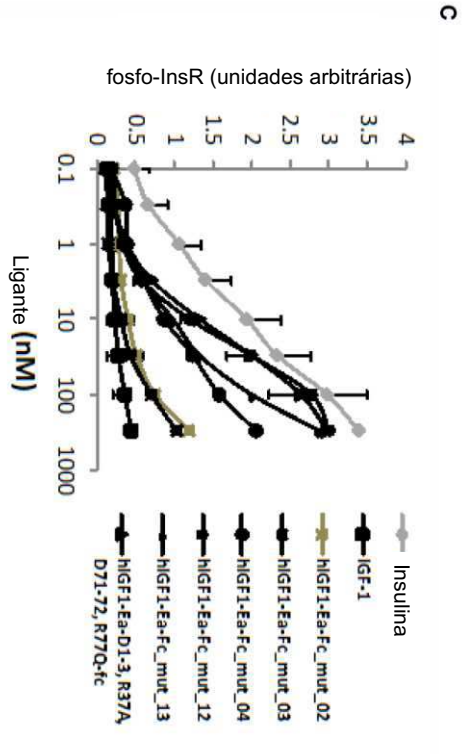


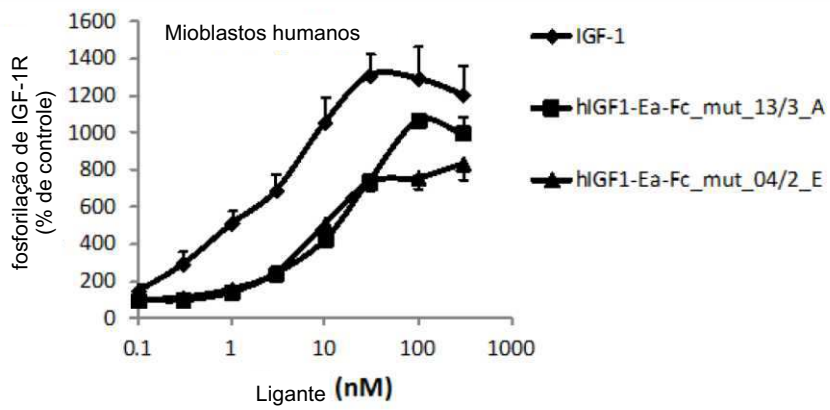
FIG. 3. (continuação)

A

Peptide	Mioblastos humanos		Mioblastos de cinomolgos	
	EC ₅₀ (nM) ± SEM	E _{max} (% de controle) ± SEM	EC ₅₀ (nM) ± SEM	E _{max} (% de controle) ± SEM
hIGF-1	4.1 ± 1.4	1309 ± 119	5.1 ± 0.7	786 ± 182
hIGF1-Ea-Fc_mut_13/2_A	16.8 ± 3.1*	1069 ± 28	25.4 ± 4.0#	779 ± 145
hIGF1-Ea-Fc_mut_04/2_E	10.6 ± 2.4	834 ± 83*	23.8 ± 2.0#	724 ± 152

*P<0,05 vs mioblastos humanos tratados com hIGF-1. #P< 0,05 vs mioblastos de cinomolgos tratados com hIGF-1. ANOVA, teste de Turkey

B



C

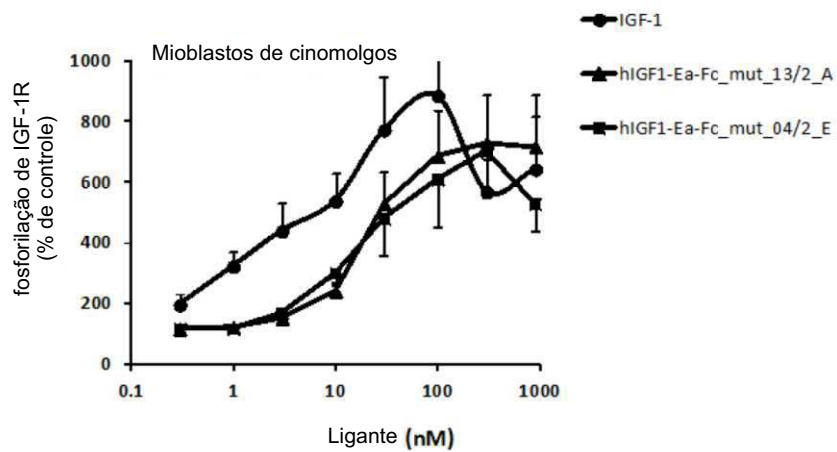


FIG. 4

7/22

A

Ligante	EC50 (nM) $\pm$ SD	vezes de aumento máxima de controle $\pm$ SD
Insulina	11.5 $\pm$ 5.6**	1.37 $\pm$ 0.08
hIGF-1	1.3 $\pm$ 0.9	1.32 $\pm$ 0.06
hIGF1-Ea Fc_mut_13/2_A	4.3 $\pm$ 2.0	1.31 $\pm$ 0.11
hIGF1-Ea Fc_mut_04/2_E	3.7 $\pm$ 1.1	1.37 $\pm$ 0.10

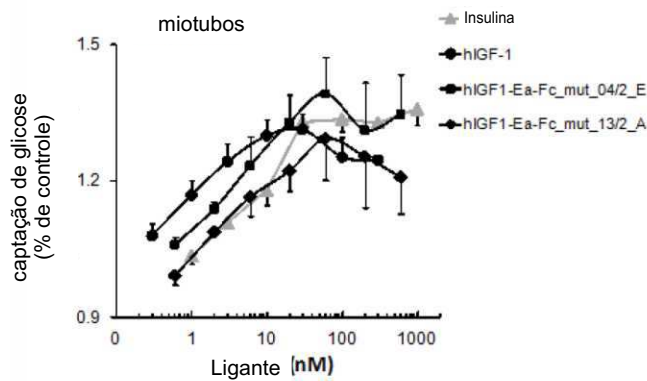
**P < 0.001 versus IGF-1, ANOVA, Teste de Turkey

B

Ligante	EC50 (nM) $\pm$ SD	vezes de aumento máxima de controle $\pm$ SD
Insulina	9.1 $\pm$ 3.7	5.2 $\pm$ 1.00
hIGF-1	5.0 $\pm$ 1.4	4.6 $\pm$ 0.68
hIGF1-Ea Fc_mut_13/2_A	49.9 $\pm$ 4.6**,***	3.2 $\pm$ 0.25#
hIGF1-Ea Fc_mut_04/2_E	49.0 $\pm$ 28.4**,***	4.0 $\pm$ 0.47

P < 0.05 and **P < 0.01 versus Insulina; ***P < 0.001 versus IGF-1 ANOVA, Teste de Turkey

C



D

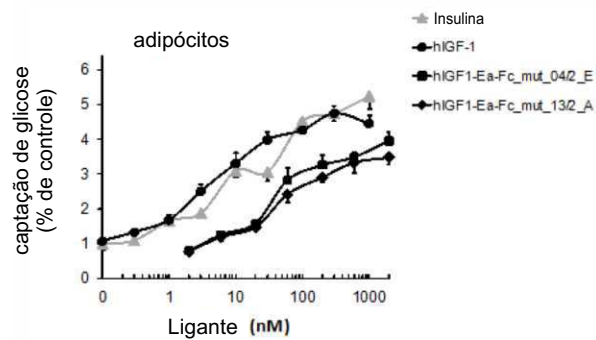


FIG. 5

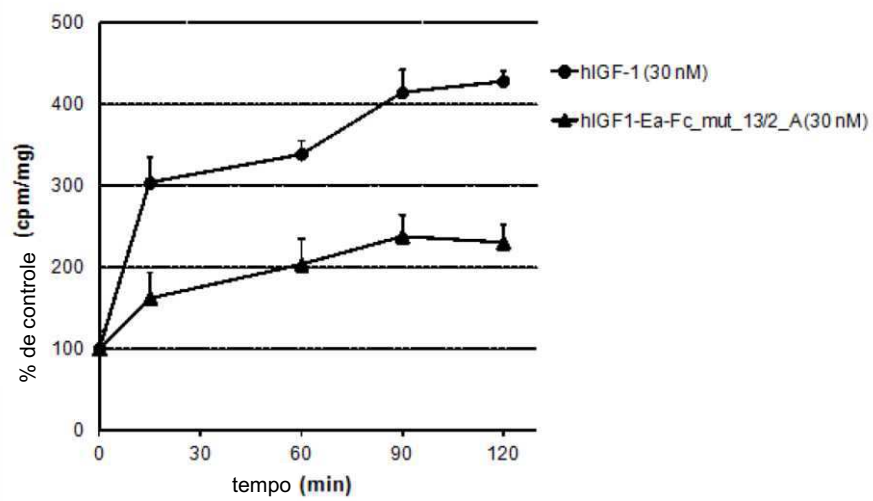


FIG. 6

9/22

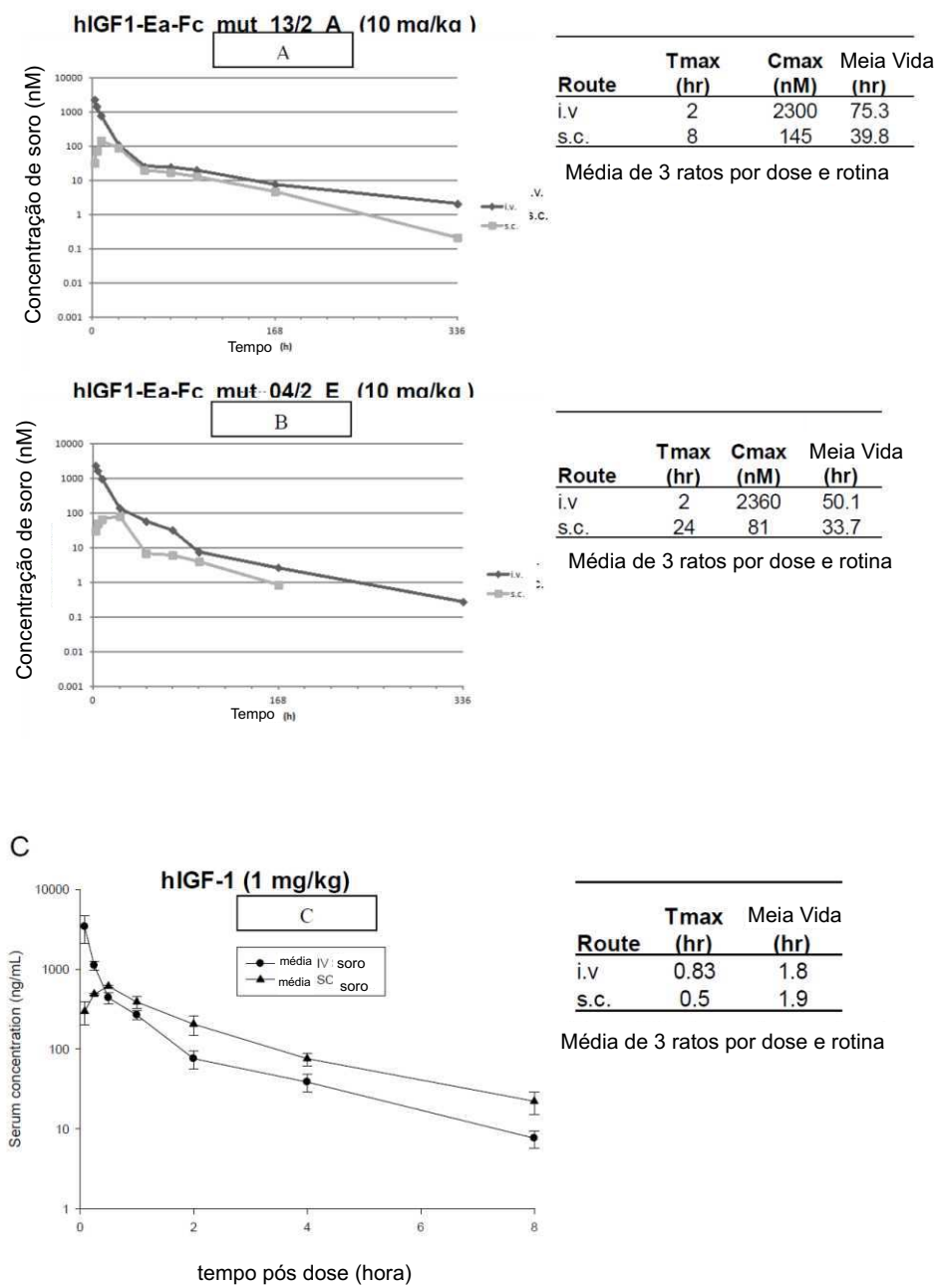


FIG. 7

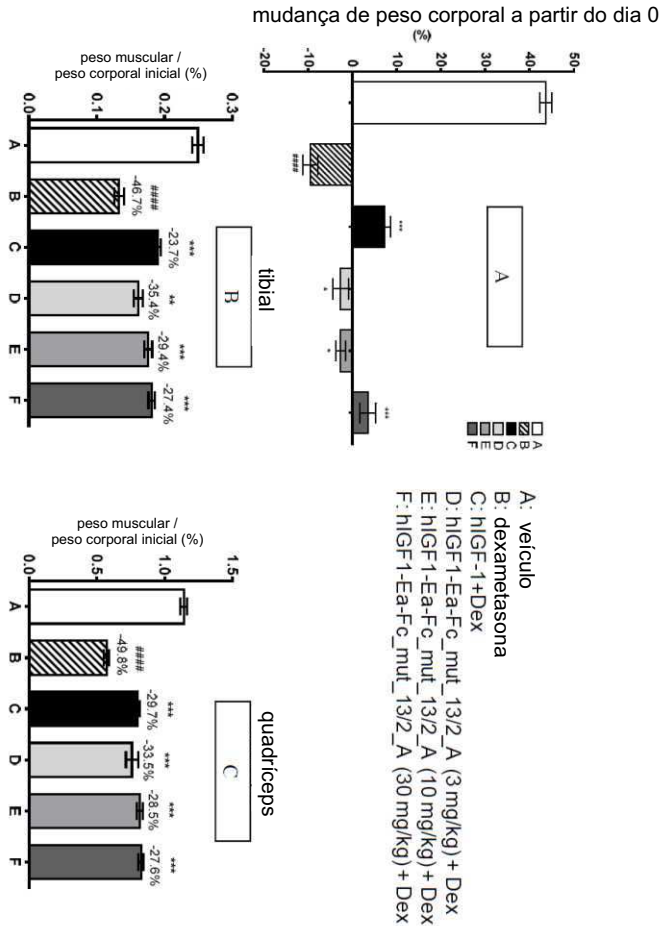


FIG. 8

Nome	Título em sobrenadante (mg/l)	concentração (mg/ml)	Agregados : (%)
hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q · domínio de fc(SEQ ID NO.:78)	33	0.88	37.0
hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A: SEQ ID NO.: 9	83.1	1.65	9.8
hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42A, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q · domínio de fc(SEQ ID NO.: 79)	11.79	0.49	37.4
hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42Q, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q · domínio de fc (SEQ ID NO.:80)	16.98	0.61	43.2
hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42P, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q · domínio de fc(SEQ ID NO.: 81)	18.57	0.54	71.9
hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42K, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q · domínio de fc(SEQ ID NO.:82)	21.6	0.56	53.8
hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42E, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q · domínio de fc(SEQ ID NO.: 83)	26.97	0.84	49.4
hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42I, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q · domínio de fc(SEQ ID NO.: 84)	8.7	0.4	85.5
hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42Y, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q · domínio de fc(SEQ ID NO.: 85)	13.38	0.41	48.5
hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, D42, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q · domínio de fc(SEQ ID NO.: 86)	78.6	1.96	21.0

D: deleção; domíno de Fc: porção de Fc de hlgG1

FIG. 9

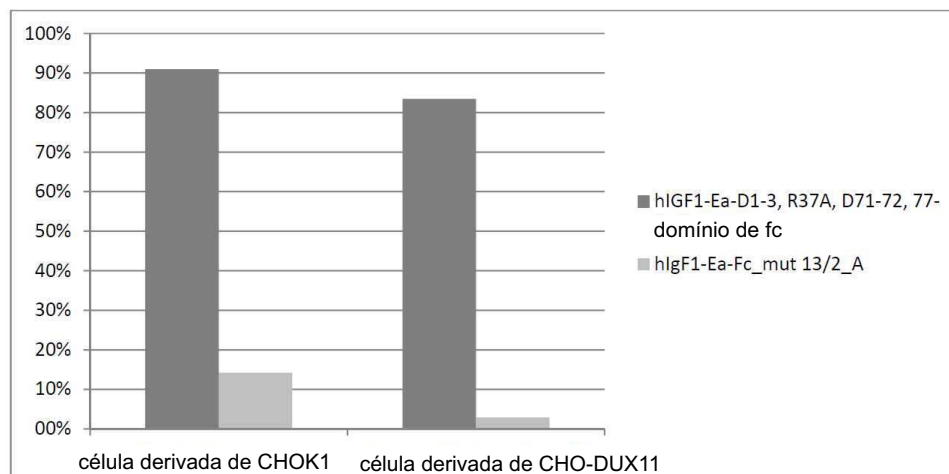
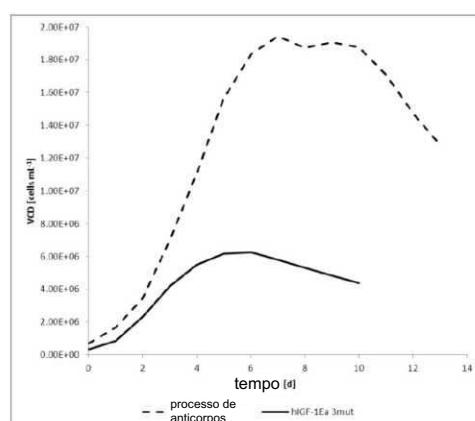


FIG. 10

A)



B)

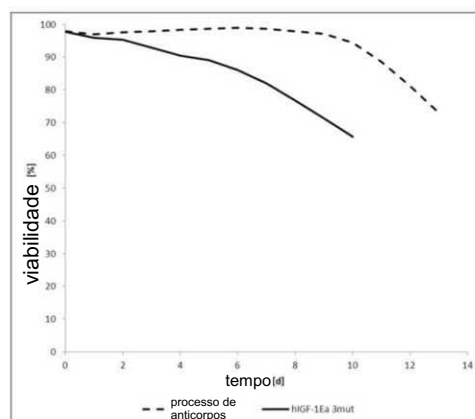


FIG. 11

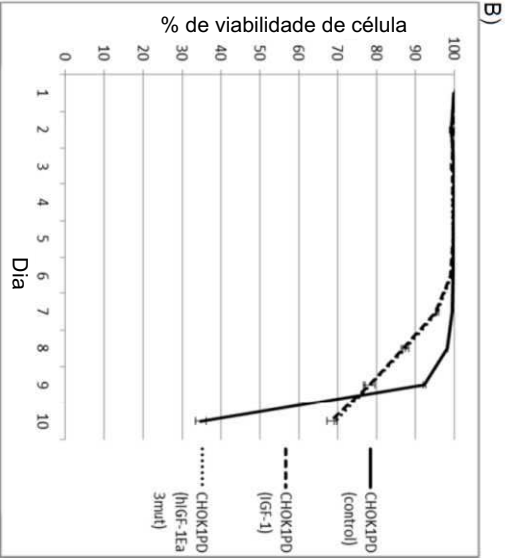
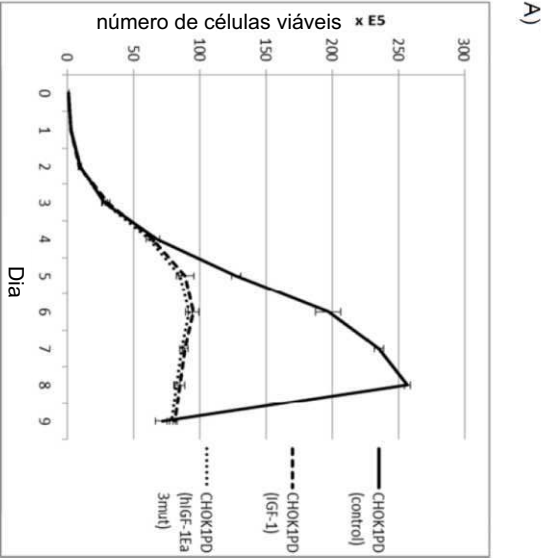


FIG. 12

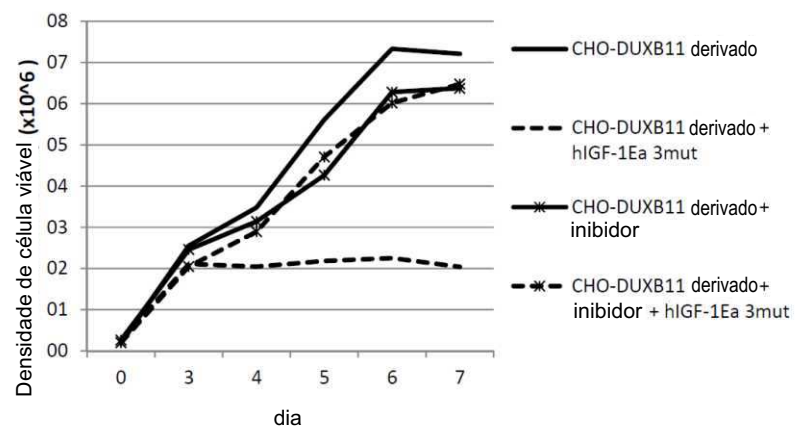


FIG. 13

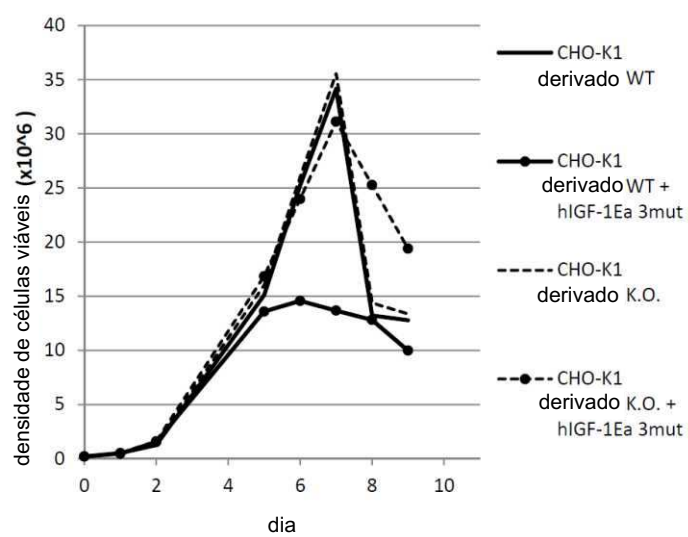


FIG. 14

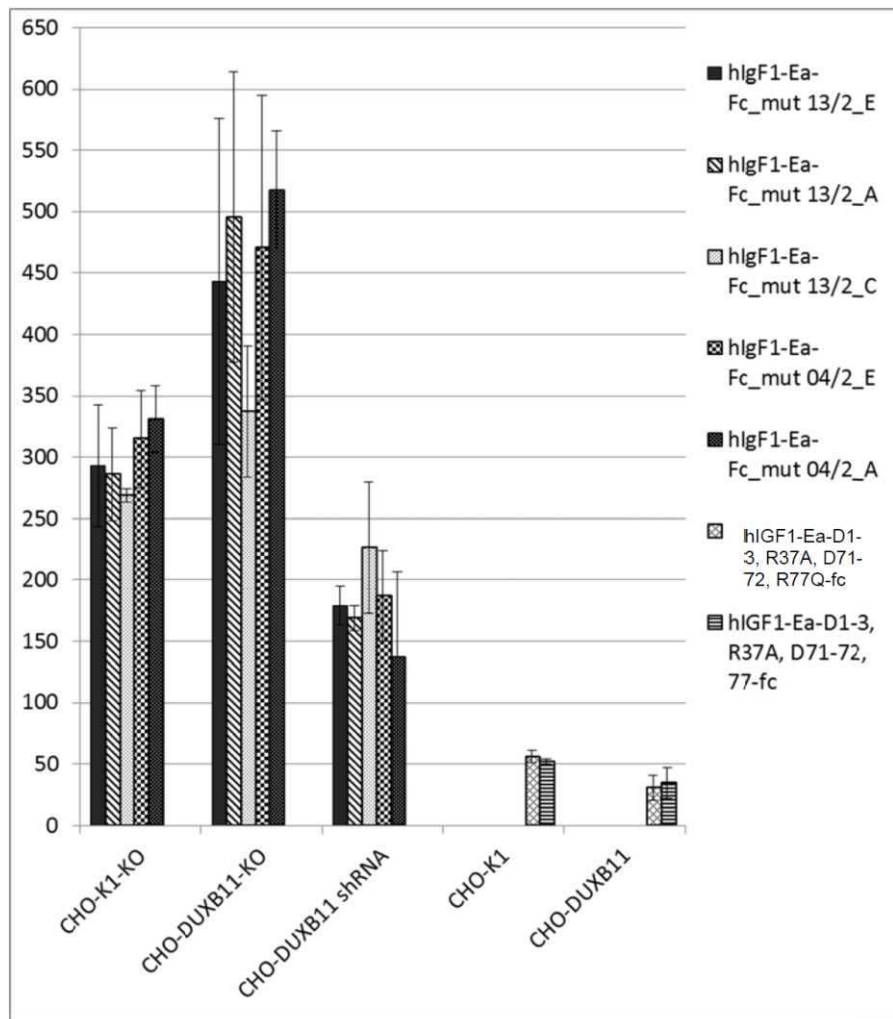


FIG. 15

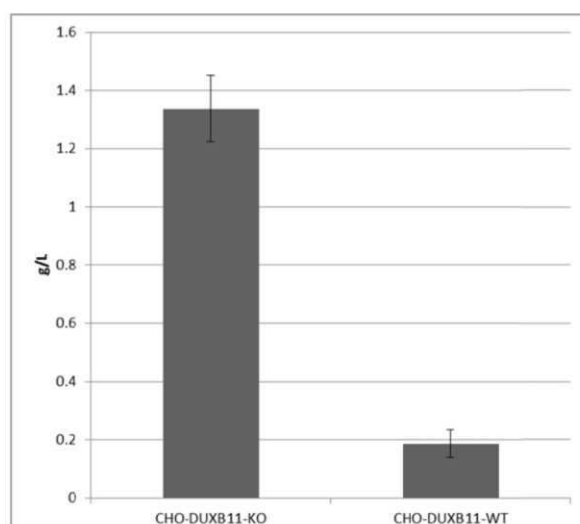


FIG. 16

nome genérico	aminoácido na posição 42	produção mg/L	% de agregação	% de proteína de tamanho natural depois do desafio (células derivadas de CHOK1)	% de proteína de tamanho natural depois do desafio (células derivadas de CHO-DUXB11)
hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72, R74Q, R77Q, R104Q-fc (SEQ ID No. 113) (batch 1)	glicina	11.33	18.3	21.6% ± 13.4% (n=4)	27.06%
hIGF1-Ea-hFc_mut02 (SEQ ID No.: 29)	serina	13.64	5.8	9.6% ± 13.9% (n=3)	N/A
hIGF1-Ea-hFc_mut03 (SEQ ID No.: 114)	glicina	5.17	41.8	44.9% ± 12.1% (n=3)	N/A
hIGF1-Ea-hFc_mut04 (SEQ ID No.: 30)	glicina	10.34	21.1	60.2% ± 12.2% (n=4)	73.6 %
hIGF1-Ea-hFc_mut12 (SEQ ID No.: 116)	glicina	8.46	17.7	44.3% ± 15.1% (n=3)	67.9%
hIGF1-Ea-hFc_mut13 (SEQ ID No.: 31)	glicina	10.18	24.0	64.2% ± 11.5% (n=4)	80.0%
hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E (SEQ ID No.: 08)	serina	11.62	7.4	95.4% ± 4.4% (n=3)	97.3%± 3.4% (n=2)
hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A (SEQ ID No.: 09)	serina	11.72	8.6	93.4%	95.3%
hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E (SEQ ID No.: 12)	serina	11.51	7.3	95.0% ± 4.6% (n=3)	98.7%± 1.9% (n=2)

FIG. 17

ligante	vezes de aumento máxima média vs controle $\pm$ SD
Insulina	21.0 $\pm$ 6.9
IGF-1	3.7 $\pm$ 0.8
IGF-1 G42S	3.3 $\pm$ 1.1
hIGF1-Ea-mut 03	5.6 $\pm$ 2.0
hIGF1-Ea-mut 03-G42S	2.2 $\pm$ 0.5*

* $P < 0.05$ versus BVS855

FIG. 18

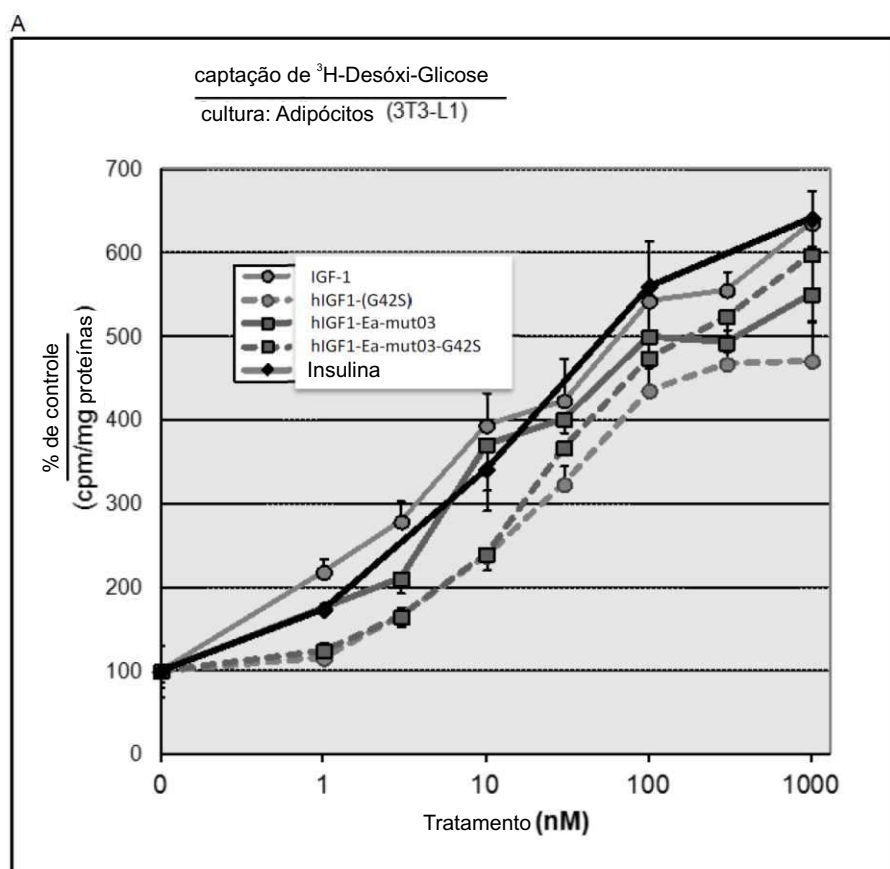


FIG. 19

B

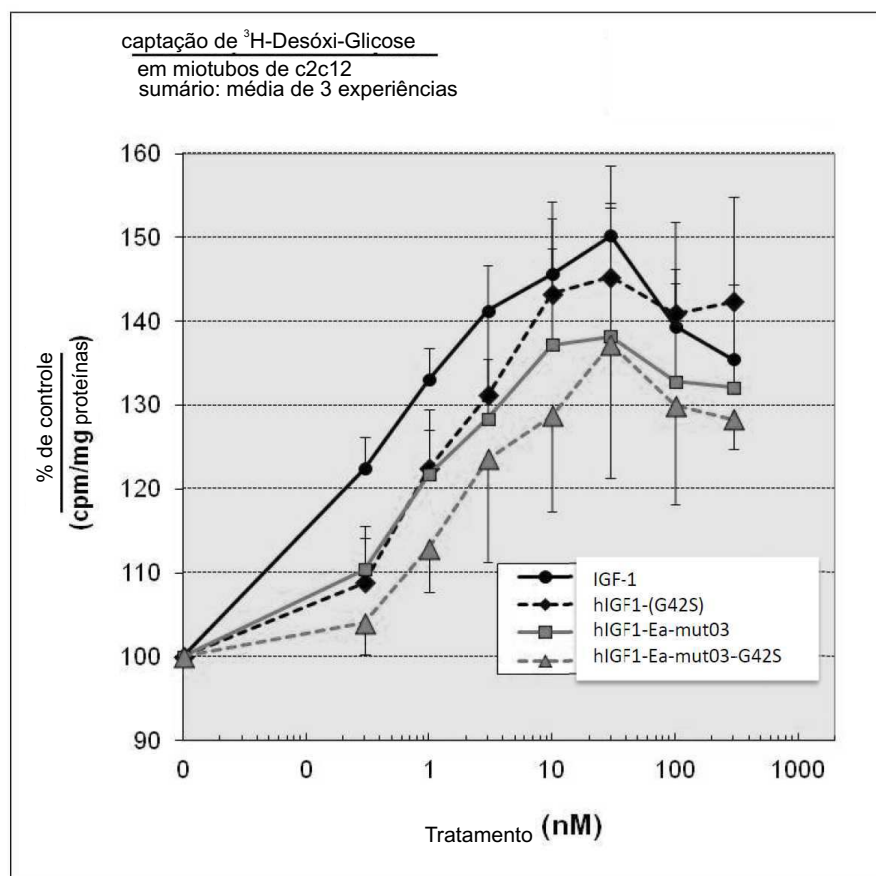


FIG. 19 (continuação)