



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 278 020**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/65 (2006.01)
C30B 29/58 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02724908 .5**

(86) Fecha de presentación : **01.02.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1358209**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **05.11.2003**

(54) Título: **Cristalización de IGF-1.**

(30) Prioridad: **09.02.2001 US 267977 P**
27.04.2001 US 287072 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2007

(73) Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

(72) Inventor/es: **Schaffer, Michelle;**
Ultsch, Mark y
Vajdos, Felix

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

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

DESCRIPCIÓN

Cristalización de IGF-1.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

Esta invención está dirigida a una forma cristalina del factor de crecimiento similar a insulina de tipo 1 (IGF-1) humano y, más particularmente, a un cristal del IGF-1 humano, a un método de cristalización del mismo y a su estructura obtenida mediante difracción de rayos X. Además, la invención se refiere a métodos para identificar nuevas moléculas agonistas del IGF-1 basadas en datos biofísicos y bioquímicos que sugieren que una única molécula de detergente que entra en contacto con residuos que se sabe que son importantes para las interacciones con la proteína de unión a IGF-1 (IGFBP), se une específicamente a IGF-1 y bloquea la unión de IGFBP-1 e IGFBP-3.

Descripción de descripciones relacionadas

Existe gran cantidad de literatura sobre las acciones y actividades de los IGFs (IGF-1, IGF-2 y las variantes del IGF). El IGF-1 humano es una proteína sérica de 70 aminoácidos y 7649 daltons con un pI de 8,4 (Rinderknecht y Humbel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 2365 (1976); Rinderknecht y Humbel, *J. Biol. Chem.*, **253**: 2769 (1978)) que pertenece a la familia de las somatomedinas con actividades biológicas similares a las de la insulina y mitogénicas que modulan la acción de la hormona de crecimiento (GH) (Van Wyk y col., *Recent Prog. Horm. Res.*, **30**: 259 (1974); Binoux, *Ann. Endocrinol.*, **41**: 157 (1980); Clemmons y Van Wyk, *Handbook Exp. Pharmacol.*, **57**: 161 (1981); Baxter, *Adv. Clin. Chem.*, **25**: 49 (1986); Patente de EE.UU. N° 4.988.675; WO 91/03253; WO 93/23071). Los IGFs comparten un nivel elevado de identidad de secuencias con la insulina, siendo un 49% aproximadamente idénticos a la misma. A diferencia de la insulina, sin embargo, que es sintetizada como una proteína precursora que contiene un segmento de 33 aminoácidos conocido como péptido C (que es escindido para dar lugar a un dímero unido covalentemente de las cadenas A y B restantes), los IGFs son polipéptidos sencillos (ver la Figura 1).

En el embrión en desarrollo, la ausencia de IGF-1 da lugar a un retraso grave del crecimiento que continua después del nacimiento (Baker y col., *Cell*, **75**: 73-82 (1993); Powell-Braxton y col., *Genes & Development*, **7**: 2609-2617 (1993); Liu y col., *Cell*, **75**: 59-72 (1993); Liu y col., *Molecular Endocrinol.*, **12**: 1452-1462 (1998)). Mientras que la mayor parte (más de un 75%) del IGF-1 sérico es producida por el hígado en respuesta a la hormona de crecimiento, se ha demostrado que este IGF-1 derivado del hígado no es necesario para el crecimiento corporal postnatal en ratones (Sjogren y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 7088-7092 (1999)). En su lugar, es el IGF-1 no hepático, producido localmente, que actúa de manera paracrina/autocrina, el que parece ser responsable de la mayor parte de los efectos estimulantes del crecimiento postnatal del IGF-1 (Schlechter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 7932-7934 (1986); Isaksson y col., *Science*, **216**: 1237-1239 (1982)). Consistente con sus efectos estimulantes del crecimiento, el IGF-1 es un potente mitógeno que regula diversas funciones celulares tales como la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la diferenciación celular (Le-Roith, *Endocrinology*, **141**: 1287-1288 (2000)).

Los IGFs han sido implicados en una variedad de funciones celulares y procesos de enfermedad, incluyendo la progresión del ciclo celular, la proliferación, la diferenciación y efectos similares a los de la insulina en la diabetes resistente a insulina. Por tanto, se ha sugerido el IGF como herramienta terapéutica en una variedad de enfermedades y lesiones (para una revisión, ver Lowe, *Scientific American* (Marzo/Abril 1996), p.62). Debido a este rango de actividades, el IGF-1 ha sido ensayado en mamíferos para usos tan ampliamente dispares como cicatrización de heridas, tratamiento de enfermedades renales, tratamiento de la diabetes, reversión de estados catabólicos generales de todo el organismo tales como el desgaste relativo al SIDA, el tratamiento de condiciones cardíacas tales como la insuficiencia cardíaca congestiva y el tratamiento de enfermedades neurológicas (Guler y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 4889-4893 (1988); Schalch y col., *J. Clin. Metab.*, **77**: 1563-1568 (1993); Froesch y col., *Horm. Res.*, **42**: 66-71 (1994); Vlachopapadopoulou y col., *J. Clin. Endo. Metab.*, **12**: 3715-3723 (1995); Saad y col., *Diabetologia*, **37**: Resumen 40 (1994); Schoenle y col., *Diabetologia*, **34**: 675-679 (1991); Morrow y col., *Diabetes*, **42** (Suplemento): 269 (1993) (resumen); Kuzuya y col., *Diabetes*, **42**: 696-705 (1993); Schalch y col., "Short-term metabolic effects of recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF-1) in type II diabetes mellitus", en Spencer, E.M., ed., *Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors* (New York Elsevier: 1991), pp. 705-715; Zenobi y col., *J. Clin. Invest.*, **90**: 2234-2241 (1993); Elahi y col., "Hemodynamic and metabolic responses to human insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in men", en: *Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors*, Spencer, E.M., ed. (Elsevier: New York, 1991) pp. 219-224; Quinn y col., *New Engl. J. Med.*, **323**: 1425-1426 (1990); Schalch y col., "Short-term metabolic effects of recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF-1) in type II diabetes mellitus", en: *Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors*, Spencer, E.M., ed. (Elsevier: New York, 1991), pp. 705-714; Schoenle y col., *Diabetologia*, **34**: 675-679 (1991); Usala y col., *N. Eng. J. Med.*, **327**: 853-857 (1992); Lieberman y col., *J. Clin. Endo. Metab.*, **75**: 30-36 (1992); Zenobi y col., *J. Clin. Invest.*, **90**: 2234-241 (1992); Zenobi y col., *J. Clin. Invest.*, **89**: 1908-1913 (1992); Kerr y col., *J. Clin. Invest.*, **91**: 141-147 (1993); Jabri y col., *Diabetes*, **43**: 369-374 (1994); Duerr y col., *J. Clin. Invest.*, **95**: 619-627 (1995); Bondy, *Ann. Intern. Med.*, **120**: 593-601 (1994); Hammerman y Miller, *Am. J. Physiol.*, **265**: F1-F14 (1993); Hammerman y Miller, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **5**: 1-11 (1994) y Barinaga y col., *Science*, **264**: 772-774 (1994)).

En la literatura de patentes abundan también descripciones de varios usos del IGF-1, o de compuestos que incrementan la concentración activa del IGF-1, para tratar mamíferos, especialmente pacientes humanos, por ejemplo,

las Patentes de EE.UU. N^{os} 5.714.460; 5.273.961; 5.466.670; 5.126.324; 5.187.151; 5.202.119; 5.374.620; 5.106.832; 4.988.675; 5.106.832; 5.068.224; 5.093.317; 5.569.648 y 4.876.242; WO 92/11865; WO 96/01124; WO 91/03253; WO 93/25219; WO 93/08826 y WO 94/16722.

El sistema de IGF está también compuesto por receptores unidos a la membrana para IGF-1, IGF-2 e insulina. El receptor de IGF de tipo 1 (IGF-1R) está estrechamente relacionado con el receptor de la insulina en cuanto a estructura y comparte algunas de sus rutas de señalización (Jones y Clemmons, *Endocr. Rev.*, **16**: 3-34 (1995)). El receptor de IGF-2 es un receptor de aclaramiento que parece no transmitir ninguna señal intracelular (Jones y Clemmons, *supra*). Como IGF-1 e IGF-2 se unen al IGF-1R con una afinidad mucho mayor que al receptor de insulina, es muy probable que la mayor parte de los efectos de IGF-1 e IGF-2 estén mediados por IGF-1R (Humbel, *Eur. J. Biochem.*, **190**: 445-462 (1990); Ballard y col., "Does IGF-1 ever act through the insulin receptor?", en Baxter y col. (Eds.), *The Insulin-Like Growth Factors and Their Regulatory Proteins*, (Amsterdam: Elsevier, 1994), pp. 131-138).

El IGF-1R es un heterotetrámero $\alpha^2\beta^2$ de subunidades α y β unidas por disulfuro. Los dímeros $\alpha\beta$ están se unidos ellos mismos a la superficie celular mediante disulfuro para formar un heterotetrámero covalente. Igual que en el complejo insulina/receptor de insulina, el IGF-1 se une al IGF-1R con una estequiometría de 1:2 (De Meyts, *Diabetologia*, **37**: S135-S148 (1994)), con un sitio de alta afinidad (K_d 0,4 nM aproximadamente) y un sitio de baja afinidad (K_d 6 nM aproximadamente) (Tollefsen y Thompson, *J. Biol. Chem.*, **263**: 16267-16273 (1988)). Se ha determinado la estructura cristalina mediante rayos X de los tres primeros dominios del IGF-1R (Garrett y col., *Nature*, **394**: 395-399 (1998)). Contiene tres dominios distintos (L1, rico en Cys, L2). Las mutaciones que afectan a la unión de IGF-1 están localizadas en la superficie cóncava del receptor.

El IGF-1R es un factor clave en el crecimiento y el desarrollo celular normal (Isaksson y col., *Endocrine Reviews*, **8**: 426-438 (1987); Daughaday y Rotwein, *Endocrine Rev.*, **10**: 68-91 (1989)). Cada vez más pruebas sugieren, sin embargo, que la generación de señales por el IGF-1R desempeña también una función crítica en el crecimiento de células tumorales, en la transformación celular y en la tumorigénesis (Baserga, *Cancer Res.*, **55**: 249-252 (1995)). Ejemplos clave incluyen la pérdida del fenotipo metastásico de células de carcinoma murino por el tratamiento con ARN antisentido para el IGF-1R (Long y col., *Cancer Res.*, **55**: 1006-1009 (1995)) y la inhibición *in vitro* de la motilidad de células de melanoma humano (Stracke y col., *J. Biol. Chem.*, **264**: 21554-21559 (1989)) y del crecimiento de células de cáncer de mama humano por la adición de anticuerpos hacia IGF-1R (Rohlik y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **149**: 276-281 (1987)).

Los IGFs son potentes mitógenos de células de cáncer de mama sobre la base de la observación de que el IGF-1 incrementaba la proliferación de células de cáncer de mama *in vitro* (Cullen y col., *Cancer Res.*, **50**: 48-53 (1990)). Los cánceres de mama expresan IGF-2 e IGF-1R, proporcionando todos los efectores requeridos para un paradigma de proliferación basado en el bucle autocrino (Quinn y col., *J. Biol. Chem.*, **271**: 11477-11483 (1996); Steller y col., *Cancer Res.*, **56**: 1761-1765 (1996)). Como el cáncer de mama es una enfermedad maligna común que afecta aproximadamente a una de cada ocho mujeres y es una causa importante de las muertes por cáncer de las mujeres norteamericanas (LeRoith y col., *Ann. Int. Med.*, **122**: 54-59 (1995)), se requieren nuevas terapias de intervención racionales. El IGF-1 puede suprimir la apoptosis y, por tanto, las células que carecen de IGF-1Rs o que tienen rutas de señalización de IGF-1R comprometidas, pueden dar lugar a células tumorales que mueren selectivamente mediante apoptosis (Long y col., *Cancer Res.*, **55**: 1006-1009 (1995)). Además, se ha probado recientemente que alteraciones en la generación de señales por el IGF en el contexto de otros estados de enfermedad, tales como la diabetes, pueden ser responsables de la exacerbación de las complicaciones de la retinopatía (Smith y col., *Science*, **276**: 1706-1709 (1997)) y nefropatía (Horney y col., *Am. J. Physiol.*, **274**: F1045-F1053 (1998)).

El IGF-1 *in vivo* se encuentra principalmente formando complejos con una familia de al menos seis proteínas séricas conocidas como IGFBPs (Jones y Clemmons, *supra*; Bach y Rechler, *Diabetes Reviews*, **3**: 38-61 (1995)), que modulan el acceso de los IGFs al IGF-1R. regulan también las concentraciones de IGF-1 e IGF-2 en la circulación y a nivel del IGF-1R tisular (Clemmons y col., *Anal. NY Acad. Sci. USA*, **692**: 10-21 (1993)). Las IGFBPs se unen a IGF-1 e IGF-2 con afinidades y especificidades variadas (Jones y Clemmons, *supra*; Bach y Rechler, *supra*). Por ejemplo, IGFBP-3 se una a IGF-1 e IGF-2 con una afinidad similar, mientras que IGFBP-2 e IGFBP-6 se unen a IGF-2 con una afinidad mucho mayor que con la que se unen a IGF-1 (Bach y Rechler, *supra*; Oh y col., *Endocrinology*, **132**: 1337-1344 (1993)). La proteína transportadora principal es IGFBP-3. Actualmente no se sabe nada acerca de la estequiometría de la unión en estos complejos de IGF-1 y sus IGFBPs, debido al tamaño heterogéneo de los complejos causado por la glicosilación.

El IGF-1 existe de forma natural en los fluidos corporales humanos, por ejemplo en la sangre y en el fluido cerebroespinal humano. Aunque el IGF-1 es producido en muchos tejidos, se cree que la mayoría del IGF-1 circulante es sintetizado en el hígado. Se cree que las IGFBPs modulan la actividad biológica del IGF-1 (Jones y Clemmons, *supra*), estando implicada la IGFBP-1 (Lee y col., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **204**: 4-29 (1993)) como la proteína de unión principal involucrada en el metabolismo de la glucosa (Baxter, "Physiological roles of IGF binding proteins", en: Spencer (Ed.), *Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors* (Elsevier: New York, 1991), pp. 371-380). La producción de IGFBP-1 por el hígado está regulada por el estado nutricional, suprimiendo directamente la insulina su producción (Suikkari y col., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **66**: 266-272 (1988)).

Se conoce poco la función *in vivo* de IGFBP-1. Se ha demostrado que la administración de IGFBP-1 humana purificada a ratas produce un incremento agudo, pero pequeño, de la glucosa sanguínea (Lewitt y col., *Endocrinology*,

129: 2254-2256 (1991)). La regulación de IGFBP-1 se conoce algo mejor. Se ha propuesto (Lewitt y Baxter, *Mol. Cell Endocrinology*, 79: 147-152 (1991)) que cuando aumenta la glucosa sanguínea y se secreta insulina, se suprime la IGFBP-1, permitiendo un incremento lento de los niveles de IGF-1 "libre" que podría ayudar a la acción de la insulina sobre el transporte de glucosa. Tal escenario sitúa la función de la IGFBP-1 como un regulador directo de la glucosa sanguínea.

En la mayoría de los casos, la adición de IGFBP exógena suaviza los efectos del IGF-1. Por ejemplo, el efecto estimulante del crecimiento que tiene el estradiol sobre las células de cáncer de mama humano MCF-7 está asociado con un ARNm de la IGFBP-3 disminuido y una acumulación disminuida de la proteína, mientras que el antiestrógeno ICI 182780 produce inhibición del crecimiento y niveles incrementados del ARNm de IGFBP-3 y de la proteína (Huynh y col., *J. Biol. Chem.*, 271: 1016-1021 (1996); Oh y col., *Prog. Growth Factor Res.*, 6: 503-512 (1995)). Se ha descrito también que la inhibición *in vitro* de la proliferación de células de cáncer de mama por el ácido retinoico puede implicar una secreción alterada de IGFBP por las células tumorales o niveles circulantes de IGF-1 disminuidos *in vivo* (LeRoith y col., *Ann. Int. Med.*, 122: 54-59 (1995); Oh y col., *supra*). Opuesto a este hallazgo, el tratamiento de células MCF-7 con el antiestrógeno tamoxifeno disminuye la generación de señales por el IGF-1R de una manera que no está relacionada con la producción disminuida de IGFBP (Lee y col., *J. Endocrinol.*, 152, 39 (1997)). Un apoyo adicional de los efectos antiproliferativos generales de las IGFBPs es el sorprendente hallazgo de que IGFBP-3 es un gen diana del supresor tumoral p53 (Buckbinder y col., *Nature*, 377: 646-649 (1995)). Esto sugiere que la actividad supresora de p53 está mediada, en parte, por la producción de IGFBP-3 y el bloqueo consiguiente de la acción del IGF (Buckbinder y col., *supra*). Estos resultados indican que las IGFBPs pueden bloquear la proliferación celular mediante la modulación de procesos paracrinós/autocrinós regulados por IGF-1/IGF-2. Un corolario para estas observaciones es el hallazgo de que el antígeno específico de la próstata (PSA) es una proteasa de IGFBP-3, la cual, tras su activación, incrementa la sensibilidad de las células tumorales a las acciones de IGF-1/IGF-2 debido a la inactivación proteolítica de la IGFBP-3 (Cohen y col., *J. Endocr.*, 142: 407-415 (1994)). Las IGFBPs forman complejos con IGF-1/IGF-2 e interfieren con el acceso de IGF-1/IGF-2 a los IGF-1Rs (Clemmons y col., *Anal. NY Acad. Sci. USA*, 692: 10-21 (1993)). IGFBP-1, -2 y -3 inhiben el crecimiento celular después de la adición a células *in vitro* (Lee y col., *J. Endocrinol.*, 152, 39 (1997); Feyen y col., *J. Biol. Chem.*, 266: 19469-19474 (1991)). Además, se ha demostrado que IGFBP-1 (McGuire y col., *J. Natl. Cancer Inst.*, 84: 1335-1341 (1992); Figueroa y col., *J. Cell Physiol.*, 157: 229-236 (1993)), IGFBP-3 (Oh y col. (1995), *supra*; Pratt y Pollak, *Biophys. Res. Commun.*, 198: 292-297 (1994)) e IGFBP-2 inhiben todas ellas la proliferación de células de cáncer de mama inducida por IGF-1 o por estrógeno a concentraciones nanomolares *in vitro*. Estos hallazgos apoyan la idea de que las IGFBPs son potentes antagonistas de la acción de IGF. Hay evidencias también de un efecto directo de la IGFBP-3 sobre las células a través de su propio receptor en la superficie celular, independiente de las interacciones con IGF (Oh y col., *J. Biol. Chem.*, 268: 14964-14971 (1993); Valentinis y col., *Mol. Endocrinol.*, 9: 361-367 (1995)). Tomados en conjunto, estos hallazgos subrayan la importancia de IGF e IGF-1R como dianas para uso terapéutico.

Los IGFs tienen influencias mitogénicas y antiapoptóticas sobre células epiteliales de próstata normales y transformadas (Hsing y col., *Cancer Research*, 56: 5146 (1996); Culig y col., *Cancer Research*, 54: 5474 (1994); Cohen y col., *Hormone and Metabolic Research*, 26: 81 (1994); Iwamura y col., *Prostate*, 22: 243 (1993); Cohen y col., *J. Clin. Endocrin. & Metabol.*, 73: 401 (1991); Rajah y col., *J. Biol. Chem.*, 272: 12181 (1997)). La mayor parte del IGF-1 circulante se origina en el hígado, pero la bioactividad del IGF en los tejidos está relacionada no sólo con los niveles de IGFs e IGFBPs circulantes, sino también con la producción local de IGFs, IGFBPs y proteasas de IGFBP (Jones y Clemmons, *Endocrine Reviews*, 16: 3 (1995)). La variabilidad persona a persona de los niveles circulantes de IGF-1 e IGFBP-3 (la principal IGFBP circulante (Jones y Clemmons, *supra*)) es considerable (Juul y col., *J. Clin. Endocrinol. & Metabol.*, 78: 744 (1994); Juul y col., *J. Clin. Endocrinol. & Metabol.*, 80: 2534 (1995)), y la heterogeneidad de los niveles séricos de IGF-1 parece reflejar la heterogeneidad de la bioactividad del IGF tisular. Pueden utilizarse marcadores relativos a los componentes del eje de IGF como marcador de riesgo para el cáncer de próstata, igual que se utiliza de la misma manera el PSA (WO 99/38011).

A diferencia de la mayoría de los demás factores de crecimiento, los IGFs están presentes en la circulación a elevadas concentraciones, pero únicamente una pequeña fracción de los IGFs no está unida a proteínas. Por ejemplo, es conocido de manera general que en humanos o en roedores, menos de un 1% de los IGFs de la sangre está en forma "libre" o no unida (Juul y col., *Clin. Endocrinol.*, 44: 515-523 (1996); Hizuka y col., *Growth Regulation*, 1: 51-55 (1991); Hasegawa y col., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 80: 3284-3286 (1995)). Una abrumadora mayoría de los IGFs de la sangre circula como parte de un complejo ternario asociado no covalentemente compuesto por IGF-1 o IGF-2, IGFBP-3 y una proteína grande denominada la subunidad lábil al ácido (ALS). El complejo ternario de un IGF, IGFBP-3 y ALS tiene un peso molecular de 150.000 daltons aproximadamente, y se ha sugerido que la función de este complejo en la circulación puede ser el servir como reservorio y tampón para IGF-1 e IGF-2, impidiendo cambios rápidos del IGF-1 o IGF-2 libre.

Se han realizado muchos trabajos para identificar las regiones de IGF-1 e IGF-2 que se unen a las IGFBPs (Bayne y col., *J. Biol. Chem.*, 265: 15648-15652 (1990); Dubaquié y Lowman, *Biochemistry*, 38: 6386-6396 (1999) y las Patentes de EE.UU. N^{os} 5.077.276; 5.164.370 y 5.470.828). Por ejemplo, se ha descubierto que la región N-terminal de IGF-1 e IGF-2 es crítica para unirse a las IGFBPs (Patentes de EE.UU. N^{os} 5.077.276; 5.164.370 y 5.470.828). Así, la variante del IGF-1 natural, denominada des(1-3)IGF-1, se une poco a las IGFBPs.

Se ha dedicado una cantidad similar de investigación a la identificación de las regiones de IGF-1 e IGF-2 que se unen al IGF-1R (Bayne y col., *supra*; Oh y col., *Endocrinology* (1993), *supra*). Se ha encontrado que los residuos

de tirosina en las posiciones 24, 31 y 60 del IGF-1 son cruciales para la unión del IGF-1 al IGF-1R (Bayne y col., *supra*). Moléculas mutantes de IGF-1 en las que uno o más de estos residuos de tirosina están sustituidos, mostraron una unión a IGF-1R progresivamente reducida. Bayne y col., *supra*, investigaron también si tales mutantes de IGF-1 podían unirse a IGF-1R y a las IGFBPs. Encontraron que se utilizan residuos de IGF-1 e IGF-2 para unirse a las IGFBPs bastante diferentes de los utilizados para unirse al IGF-1R. Es posible por tanto producir variantes de IGF que presenten una unión reducida a las IGFBPs pero que, debido a que se unen bien a IGF-1R, muestren una actividad mantenida en ensayos de actividad *in vitro*.

Se describió también una variante de IGF que se une a las IGFBPs pero no a los receptores de IGF y que muestra por tanto una actividad reducida en ensayos de actividad *in vitro* (Bar y col., *Endocrinology*, 127: 3243-3245 (1990)). En esta variante, denominada (1-27,gly⁴,38-70)-hIGF-1, los residuos 28-37 de la región C del IGF-1 humano están sustituidos por un puente de glicina de cuatro residuos.

Se han descrito otras variantes truncadas del IGF-1. Por ejemplo, en la literatura de patentes, WO 96/3326 describe una variante truncada que tiene los residuos 1-69 del IGF-1 auténtico. EP 742.228 describe superagonistas de IGF-1 de dos cadenas, que son derivados del IGF-1 de una sola cadena existente en la naturaleza, con una región C reducida. Los análogos de IGF-1 tienen la fórmula: BCⁿ,A, en la cual B es la región B del IGF-1 o de un análogo funcional del mismo, C es la región C del IGF-1 o de un análogo funcional del mismo, n es el número de aminoácidos de la región C y es de 6 aproximadamente a 12 aproximadamente, y A es la región A del IGF-1 o de un análogo funcional del mismo.

Adicionalmente, Cascieri y col., *Biochemistry*, 27: 3229-3233 (1988) describen cuatro mutantes del IGF-1, tres de los cuales tienen afinidad reducida por el IGF-1R. Estos mutantes son: (Phe²³,Phe²⁴,Tyr²⁵)IGF-1 (que es equipotente al IGF-1 humano en su afinidad por los receptores de IGF de Tipo 1 y 2 y por los receptores de insulina), (Leu²⁴)IGF-1 y (Ser²⁴)IGF-1 (que tienen una afinidad menor que el IGF-1 por el IGF-1R de placenta humana, por el receptor de insulina placentario y por el IGF-1R de células de rata y ratón), y desoctapéptido (Leu²⁴)IGF-1 (en el cual la pérdida de la aromaticidad en la posición 24 está combinada con la eliminación de la región D carboxilo-terminal del hIGF-1, que tiene menor afinidad que (Leu²⁴)IGF-1 por el IGF-1R y mayor afinidad por el receptor de insulina). Estos cuatro mutantes tienen afinidades normales por las proteínas de unión séricas humanas.

Bayne y col., *J. Biol. Chem.*, 263: 6233-6239 (1988) describen cuatro análogos estructurales del IGF-1 humano: un mutante de la cadena B en el que los primeros 16 aminoácidos del IGF-1 fueron sustituidos por los 17 primeros aminoácidos de la cadena B de la insulina, (Gln³,Ala⁴)IGF-1, (Tyr¹⁵,Leu¹⁶)IGF-1 y (Gln³,Ala⁴,Tyr¹⁵,Leu¹⁶)IGF-1. Estos estudios identifican algunas de las regiones del IGF-1 que son responsables del mantenimiento de la unión de alta afinidad con la proteína de unión sérica y el receptor de IGF de Tipo 2.

En otro estudio, Bayne y col., *J. Biol. Chem.*, 264: 11004-11008 (1988) describen tres análogos estructurales del IGF-1: (1-62)IGF-1, que carece de la región D de 8 aminoácidos carboxilo-terminal del IGF-1; (1-27,Gly⁴,38-70)IGF-1, en el que los residuos 28-37 de la región C del IGF-1 están sustituidos por un puente de glicina de cuatro residuos; y (1-27,Gly⁴,38-62)IGF-1, con una sustitución de glicina en la región C y una delección en la región D. Peterkofsky y col., *Endocrinology*, 128: 1769-1779 (1991) describen datos utilizando el mutante Gly⁴ de Bayne y col., *supra* (Vol. 264).

Cascieri y col., *J. Biol. Chem.*, 264: 2199-2202 (1989) describen tres análogos de IGF-1 en los cuales residuos específicos de la región A del IGF-1 están sustituidos por los residuos correspondientes de la cadena A de la insulina. Los análogos son:

(Ile⁴¹,Glu⁴⁵,Gln⁴⁶,Thr⁴⁹,Ser⁵⁰,Ile⁵¹,Ser⁵³,Tyr⁵⁵,Gln⁵⁶)IGF-1, un mutante de la cadena A en el que el residuo 41 ha sido cambiado de treonina a isoleucina y los residuos 42-56 de la región A han sido sustituidos;

(Thr⁴⁹,Ser⁵⁰,Ile⁵¹)IGF-1; y (Tyr⁵⁵,Gln⁵⁶)IGF-1.

Clemmons y col., *J. Biol. Chem.*, 265: 12210-12216 (1990) describen la utilización de análogos de IGF-1 que tienen una afinidad de unión reducida por IGF-1R o por las proteínas de unión, para estudiar la especificidad de ligando de la IGFBP-1 y la función de la IGFBP-1 en la modulación de la actividad biológica del IGF-1.

WO 94/04569 describe una molécula de unión específica, distinta de una IGFBP natural, que es capaz de unirse al IGF-1 y que puede incrementar la actividad biológica del IGF-1.

Se han descrito recientemente péptidos que se unen a la IGFBP-1, bloquean la unión de IGF-1 a esta proteína de unión y, de este modo, liberan actividad "IGF libre" de mezclas de IGF-1 e IGFBP-1 (Lowman y col., *Biochemistry*, 37: 8870-8878 (1998); WO 98/45427 publicada el 15 de Octubre de 1998; Lowman y col., International Pediatric Nephrology Association, Fifth Symposium on Growth and Development in Children with Chronic Renal Failure (New York, 13 de Marzo de 1999)). Se describe también la molécula natural des(1-3)IGF-1, que muestra una afinidad reducida selectivamente por algunas de las proteínas de unión del IGF, además de una afinidad mantenida por el receptor de IGF (Patentes de EE.UU. N^{os} 5.077.276; 5.164.370; 5.470.828).

El aprovechamiento de la interacción entre IGF e IGFBP en cribado, prevención o tratamiento de enfermedades ha estado limitado, sin embargo, debido a una falta de antagonistas específicos. Hasta la fecha, se conoce solamente la existencia de una publicación que describe la aplicación de un antagonista de IGF-1/IGF-2 como auxiliar terapéutico potencial en el tratamiento del cáncer (Pietrkowski y col., *Cancer Res.*, 52: 6447-6451 (1992)). En ese informe, se sintetizó un péptido correspondiente a la región D del IGF-1 para ser utilizado como antagonista de IGF-1/2. Este péptido presentaba una actividad inhibidora cuestionable frente a IGF-1. La base de la inhibición observada no está clara, ya que la región D no desempeña una función significativa en la unión al IGF-1R sino más bien, en la unión del IGF-1 al receptor de insulina (Cooke y col., *Biochem.*, 30: 5484-5491 (1991); Bayne y col., *supra* (Vol. 264); Yee y col., *Cell Growth and Different.*, 5: 73-77 (1994)).

WO 00/23469 describe las porciones de los péptidos de IGFBP y de IGF que son responsables de la unión IGF-IGFBP, esto es, un dominio de unión a IGF aislado de una IGFBP o una modificación del mismo que se une a IGF con al menos la misma afinidad de unión aproximadamente que la IGFBP de longitud completa. La publicación de patente describe también un antagonista de IGF que reduce la unión de IGF a un receptor de IGF y/o se une a un dominio de unión de la IGFBP.

Adicionalmente, EP 639981 describe composiciones farmacéuticas que contienen péptidos cortos que funcionan como antagonistas del receptor de IGF-1. Los péptidos utilizados en las composiciones farmacéuticas constan de menos de 25 aminoácidos, contienen al menos una porción de la región C o D de IGF-1 e inhiben la autofosforilación de los receptores de IGF-1 inducida por IGF-1.

Los polipéptidos, incluyendo las moléculas de IGF, tienen una estructura tridimensional determinada por la secuencia de aminoácidos primaria y el entorno que circunda al polipéptido. Esta estructura tridimensional establece la actividad, la estabilidad, la afinidad de unión, la especificidad de unión y otros atributos bioquímicos del polipéptido. Por tanto, el conocimiento de la estructura tridimensional de una proteína puede proporcionar mucha orientación para diseñar agentes que remedien, inhiban o mejoren su actividad biológica en formas solubles o unidas a la membrana.

La estructura tridimensional de un polipéptido puede ser determinada de varias formas. Muchos de los métodos más precisos emplean cristalografía de rayos X (Van Holde, *Physical Biochemistry* (Prentice Hall: N.J., 1971), pp. 221-239). Esta técnica se basa en la capacidad de las retículas cristalinas para producir la difracción de rayos X o de otras formas de radiación. Los experimentos de difracción adecuados para determinar la estructura tridimensional de macromoléculas requieren típicamente cristales de alta calidad. Desafortunadamente, no ha habido tales cristales disponibles para IGF-1 ni tampoco para otras muchas proteínas de interés. Se han descrito cristales, por ejemplo, para M-CSF (EP 668.914B1), para el ligando CD40 (WO 97/00895) y para un fragmento Fab de BC2 (WO 99/01476).

La cristalización de la insulina es un campo intensamente investigado, con respecto al trabajo sobre análisis estructural (Adams y col., *Nature*, 224: 491 (1969)) y a aplicaciones farmacéuticas. Ejemplos de suspensiones de cristales de insulina que se utilizan terapéuticamente incluyen suspensiones de cristales de zinc-insulina romboédricos que son estables en presencia de un 0,8-2,5% de zinc (sobre la base del peso de la insulina) a un valor de pH neutro y que presentan una acción retardada, y cristales de insulina protamina isofano, que son utilizados en productos de acción retardada en forma de pequeñas varillas. Se conocen además otras cuantas modificaciones de cristales de insulina, pero éstas han sido de interés hasta ahora solamente para el análisis de la estructura mediante rayos X. De este modo, se han obtenido cristales ortorrómbicos y monoclinicos sin zinc bajo condiciones de pH ácido (Einstein y Low, *Acta Crystallogr.*, 15: 32-34 (1962)). Se han obtenido en el punto isoeléctrico dodecaedros rómbicos más pequeños, que han de ser clasificados en el grupo espacial cúbico, también en ausencia de zinc. Finalmente, se ha obtenido una forma de cristal monoclinico de insulina por encima del punto isoeléctrico en presencia de zinc y en presencia de fenol o de derivados de fenol. Estos cristales crecen hasta un tamaño considerable (hasta 3 mm) en unos pocos días y tienen aristas afiladas. Y lo que es más interesante, estos cristales han sido encontrados únicamente sobre superficies vítreas y no sobre la superficie libre de la solución. Suspensiones de cristales y otras formas cristalinas de preparaciones de insulina y de análogos de insulina están descritas, por ejemplo, en patentes representativas tales como las Patentes de EE.UU. N^{os} 4.959.351; 5.840.680; 5.834.422; 6.127.334; 5.952.297; 5.650.486; 5.898.028; 5.898.067; 5.948.751; 5.747.642; 5.597.893; 5.547.930; 5.534.488; 5.504.188; 5.461.031 y 5.028.587.

Se conocen en la técnica varios métodos para preparar proteínas y polipéptidos cristalinos (McPherson y col., "Preparation and Analysis of Protein Crystals", McPherson (Robert E. Krieger, Publishing Company, Malabar, FL, 1989); Weber, *Advances in Protein Chemistry*, 41: 1-36 (1991); Patentes de EE.UU. N^{os} 4.672.108 y 4.833.233). Aunque existen múltiples métodos para cristalizar polipéptidos, ningún conjunto individual de condiciones proporciona una esperanza razonable de éxito, especialmente cuando los cristales deben ser adecuados para estudios de difracción de rayos X. Se requiere un esfuerzo significativo para obtener cristales de tamaño y resolución suficientes para proporcionar una información precisa referente a la estructura. Por ejemplo, una vez que se ha obtenido una proteína de pureza suficiente, debe ser cristalizada con un tamaño y con una claridad que sean útiles para difracción de rayos X y la resolución posterior de la estructura. Además, aunque puede conocerse la secuencia de aminoácidos de una proteína diana, esta información sobre la secuencia no permite predecir de manera precisa la estructura cristalina de la proteína. La información sobre la secuencia tampoco permite conocer las interacciones estructurales, conformacionales y químicas entre un ligando tal como IGFBP y su proteína diana. Por tanto, aunque las estructuras cristalinas pueden proporcionar gran cantidad de información valiosa en el campo del diseño y descubrimiento de fármacos, cristales de ciertos compuestos biológicamente relevantes tales como IGF-1 no están fácilmente disponibles para los expertos en la técnica. Cristales de IGF-1 de alta calidad, que produzcan difracción, ayudarían a la determinación de su estructura tridimensional.

La producción de antagonistas específicos de IGF-1 ha estado limitada, al menos en parte, debido a las dificultades para estudiar la estructura de IGF y de las IGFbps. Debido a la incapacidad para obtener cristales de IGF-1 adecuados para estudios de difracción, por ejemplo, una extrapolación de la estructura del IGF-1 basada en la estructura cristalina de la insulina porcina era el mapa de carreteras estructural más importante disponible para el IGF-1 (Blundell y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 180-184 (1978)). Ver también Blundell y col., *Fed. Proc.*, 42: 2592-2597 (1983), que describe estructuras terciarias, unión a receptores y la antigenicidad de IGFs. Sobre la base de estudios de IGF-1 modificado químicamente y mutado, se han identificado varios residuos comunes entre el IGF-1 y la insulina como parte del sitio de contacto con el IGF-1R-receptor de insulina, en particular, los residuos aromáticos en las posiciones 23-25.

Utilizando RMN y dinámica molecular restringida, se ha descrito recientemente la estructura en solución del IGF-1 (Cooke y col., *supra*). Se demostró que la estructura minimizada resultante se ajustaba mejor a los hallazgos experimentales sobre el IGF-1 modificado, así como a las extrapolaciones realizadas a partir de los estudios de estructura-actividad de la insulina. Además, De Wolf y col., *Protein Sci.*, 5: 2193-2202 (1996) describen la estructura en solución de un mini-IGF-1. Sato y col., *Int. J. Pept. Protein Res.*, 41: 433-440 (1993) describen la estructura tridimensional de IGF-1 determinada mediante 1H-RMN y geometría de distancias. Laajoki y col., *J. Biol. Chem.*, 275: 10009-10015 (2000) describen la estructura en solución y la dinámica del esqueleto de largo-[Arg(3)]IGF-1. Ver también Laajoki y col., *FEBS Lett.*, 420: 97-102 (1997). El pequeño número de modelos de RMN disponibles para IGF-1 no está muy bien definido, ya que existen grandes RMSDs entre los átomos del esqueleto de los segmentos helicoidales. El mejor modelo de RMN es el del IGF-2 en el que se muestran tres hélices alfa. Ver Torres y col., *J. Mol. Biol.*, 248: 385-401 (1995), que describe la estructura en solución del IGF-2 humano y su relación con las interacciones con el receptor y las proteínas de unión. En todas las estructuras, las regiones C y D están muy poco definidas.

Además de proporcionar información estructural, los polipéptidos cristalinos proporcionan otras ventajas. Por ejemplo, el propio proceso de cristalización purifica además el polipéptido y satisface uno de los criterios clásicos de la homogeneidad. De hecho, la cristalización proporciona frecuentemente una calidad de purificación incomparable, eliminando impurezas que no son eliminadas por otros métodos de purificación tales como HPLC, diálisis, cromatografía en columna convencional, etc. Además, los polipéptidos cristalinos son a menudo estables a temperatura ambiente y están libres de contaminación con proteasas y otras degradaciones asociadas con el almacenamiento en solución. Los polipéptidos cristalinos pueden ser también útiles como preparaciones farmacéuticas. Finalmente, las técnicas de cristalización carecen generalmente en su mayoría de problemas tales como la desnaturalización asociada con otros métodos de estabilización (por ejemplo, liofilización). Por tanto, existe una necesidad significativa de la preparación de composiciones de IGF-1 en forma cristalina y de la determinación de su estructura tridimensional. La presente invención satisface esta y otras necesidades. Una vez que se ha llevado a cabo la cristalización, los datos cristalográficos proporcionan una información estructural útil que puede ayudar al diseño de péptidos que pueden servir como agonistas o antagonistas. Además, la estructura cristalina proporciona información útil para la creación de mapas del dominio de unión al receptor, el cual podría ser posteriormente remediado por una molécula no peptídica pequeña que puede servir como antagonista o agonista. Además, los hallazgos relacionados con la inhibición por detergentes de la unión de IGFbp a IGF-1 pueden ser utilizados para identificar nuevos agonistas del IGF-1.

Resumen de la invención

Por consiguiente, la invención es según está reivindicada. IGF-1 ha sido cristalizado y se ha determinado su estructura utilizando difracción anómala de múltiples longitudes de onda (MAD) a una resolución de 1,8 angstroms, aprovechando la dispersión anómala de un solo ión bromuro y seis de los siete átomos de azufre del IGF-1. La región C del IGF-1, que está ordenada en la estructura cristalina, forma un giro beta de tipo II y media una interacción de empaquetado del cristal a través de un radical divalente cristalográfico. El estado en solución del IGF-1 fue caracterizado mediante ultracentrifugación analítica, y los resultados indican que el IGF-1 existe principalmente como un monómero a pH neutro, con sólo una ligera tendencia a dimerizarse a concentraciones milimolares. Una molécula de detergente, N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina (desoxi CHAPS grande), media un contacto de empaquetado del cristal entre moléculas de simetría relacionada. Experimentos en solución confirman que el complejo IGF-1:N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina se forma en solución, y que la unión del detergente bloquea de forma medible la unión de IGFbp.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un cristal formado por IGF-1 que produce difracción de la radiación de rayos X para producir un patrón de difracción que representa la estructura tridimensional del IGF-1. Preferiblemente, este cristal tiene aproximadamente las constantes celulares siguientes: $a = 31,831 \text{ \AA}$, $b = 71,055 \text{ \AA}$, $c = 65,995 \text{ \AA}$ y un grupo espacial de $C22_1$. También preferiblemente, el IGF-1 contiene una región A, B, C y D y forma un dímero en el cristal, y es preferido adicionalmente el cristal que contiene un sitio de unión al receptor en la interfase dimerica.

La invención proporciona también una composición que contiene el cristal anterior y un vehículo. Preferiblemente, en esta composición el IGF-1 es biológicamente activo cuando es resolubilizado. La invención proporciona además dicha composición para ser utilizada en un método de la SEC ID N°: 1, según se define en las reivindicaciones, para el tratamiento de un mamífero que padezca un trastorno de agonistas, preferiblemente un paciente humano, comprendiendo dicho método la administración a dicho mamífero de una cantidad eficaz de la composición resolubilizada anterior.

ES 2 278 020 T3

La invención proporciona también un método para cristalizar IGF-1 de SEC ID N°: 1, según se define en las reivindicaciones.

La invención proporciona también IGF-1 cristalino producido mediante el método anterior.

Adicionalmente, la invención proporciona un método para determinar una estructura tridimensional del IGF-1, según se define en las reivindicaciones.

Además, se describe un medio de almacenamiento de datos legible por un aparato que comprende un material de almacenamiento de datos codificado con datos legibles por un aparato que, cuando es leído por un aparato apropiado, muestra una representación tridimensional de un cristal de una molécula que comprende IGF-1.

Se describe un cristal de IGF-1 con las coordenadas estructurales mostrada en el Apéndice 1.

Adicionalmente, la invención proporciona un método de utilización de una estructura tridimensional de IGF-1 derivada de un cristal de IGF-1, donde la estructura tridimensional de IGF-1 incluye una región de unión al receptor de IGF-1, comprendiendo el método la identificación de compuestos que tienen estructuras que interaccionan con la región de unión al receptor de la estructura tridimensional de IGF-1 y funcionan como agonistas o antagonistas de IGF-1. Preferiblemente, en tal método la estructura tridimensional de IGF-1 incluye coordenadas de carbonos alfa que son sustancialmente las mismas que las de la información estructural presentada en el Apéndice 1.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para identificar agonistas o antagonistas del IGF-1 que comprende las etapas de

- (a) la cristalización de IGF-1 para formar los cristales reivindicados de IGF-1, conteniendo los cristales de IGF-1 un grupo de residuos de aminoácidos que definen una región de unión al receptor de IGF-1;
- (b) la irradiación de los cristales de IGF-1 de la etapa (a) para obtener un patrón de difracción de los cristales de IGF-1;
- (c) la determinación de una estructura tridimensional de IGF-1 a partir del patrón de difracción, incluyendo la estructura una región de unión al receptor de IGF-1; y
- (d) la identificación de un agonista o antagonista de IGF-1 con una estructura tridimensional que duplique funcionalmente la unión esencial al receptor de IGF, residuos accesibles al solvente que presenten la estructura tridimensional de la región de unión al receptor de IGF-1, teniendo dicho agonista o antagonista de IGF-1 una capacidad de transmisión de señales alteradas para las células sensibles a IGF-1, en comparación con IGF-1.

Preferiblemente, en este método los residuos accesibles al solvente no participan en la formación de la interfase de IGF-1.

De acuerdo con ciertos aspectos adicionales, la invención incluye un método para diseñar un compuesto, tal como un peptidomimético, que remede la estructura superficial tridimensional del IGF-1 que comprende las etapas de

- (a) la determinación de la estructura tridimensional del IGF-1 a partir del cristal reivindicado; y
- (b) el diseño de un compuesto que remede la estructura superficial tridimensional del IGF-1.

De acuerdo con una realización adicional, la invención proporciona un método para identificar un peptidomimético que se una a IGF-1 y bloquee la unión de una IGFBP o de un receptor que se una a IGF-1, que comprende las etapas de:

- (a) la búsqueda en una base de datos de estructuras moleculares con los parámetros estructurales o las coordenadas estructurales proporcionadas en el Apéndice 1; y
- (b) la selección de una molécula de la base de datos que remede los parámetros estructurales o las coordenadas estructurales del IGF-1.

La invención proporciona también un método para determinar al menos una porción de una estructura tridimensional de un complejo molecular, conteniendo dicho complejo IGF-1, y comprendiendo dicho método las etapas de:

- (a) la determinación de las coordenadas estructurales del cristal reivindicado de IGF-1;
- (b) el cálculo de fases a partir de las coordenadas estructurales;
- (c) el cálculo de un mapa de densidad electrónica a partir de las fases obtenidas en la etapa (b); y

- (d) la determinación de la estructura de al menos una porción del complejo sobre la base de dicho mapa de densidad electrónica.

Preferiblemente, las coordenadas estructurales utilizadas en la etapa (a) son sustancialmente las mismas que las descritas en el Apéndice 1 o describen sustancialmente el mismo cristal que las coordenadas del Apéndice 1.

La invención proporciona también un método para evaluar la capacidad de una identidad química para asociarse con IGF-1 o con un complejo del mismo, comprendiendo el método las etapas de:

- (a) la utilización de un medio computacional o experimental para llevar a cabo una operación de ajuste entre la entidad química y el IGF-1 descrito en el Apéndice 1 o un complejo del mismo, obteniendo de este modo datos relacionados con la asociación; y
- (b) el análisis de los datos obtenidos en la etapa (a) para determinar las características de la asociación entre la entidad química y el IGF-1 o el complejo del mismo.

Se describe también una entidad química identificada mediante el método anterior que interfiere con la asociación *in vivo* o *in vitro* entre el IGF-1 y su receptor o entre el IGF-1 y al menos una de sus proteínas de unión, o que se asocia con un sitio de unión en el IGF-1.

Se proporciona también un derivado con un átomo pesado de una forma cristalizada del IGF-1.

Se describe también un método para evaluar computacionalmente o experimentalmente una entidad química con el fin de obtener información sobre su asociación con uno o más sitios de unión del IGF-1, utilizando un cristal de IGF-1 que tiene las coordenadas estructurales descritas en el Apéndice 1.

Cualquier análogo peptídico y otras entidades químicas identificadas utilizando los métodos anteriores de la presente invención son útiles en los métodos terapéuticos descritos en la presente y como composiciones farmacéuticas.

Se contempla un método para identificar agonistas indirectos del IGF-1, que comprende las etapas de:

- (a) la comparación de la capacidad de la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina para inhibir la unión de IGFBP-1 o IGFBP-3 a IGF-1 con la capacidad de un agonista indirecto del IGF-1 candidato para inhibir dicha unión; y
- (b) la determinación de si el agonista candidato inhibe tal unión al menos tan bien como lo hace la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina.

La comparación puede ser realizada mediante un ensayo de competición entre la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina y el agonista candidato. Adicionalmente, la inhibición de la unión es medida preincubando N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina o el agonista candidato con IGF-1 expresado en partículas de bacteriófago y midiendo la unión residual de IGF-1 a IGFBP-1 o IGFBP-3 en un ensayo de ELISA en placas.

Se describe un método para identificar agonistas indirectos del IGF-1 que comprende la cocrystalización de un agonista indirecto del IGF-1 candidato con IGF-1 para formar una estructura cocrystalina y la determinación de si el agonista candidato se une a uno a los dos parches en IGF-1, donde un parche tiene los residuos de aminoácidos Glu 3, Thr 4, Leu 5, Asp 12, Ala 13, Phe 16, Val 17, Cys 47, Ser 51, Cys 52, Asp 53, Leu 54 y Leu 57, y el segundo parche tiene los residuos de aminoácidos Val 11, Gln 15, Phe 23, Phe 25, Asn 26, Val 44, Phe 49 y Arg 55, y donde la unión tiene lugar si hay al menos un contacto entre cada uno de los residuos de aminoácidos enumerados de un parche dado y el agonista candidato que sea menor o igual que 6 angstroms en la estructura cocrystalina. El agonista candidato puede inhibir la unión de IGFBP-1 o -3 al IGF-1 al menos igual de bien que la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina. Otro método es el método en el que se mide la inhibición de la unión utilizando un ensayo de competición entre la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina y el agonista candidato, o el método en el que se mide la inhibición de la unión mediante la preincubación de N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina o del agonista candidato con IGF-1 expresado en partículas de bacteriófago y la medida de la unión residual de IGF-1 a IGFBP-1 o IGFBP-3 en un ensayo de ELISA en placa.

Se describe también en la presente un método para tratar un trastorno de agonistas de IGF-1 en un mamífero, que comprende la administración al mamífero de una cantidad eficaz de N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina.

Se describe además en la presente un complejo cocrystalino de IGF-1 y N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 alinea las secuencias de IGF-1 (SEC ID N°:1), IGF-2 (SEC ID N°:2) e insulina (SEC ID N°:3). Las cadenas A, B y C de la insulina (y las secuencias de IGF-1 e IGF-2 correspondientes a las mismas) están mostradas, respectivamente, en texto en negrita, subrayado y en cursiva. Los tres residuos aromáticos están mostrados por perfi-

lado del texto. Se ha demostrado que los residuos marcados con una (!) son importantes para la unión al receptor de IGF-1. Se ha demostrado que los residuos marcados con un "*" son importantes para la unión a IGFBP-1 e IGFBP-3. Los residuos carboxiterminales que contienen la región D de IGF-1 e IGF-2 están representados en letra normal.

5 La Figura 2 es un diagrama de cintas del IGF-1 que muestra el plegamiento del esqueleto. En la representación gráfica de Ramachandran, el 97,7% es el más favorecido y el 2,3% es permitido.

La Figura 3 es un diagrama de cintas del IGF-1 (estructura de la izquierda) y de la insulina (estructura de la derecha).

10 La Figura 4 es un diagrama de cintas del IGF-1 que muestra que el detergente utilizado en la solución reservorio, (N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina), se une en una pequeña hendidura hidrofílica en la base de la hélice B. El detergente está representado por estructuras de color gris más claro que las estructuras del IGF-1.

15 La Figura 5 es un diagrama de cintas del IGF-1 como un dímero, estando mostrado el detergente en color gris más claro.

La Figura 6 es un diagrama de cintas del IGF-1 como un dímero, que muestra que los residuos importantes para la unión al receptor (indicados por estructuras de anillo en la porción central de la figura) se agrupan en la interfase dimérica. El detergente está mostrado en gris más claro en las porciones externas de la figura.

Las Figuras 7A y 7B son diagramas de cintas del IGF-1 que demuestran, igual que la Fig. 4, que el detergente utilizado en la solución reservorio (N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina), mostrado en forma de bastón, se une en una pequeña hendidura hidrofílica en la base de la hélice B. En la Fig. 7A el grupo cabeza del detergente está insertado en la hendidura tapizada por los residuos Leu 5, Phe 16, Val 17, Leu 54 y Leu 57. Las diferentes tonalidades de gris están de acuerdo con los resultados de mutagénesis mediante el barrido de alanina de Dubaquié y Lowman, *supra*, indicando las regiones de Phe 16, Val 17 y Leu 5 una reducción de 5-10 veces, la región de Glu 3 una reducción de 10-100 y las regiones de Pro 63 y Pro 63' una reducción >100 veces de la afinidad por IGFBP-1. La parte negra en el extremo derecho corresponde a la molécula de IGF-1 de simetría relacionada que forma el dímero cristalográfico. El círculo próximo a Leu 54 indica el átomo C10 del detergente, que difiere de otro detergente (sulfonato de 3-((3-colamidopropil)dimetilamonio)-1-propano; o CHAPS) en que tiene un grupo hidroxilo en esta posición. La Fig. 7B muestra la vista desde la superficie opuesta del detergente y representa las interacciones de la molécula de detergente con una molécula de IGF-1 de simetría relacionada. Igual que en la Fig. 7A, los diferentes tonos de gris están de acuerdo con los resultados de la mutagénesis mediante barrido de alanina de Dubaquié y Lowman, *supra*, indicando el grupo próximo a Gln 15 una reducción de 5-10 veces, las moléculas de gris medio del extremo izquierdo, las moléculas de la región de Leu 10 y la región de gris medio del extremo derecho indicando una reducción de 10-100 veces y las regiones negras en Phe 49 y Gly 7 indicando una reducción >100 veces de la afinidad por IGFBP-1. Las regiones negras a la derecha de la molécula de detergente corresponden a la molécula de IGF-1 de simetría relacionada que forma el dímero cristalográfico. El círculo próximo a Gln 15 indica el átomo C10 del detergente, según se indicó anteriormente para la Fig. 7A. Esta figura fue preparada utilizando INSIGHT (MSI, San Diego, CA).

La Figura 8 muestra una gráfica resultante de un estudio de unión de competición detergente/IGFBP. En este experimento se utilizó N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina como inhibidor competitivo de la unión de IGF-1 a IGFBP-1 inmovilizada (cuadrados rellenos) o a IGFBP-3 (círculos sin rellenar). Como control positivo se utilizó IGFBP-1 soluble como inhibidor competitivo de la unión de IGF-1 a IGFBP-1 inmovilizada (triángulos rellenos). Cada punto de datos representa la media de dos experimentos independientes.

La Figura 9A muestra un análisis de mínimos cuadrados no lineal de los datos del equilibrio de sedimentación para IGF-1 en solución. Los datos recogidos a velocidades de rotor de 30.000 rpm (triángulos sin rellenar) y 35.000 rpm (cuadrados sin rellenar) fueron ajustados como un modelo de autoasociación monómero-dímero ideal. Las líneas continuas son los ajustes de los datos. La Figura 9B muestra los valores residuales representados gráficamente para ambas velocidades del rotor después de justificar los datos mediante el procedimiento de ajuste. Están distribuidos aleatoriamente alrededor de cero, indicando que el modelo de monómero-dímero es correcto para esta interacción.

La Figura 10A muestra un diagrama de cintas determinado mediante RMN de un complejo de IGF-1 y N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina, y la Figura 10B muestra un diagrama de cintas determinado mediante RMN de un complejo de IGF-1 unido a un péptido antagonista de IGF-1 derivado de un fago, denominado IGF-F1-1.

60 Descripción de las realizaciones preferidas

A. Definiciones

Según se utiliza en la presente, "IGF-1" se refiere al factor de crecimiento similar a insulina de tipo 1 humano, a no ser que se indique de otro modo, y tiene la secuencia del IGF-1 maduro nativo humano sin una metionina N-terminal según está descrito, por ejemplo, por EP 230.869 publicada el 5 de Agosto de 1987; EP 128.733 publicada el 19 de Diciembre de 1984 o por EP 288.451 publicada el 26 de Octubre de 1988.

Una "IGFBP" o una "proteína de unión a IGF" se refiere a una proteína o a un polipéptido asociado normalmente con, o unido a, o formando un complejo con, IGF-1, sea o no circulatoria (esto es, esté en el suero o en un tejido). Esta definición incluye IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, IGFBP-6, Mac 25(IGFBP-7) y el factor estimulante de prostaciclina (PSF) o la molécula específica de células endoteliales (ESM-1), así como otras proteínas que tienen una elevada homología con IGFBPs. Mac 25 está descrita en, por ejemplo, Swisshelm y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 4472-4476 (1995) y Oh y col., *J. Biol. Chem.*, 271: 30322-30325 (1996). PSF está descrito en Yamauchi y col., *Biochemical Journal*, 303: 591-598 (1994). ESM-1 está descrita en Lassalle y col., *J. Biol. Chem.*, 271: 20458-20464 (1996). Para otras IGFBPs identificadas, ver, por ejemplo, EP 375.438 publicada el 27 de Junio de 1990; EP 369.943 publicada el 23 de Mayo de 1990; la Patente de EE.UU. N° 5.258.287; WO 89/09268 publicada el 5 de Octubre de 1989; Wood y col., *Molecular Endocrinology*, 2: 1176-1185 (1988); Brinkman y col., *The EMBO J.*, 7: 2417-1423 (1988); Lee y col., *Mol. Endocrinol.*, 2: 404-411 (1988); Brewer y col., *BBRC*, 152: 1289-1297 (1988); EP 294.021 publicada el 7 de Diciembre de 1988; Baxter y col., *BBRC*, 147: 408-415 (1987); Leung y col., *Nature*, 330: 537-543 (1987); Martin y col., *J. Biol. Chem.*, 261: 8754-8760 (1986); Baxter y col., *Comp. Biochem. Physiol.*, 91B: 229-235 (1988); WO 89/08667 publicada el 21 de Septiembre de 1989; WO 89/09792 publicada el 19 de Octubre de 1989 y Binkert y col., *EMBO J.*, 8: 2497-2502 (1989). IGFBP-1 e IGFBP-3 se unen a residuos diferentes del IGF-1.

Según se utiliza en la presente, "receptor del IGF-1 humano" o únicamente "receptor del IGF-1", se refiere a cualquier receptor de IGF-1 encontrado en humanos e incluye los receptores de IGF de Tipo 1 y de Tipo 2 en humanos a los que se une el IGF-1 humano, tales como el IGF-1R placentario, etc.

Un "agonista indirecto del IGF-1" es una molécula que libera IGF-1 *in situ* de IGFBP-3 o IGFBP-1, de tal manera que el IGF-1 liberado es activo e interacciona con su receptor.

Los "péptidos" son moléculas que tienen al menos dos aminoácidos e incluyen polipéptidos con al menos 60 aminoácidos aproximadamente. Preferiblemente, los péptidos tienen de 10 aproximadamente a 60 aminoácidos aproximadamente, más preferiblemente 10-25 aproximadamente y muy preferiblemente 12-25 aminoácidos aproximadamente. La definición incluye péptidos lineales y cíclicos, derivados peptídicos, sus sales o isómeros ópticos.

Según se utiliza en la presente, un "mamífero" para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, animales de zoo, para deportes o mascotas tales como perros, caballos, gatos, ovejas, cerdos, vacas, etc. El mamífero preferido en la presente es un humano. El término "no adulto" se refiere a mamíferos que están en edad perinatal (tales como bebés de bajo peso en el nacimiento) hasta la edad de la pubertad, siendo estos últimos aquéllos que no han alcanzado todavía el potencial de crecimiento completo.

Según se utiliza en la presente, el término "tratamiento" se refiere a un tratamiento terapéutico y a medidas profilácticas o preventivas. Aquéllos con necesidad de tratamiento incluyen a aquéllos que tienen ya la enfermedad así como a los que son susceptibles de tener la enfermedad o de ser diagnosticados de la enfermedad, o a aquéllos en los que ha de prevenirse la enfermedad.

Un "trastorno" es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con un agonista del IGF-1 ("trastorno de agonista") o con un antagonista del IGF-1 ("trastorno de antagonista"). Este término incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluyendo aquéllas condiciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. El trastorno a tratar puede ser cualquier combinación de dos o más de los trastornos de agonista o antagonista enumerados posteriormente.

Ejemplos no limitantes de trastornos de antagonista incluyen tumores benignos y malignos, leucemias y enfermedades malignas linfoides, trastornos neuronales, gliales, astrocíticos, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromales y blastocélicos, y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos, complicaciones diabéticas tales como retinopatías o neuropatías diabéticas, degeneración macular relacionada con la edad, cirugía oftálmica tal como la extracción de cataratas, un trasplante de córnea, cirugía de filtración y queratoplastia del glaucoma, cirugía para corregir la refracción, esto es queratotomía radial, también en agujeros maculares y degeneración de la esclerótica, lágrimas retinales, vitreoretinopatía, trastornos varios, trastornos de cataratas de la córnea tales como las secuelas de la queratotomía radial, ojo seco, conjuntivitis vírica, conjuntivitis ulcerosa, heridas tales como heridas epiteliales de la córnea, síndrome de Sjogren, trastornos de la retina tales como edema macular y retinal, cicatrización con visión limitada, isquemia retinal y retinopatía vítrea proliferativa.

Más preferiblemente, tales trastornos de antagonista incluyen complicaciones diabéticas exacerbadas por IGF-1, lesiones isquémicas y enfermedades asociadas con una proliferación celular indeseable tales como cáncer, restenosis y asma. Si el trastorno es una complicación diabética exacerbada por IGF-1, tal complicación puede incluir retinopatía diabética o nefropatía diabética. La eficacia del tratamiento puede ser evidenciada por una reducción de las manifestaciones o síntomas clínicos incluyendo, por ejemplo, un aclaramiento renal mejorado, una visión mejorada o una reducción de la cantidad de IGF-1 disponible para unirse a un receptor de IGF-1. Si el trastorno es una lesión isquémica, puede incluir derrame cerebral, isquemia miocárdica y lesión isquémica de los riñones.

Ejemplos de trastornos de agonista para los fines de la presente incluyen cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con un IGF-1 incluyendo, pero sin limitarse a, por ejemplo, enfermedades pulmonares, trastornos hiperglucémicos como los expuestos posteriormente, trastornos renales tales como insuficiencia renal aguda y crónica, fallo

renal crónico terminal, glomerulonefritis, nefritis intersticial, pielonefritis, glomeruloesclerosis, por ejemplo Kimmelstiel-Wilson en pacientes diabéticos e insuficiencia renal después de un trasplante de riñón, obesidad, insuficiencia de GH, síndrome de Turner, síndrome de Laron, baja estatura, síntomas indeseables asociados con el envejecimiento tales como obesidad y proporciones incrementadas de masa grasa respecto a masa magra, trastornos inmunológicos tales como inmunodeficiencias, incluyendo recuentos disminuidos de CD4 e inmunotolerancia disminuida, o daño tisular inducido por quimioterapia, trasplante de médula ósea, enfermedades o insuficiencias de la estructura o función cardíaca tales como disfunciones cardíacas e insuficiencia cardíaca congestiva, trastornos neuronales, neurológicos o neuromusculares, por ejemplo neuropatía periférica, esclerosis múltiple, distrofia muscular o distrofia miotónica y estados catabólicos asociados con el desgaste causado por cualquier condición, incluyendo por ejemplo trauma o heridas, o infección tal como mediante una bacteria o un virus humano tal como VIH, heridas, trastornos de la piel, estructuras y funciones del intestino que necesitan restauración, etcétera. Los trastornos de agonista preferidos que son un objetivo para el tratamiento de la presente son la diabetes y la obesidad, disfunciones cardíacas, el desgaste relacionado con el SIDA, trastornos renales, trastornos neurológicos, trastornos del crecimiento de todo el organismo y trastornos inmunológicos.

Según se utiliza en la presente, el término “trastornos hiperglucémicos” se refiere a todas las formas de diabetes y trastornos resultantes de la resistencia a insulina, tales como las diabetes de Tipo I y de Tipo II, así como a la resistencia a insulina grave, la hiperinsulinemia y la hiperlipidemia, por ejemplo sujetos obesos, y a las diabetes resistentes a la insulina tales como el Síndrome de Mendenhall, el Síndrome de Wemer, el leprechaunismo, la diabetes lipoatrófica y otras lipotrofías. El trastorno hiperglucémico preferido es la diabetes, especialmente la diabetes de Tipo I y de Tipo II. El término “diabetes” se refiere en sí mismo a una enfermedad progresiva del metabolismo de los carbohidratos que implica una producción o una utilización inadecuadas de la insulina y que se caracteriza por hiperglucemia y glucosuria.

IGF-1 “biológicamente activo” se refiere a IGF-1 que presenta una propiedad biológica asociada convencionalmente con un agonista o un antagonista del IGF-1, tal como una propiedad que permitiría el tratamiento de una o más de las enfermedades enumeradas anteriormente.

El término “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad de IGF-1 o de un peptidomimético o de otro compuesto, incluyendo entidades químicas, que es eficaz para tratar una enfermedad o un trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, por ejemplo, la cantidad eficaz del péptido puede reducir el número de células cancerosas; puede reducir el tamaño del tumor; inhibir (esto es, enlentecer hasta cierto punto y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (esto es, enlentecer hasta al menos cierto grado y preferiblemente detener) las metástasis tumorales; inhibir, hasta cierto grado, el crecimiento tumoral; estimular la apoptosis y/o aliviar hasta cierto grado uno o más de los síntomas asociados con la enfermedad.

Un “precipitante” es un agente de una solución reservorio que precipita IGF-1 cuando se mezcla con una solución acuosa de IGF-1 y se deja equilibrar para formar cristales de IGF-1. Ejemplos incluyen agentes caotrópicos tales como sulfato de amonio, polietilén glicoles (de una amplia variedad de pesos moleculares que varían desde, por ejemplo, 2000 a 20.000 aproximadamente), citrato de sodio, cacodilato de sodio o una mezcla de los mismos.

Una “solución reservorio” es una solución de un precipitante y cualquier otro ingrediente necesario para proporcionar cristales de IGF-1, por ejemplo un detergente tal como C₁₂E₉ (monododecil éter de nonaetilén glicol, monolauril éter de nonaetilén glicol, éter de polioxietileno (9)), C₁₂E₈ (monododecil éter de octaetilén glicol, monolauril éter de octaetilén glicol, lauril éter de polioxietileno (8)), dodecil beta-D-maltopiranosido, éster de sacarosa del ácido láurico, ciclohexil-pentil-beta-D-maltósido, octilfenol éter de nonaetilén glicol, bromuro de cetiltrimetilamonio, decil-beta-D-maltopiranosido, óxido de laurildimetilamina, ciclohexil-pentil-beta-D-maltósido, n-dodecilsulfobetaina, 3-(dodecildimetilamonio)propano-1-sulfonato, nonil-beta-D-glucopiranosido, octil-beta-D-tioglucoipiranosido, OSG, beta-óxido de N,N-dimetildecilamina, metil-6-O-(N-heptilcarbamoil)-alfa-D-glicopiranosido, monocaproilato de sacarosa, heptil-beta-D-tioglucoipiranosido, octil-beta-D-glucopiranosido, ciclohexil-propil-beta-D-maltósido, ciclohexilbutanoil-N-hidroxiethylglucamida, n-decilsulfobetaina, 3-(decildimetilamonio)propano-1-sulfonato, octanoil-N-metilglucamida, hexil-beta-D-glucopiranosido y N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina. Preferiblemente, el detergente es N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina.

“Recristalización” se refiere al procedimiento, una vez que los cristales iniciales han crecido y se ha determinado que no son muy grandes o que son útiles, de adición de una sustancia a los cristales, tal como metil pentanodiol, que tiene el efecto de disolver los cristales pero no de diluir mucho nada más en la mezcla de cristalización. Posteriormente, a lo largo del transcurso de varios días, a medida que la gotita de cristalización se reequilibra con su solución reservorio, los cristales vuelven a crecer, pero esta vez mucho más grandes y mucho mejor ordenados.

El término “en asociación con” se refiere a una condición de proximidad entre IGF-1 y una entidad química, o porciones de la misma. La asociación puede ser no covalente, en la cual la yuxtaposición está favorecida energéticamente por la formación de enlaces de hidrógeno, la interacción de van der Waals o la interacción electrostática, o bien puede ser una asociación covalente.

El término “sitio de unión” se refiere a cualquiera o a todos los sitios en los que una entidad química se une o asocia a IGF-1.

El término “coordenadas estructurales” se refiere a las coordenadas derivadas de ecuaciones matemáticas relacionadas con los patrones obtenidos en la difracción de un haz monocromático de rayos X por los átomos (centros de dispersión) de una molécula en forma cristalina. Los datos de difracción pueden ser utilizados para calcular un mapa de densidad electrónica de las unidades de repetición del cristal. Los expertos en la técnica comprenderán que los datos obtenidos dependen del sistema particular utilizado y, por tanto, coordenadas diferentes pueden de hecho describir el mismo cristal si tales coordenadas definen sustancialmente la misma relación que la descrita en la presente. Un mapa de densidad electrónica puede ser utilizado para establecer las posiciones de los átomos individuales en la celda unidad del cristal.

Los expertos en la técnica comprenden que un conjunto de coordenadas estructurales determinadas mediante cristalografía de rayos X no se presenta sin error estándar. El Apéndice 1 muestra las coordenadas atómicas del IGF-1. Para los fines de esta invención, cualquier conjunto de coordenadas estructurales de IGF-1 que tenga una raíz de la desviación cuadrática media de átomos del esqueleto de proteínas equivalentes menor de 2 Å aproximadamente cuando se superponen -utilizando los átomos del esqueleto- sobre las coordenadas estructurales del Apéndice 1, serán consideradas idénticas. Preferiblemente, la desviación es menor de 1 Å aproximadamente y más preferiblemente menor de 0,5 Å aproximadamente.

El término “derivatización de átomos pesados” se refiere a un método para producir una forma modificada químicamente de un IGF-1 cristalizado. En la práctica, un cristal es impregnado con una solución que contiene sales de átomos de metales pesados, o compuestos organometálicos, por ejemplo cloruro de plomo, tiomolato de oro, timerosal o acetato de uranilo, que pueden difundir a través del cristal y unirse a la superficie de la proteína. La posición del(los) átomo(s) de metal(es) pesado(s) unido(s) puede ser determinada mediante análisis de difracción de rayos X del cristal impregnado. Esta información puede ser utilizada para generar la información de fases utilizada para construir la estructura tridimensional de la molécula.

El término “celda unidad” se refiere a un bloque modelado básico. El volumen completo de un cristal puede ser construido mediante el ensamblaje regular de tales bloques. Cada celda unidad comprende una representación completa de la unidad del patrón, cuya repetición constituye el cristal.

El término “grupo espacial” se refiere a la disposición de los elementos de simetría de un cristal.

El término “sustitución molecular” se refiere a un método que implica la creación de un modelo estructural preliminar de un cristal cuyas coordenadas estructurales se desconocen, mediante la orientación y la colocación de una molécula cuyas coordenadas estructurales son conocidas, por ejemplo las coordenadas de IGF-1 del Apéndice 1, dentro de la celda unidad del cristal desconocido, con el fin de explicar lo mejor posible el patrón de difracción de los cristales desconocidos observados. Las fases pueden ser posteriormente calculadas a partir de este modelo y combinadas con las amplitudes observadas para dar una síntesis de Fourier aproximada de la estructura cuyas coordenadas se desconocen. Ésta a su vez puede ser sometida a cualquiera de las varias formas de refinamiento para proporcionar una estructura final precisa del cristal desconocido. (Ver, por ejemplo, Lattman, E., “Use of the Rotation and Translation Functions”, *Methods in Enzymology*, 115: 55-77 (1985); Rossman, ed., “The Molecular Replacement Method”, *Int. Sci. Rev. Ser.* N° 13 (Gordon y Breach: New York, 1972)). Utilizando las coordenadas estructurales del IGF-1 proporcionadas por esta invención, puede utilizarse sustitución molecular para determinar las coordenadas estructurales de un co-complejo cristalino, de un ligando desconocido, de un mutante o un homólogo, o de una forma cristalina diferente del IGF-1. Adicionalmente, el cristal reivindicado y sus coordenadas pueden ser utilizados para determinar las coordenadas estructurales de una entidad química que se asocie con el IGF-1.

El término “entidad química” o “compuesto”, según se utiliza en la presente, significa cualquier molécula, complejo molecular, compuesto, peptidomimético o fragmento de los mismos, que no sea IGF-1. Preferiblemente, es una molécula con una elevada biodisponibilidad oral, tal como una molécula química orgánica o un péptido.

B. Modos para Llevar a Cabo la Invención

La siguiente descripción detallada de la invención incluye la estructura cristalina de IGF-1, métodos para producir un cristal de IGF-1 y métodos para utilizar un cristal de IGF-1 y sus coordenadas estructurales.

a. Estructura cristalina del IGF-1

La invención reivindicada proporciona cristales de IGF-1 así como la estructura del IGF-1 determinada a partir de los mismos. Específicamente, la invención reivindicada proporciona cristales de IGF-1 que tienen aproximadamente las dimensiones siguientes: $a = 31,831 \text{ Å}$, $b = 71,055 \text{ Å}$, $c = 65,995 \text{ Å}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90,000^\circ$. Tiene una simetría, o grupo espacial, de C222₁. La estructura de cintas del mismo está mostrada en la Figura 2 y tiene tres hélices, correspondiendo la región B N-terminal a los residuos 3-28, la región C a los residuos 29-34, un tramo de residuos mal ordenados desde el residuo 35 al 40, y la región A a los residuos 42-62. La región D (residuos 63-70) está esencialmente desordenada. Las Figuras 4 y 7 muestran que el detergente utilizado en la cristalización se une en una pequeña hendidura hidrofóbica en la base de la hélice B de la estructura. El IGF-1 puede formar un dímero en el cristal, según se muestra en la Fig. 5, en el cual las dos colas están situadas en la interfase del dímero. El área de la superficie enmascarada es de 689 Å^2 /monómero, que es de 1378 Å^2 en total. Los residuos importantes para la unión al IGF-1R se agrupan en la interfase dimérica, según se muestra en la Figura 6.

Las características del cristal de IGF-1 reivindicado se describen adicionalmente en el Ejemplo de la presente y las coordenadas estructurales del mismo están proporcionadas en el Apéndice 1.

b. *Métodos para producir un cristal de IGF-1*

En varias realizaciones, la invención reivindicada se refiere a métodos para preparar formas cristalinas de IGF-1 proporcionando primeramente una solución acuosa que contiene IGF-1. Una solución reservorio conteniendo un precipitante es mezclada posteriormente con un volumen de la solución de IGF-1 y el volumen mixto resultante es posteriormente cristalizado. En una etapa preferida, los cristales son disueltos y recristalizados de nuevo. Un ejemplo de un reactivo que puede ser utilizado para la recristalización es metil pentanodiol, que es el preferido. Los cristales son típicamente disueltos con este reactivo en una pequeña cantidad para minimizar los efectos de la dilución de los demás reactivos y se deja que vuelvan a crecer durante un periodo de tiempo. En una etapa opcional, el IGF-1 cristalino es aislado del volumen mixto. Preferiblemente, el IGF-1 es obtenido de una célula procariótica, más preferiblemente de una célula bacteriana, muy preferiblemente de *E. coli*. Preferiblemente, es secretado al periplasma y preparado según está descrito en la Patente de EE.UU. N° 5.723.310.

La concentración de IGF-1 en la solución acuosa puede variar, pero es preferiblemente de 1 a 50 mg/ml aproximadamente, más preferiblemente de 5 a 15 mg/ml aproximadamente. De manera similar, los precipitantes utilizados en la invención pueden variar, y pueden ser seleccionados de entre cualquier precipitante conocido en la técnica. Preferiblemente, el precipitante es seleccionado del grupo que consta de citrato de sodio, sulfato de amonio, polietilén glicol, cacodilato de sodio, o una mezcla de los mismos. Más preferiblemente, el precipitante es polietilén glicol tamponado con citrato de sodio o cacodilato de sodio. Puede utilizarse cualquier concentración de precipitante en la solución reservorio; sin embargo, se prefiere que la concentración sea del 20 al 25% aproximadamente si es polietilén glicol y de 1 a 10 M si es citrato de sodio, sulfato de amonio o cacodilato de sodio. Preferiblemente, la solución reservorio contiene además un detergente. Preferiblemente, el detergente está presente en una cantidad de 10 a 50 mM aproximadamente. También preferiblemente el detergente es N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina. El pH de la solución reservorio puede también variar, preferiblemente entre 4 y 10 aproximadamente, muy preferiblemente alrededor de 6,5.

Una persona con experiencia en la técnica comprenderá que cada uno de estos parámetros puede ser variado sin una experimentación excesiva y se seguirán obteniendo cristales aceptables. En la práctica, una vez que se han determinado los agentes precipitantes apropiados, los tampones apropiados u otras variables experimentales para cualquier método de crecimiento dado, puede utilizarse cualquiera de estos métodos o cualquier otro método para crecer los cristales reivindicados. Una persona experta en la técnica puede determinar las variables dependiendo de las necesidades particulares de cada uno.

Pueden utilizarse varios métodos de cristalización en la invención reivindicada, incluyendo cristalización por difusión de vapor, cristalización discontinua, cristalización por puente líquido o cristalización por diálisis. Se prefiere la cristalización por difusión de vapor. Ver, por ejemplo, McPherson y col., *Preparation and Analysis of Protein Crystals*, Glick, ed. (John Wiley & Co., 1982), pp.82-159; Jancarik y col., *J. Appl. Crystallogr.*, 24: 409-411 (1991).

En la cristalización por difusión de vapor, un pequeño volumen (esto es, unos pocos mililitros) de la solución de proteína es mezclado con una solución que contiene un precipitante. Este volumen mixto es suspendido sobre un pocillo que contiene una pequeña cantidad, esto es 1 ml aproximadamente, de precipitante. La difusión de vapor desde la gota hacia el pocillo tendrá como resultado la formación de un cristal en la gota.

El método de cristalización mediante diálisis utiliza una membrana de exclusión por tamaño semipermeable que retiene la proteína pero permite que moléculas pequeñas (esto es, tampones y precipitantes) difundan hacia dentro y hacia fuera. En la diálisis, más que concentrar la proteína y el precipitante por evaporación, se permite al precipitante difundir lentamente a través de la membrana y reducir la solubilidad de la proteína mientras que se mantiene la concentración de proteína fija.

Los métodos discontinuos implican generalmente la adición lenta de un precipitante a una solución acuosa de proteína hasta que la solución se enturbia; en este punto el recipiente puede ser cerrado y se deja sin tocar durante un periodo de tiempo hasta que tiene lugar la cristalización.

Por tanto, los solicitantes tienen la intención de que la invención reivindicada incluya cualquiera de, y todos, los métodos de cristalización. Una persona experta en la técnica puede elegir cualquiera de tales métodos y variar los parámetros de tal manera que el método elegido tenga como resultado los cristales deseados.

El método de cristalización más preferido implica el método en el cual el IGF-1, después de su aislamiento de la célula y la formulación en, por ejemplo, tampón acetato, citrato o succinato, según está descrito en, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.681.814 y WO 99/51272, es opcionalmente desalado si es necesario a un pH de 4-5 aproximadamente, preferiblemente de 4,5 aproximadamente, para formar una solución acuosa. Posteriormente, una gotita de la solución acuosa es mezcla con polietilén glicol al 24% aproximadamente tamponado a pH 6,5 aproximadamente con citrato de sodio 0,1 M aproximadamente o con cacodilato de sodio 0,1 M aproximadamente y con 1 μ l aproximadamente de N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina 1,4 mM aproximadamente como detergente. Esta solución es equilibrada posteriormente mediante cristalización por difusión de vapor con 1 ml aproximadamente de polietilén glicol al 24% aproximadamente tamponado a pH 6,5 aproximadamente con citrato de sodio 0,1 M aproximadamente

o con cacodilato de sodio 0,1 M aproximadamente hasta que se forman las gotitas de cristalización, normalmente de 4 a 5 días aproximadamente. Posteriormente, se añaden a las gotitas de cristalización 2 μ l aproximadamente de metil pentanodiol al 100% aproximadamente para disolver los cristales durante una noche y formar de este modo nuevos cristales, normalmente en una semana.

La estructura cristalina fue determinada mediante dispersión anómala combinada de iones azufre intrínsecos y de un ión bromuro fortuito según se discute con detalle en el Ejemplo posterior.

c. Métodos para utilizar un cristal de IGF-1 y sus coordenadas

El IGF-1 cristalino de la presente puede ser utilizado para varios fines. Por ejemplo, el propio proceso de cristalización purifica adicionalmente el IGF-1 hasta la homogeneidad. Por tanto, uno de tales fines es proporcionar un IGF-1 altamente purificado que puede ser utilizado como estándar o control en un ensayo de diagnóstico, por ejemplo como marcador de peso molecular, o como control en un ensayo de ELISA, en un radioensayo o en un ensayo de radiorreceptores. Además, el IGF-1 cristalino es estable a temperatura ambiente, puede ser liofilizado fácilmente y es menos apto para degradarse que composiciones menos puras.

En otra utilización de la invención de la presente, cristales de IGF-1 de un tamaño y calidad que permitan la realización de estudios de difracción de rayos X permiten a los expertos en la técnica llevar a cabo estudios relacionados con las propiedades de unión del IGF-1, así como con las propiedades de unión de las IGFBPs, los receptores de IGF-1 y las ALS que se asocian con el IGF-1.

Además, la información estructural derivada de una estructura cristalina de un péptido puede ser utilizada para la identificación de entidades químicas, por ejemplo de pequeñas moléculas orgánicas y bioorgánicas tales como peptidomiméticos y moléculas orgánicas sintéticas que se unen a IGF-1 y preferiblemente bloquean o impiden un proceso o acontecimiento mediado por, o asociado con IGF-1, o que actúan como agonistas del IGF-1. Un abordaje ejemplar de tal diseño de compuestos basado en la estructura está descrito en *Structure Based Drug Design*, Pandi Veerapandian, ed. (Marcell Dekker: New York 1997).

A manera de ejemplo, habiendo determinado la estructura tridimensional del IGF-1, el técnico experto construye un modelo del IGF-1 tal como los representados en las Figuras 2 y 5. Como cada átomo de un péptido o polipéptido puede ser representado como una esfera con el radio de van der Waals apropiado, puede construirse un mapa detallado de la superficie del IGF-1 plegado. La superficie que resulta es conocida como superficie de van der Waals. La "superficie accesible al solvente" es la superficie que es accesible a una sonda química, una molécula de agua en la presente, y es construida haciendo rodar una molécula de agua del radio apropiado sobre la parte externa del péptido manteniendo contacto con la superficie de van der Waals. Aquellas partes de la superficie de van der Waals que contactan con la superficie de la molécula de agua definen una superficie continua conocida como "superficie accesible al solvente". (Creighton, Thomas E., *Proteins: structure and molecular properties*, 2ª ed. (W.H. Freeman and Company, 1984), pp. 227-229).

Tales entidades químicas que presentan una superficie accesible al solvente que remeda la superficie accesible al solvente del IGF-1 pueden ser construidas por los expertos en la técnica. A manera de ejemplo, el técnico experto puede buscar en bases de datos de estructuras tridimensionales de compuestos para identificar aquellos compuestos que dispongan grupos funcionales apropiados en un orden estructural tridimensional similar, construir posteriormente bibliotecas de química combinatoria alrededor de tales entidades químicas para identificar aquellas que tengan una alta afinidad.

Un procedimiento facilitado por esta invención es la utilización de las coordenadas estructurales del IGF-1 para diseñar entidades químicas que se unan a, o se asocien con, IGF-1 y alteren las propiedades físicas de las entidades químicas de diferentes formas. Por tanto, propiedades tales como, por ejemplo, solubilidad, afinidad, especificidad, potencia, tasas de todo o nada u otras características de la unión pueden ser todas ellas alteradas y/o maximizadas.

Pueden diseñarse entidades químicas deseadas sondando un cristal de IGF-1 con una biblioteca de entidades diferentes con el fin de determinar los sitios óptimos para la interacción entre entidades químicas candidato e IGF-1. Por ejemplo, los datos de difracción de rayos X de alta resolución recogidos a partir de cristales saturados con solvente permiten la determinación del lugar en el que se adhiere cada tipo de molécula de solvente. Moléculas pequeñas que se unen estrechamente a esos sitios pueden ser posteriormente diseñadas y sintetizadas y analizadas para determinar la actividad deseada. Una vez que se ha obtenido la actividad deseada, las moléculas pueden ser alteradas adicionalmente para maximizar las propiedades deseables.

La invención contempla también el cribado computacional de bases de datos de moléculas pequeñas o el diseño de entidades químicas que se unan totalmente o en parte al IGF-1. Pueden ser también utilizadas para resolver la estructura cristalina de mutantes, co-complejos o la forma cristalina de cualquier molécula homóloga a, o capaz de asociarse con, al menos una porción del IGF-1.

Un método que puede ser empleado para este fin es la sustitución molecular. Una estructura cristalina desconocida, que puede ser cualquier estructura desconocida tal como, por ejemplo, otra forma cristalina del IGF-1, un mutante o péptido del IGF-1 o un co-complejo con IGF-1, o cualquier otro cristal desconocido de una entidad química que

se asocie con IGF-1 que sea de interés, puede ser determinada utilizando las coordenadas estructurales presentadas en el Apéndice 1. Los co-complejos con IGF-1 pueden incluir, pero no se limitan a, IGF-1-IGFBP-3, IGF-IGFBP-3-ALS, IGF-1-receptor, IGF-1-péptido o IGF-1-molécula pequeña. Este método proporcionará una forma estructural precisa del cristal desconocido mucho más rápidamente y eficazmente que si se intenta determinar tal información sin la invención de la presente.

La información obtenida puede ser por tanto utilizada para obtener inhibidores o agonistas del IGF-1 máximamente eficaces. El diseño de entidades químicas que inhiban o sean agonistas del IGF-1 implica generalmente la consideración de al menos dos factores. En primer lugar, la entidad química debe ser capaz de asociarse físicamente o estructuralmente con el IGF-1. La asociación puede ser cualquier asociación física, estructural o química tal como, por ejemplo, la formación de enlaces covalentes o no covalentes o interacciones de van der Waals, hidrofóbicas o electrostáticas.

En segundo lugar, la entidad química debe ser capaz de asumir una conformación que permita a la misma asociarse con el IGF-1. Aunque no todas las porciones de la entidad química participarán necesariamente en la asociación con IGF-1, las porciones no participantes pueden sin embargo influir sobre la conformación global de la molécula. Esto a su vez puede tener un impacto significativo sobre la deseabilidad de la entidad química. Tales requisitos conformacionales incluyen la estructura tridimensional global y la orientación de la entidad química en relación con todo o con una porción del sitio de unión.

El efecto inhibidor o de unión potencial de una entidad química sobre IGF-1 puede ser analizado antes de su síntesis y análisis real mediante la utilización de técnicas de modelado mediante ordenador. Si la estructura teórica de una entidad química dada sugiere una interacción y una asociación insuficientes entre la misma y el IGF-1, se obvia la necesidad de sintetizar y analizar la entidad química. Sin embargo, si el modelado por ordenador indica una potente interacción, la molécula puede ser entonces sintetizada y analizada para determinar su capacidad para unirse al IGF-1. De este modo, puede evitarse la síntesis cara y larga de compuestos que no sean operativos.

Un compuesto inhibidor u otro compuesto que se una al IGF-1 puede ser evaluado y diseñado computacionalmente por medio de una serie de etapas en las cuales las entidades químicas o fragmentos son cribados y seleccionados por su capacidad para asociarse con los sitios de unión individuales del IGF-1.

Por tanto, una persona experta en la técnica puede utilizar uno de varios métodos para someter a cribado entidades químicas o fragmentos por su capacidad para asociarse con IGF-1. Este proceso puede comenzar por la inspección visual de, por ejemplo, el sitio de unión en una pantalla de ordenador sobre la base de las coordenadas del IGF-1 presentadas en el Apéndice 1. Los fragmentos o las entidades químicas seleccionadas pueden ser luego colocados en una variedad de orientaciones, o "acoplados", en un bolsillo de unión individual del IGF-1. El acoplamiento puede ser realizado utilizando un programa de ordenador tal como Quanta y Sybyl, seguido por minimización de la energía y dinámica molecular con campos de fuerza estándar de mecánica molecular tales como CHARMM y AMBER.

Programas de ordenador especializados pueden ser de utilidad para seleccionar fragmentos o entidades químicas interesantes. Estos programas incluyen, por ejemplo, GRID, disponible en la Oxford University, Oxford, R.U.; MCSS o CATALYST, disponibles en Molecular Simulations, Burlington, MA; AUTODOCK, disponible en Scripps Research Institute, La Jolla, CA; DOCK, disponible en la University of California, San Francisco, CA y XSITE, disponible en la University College of London, R.U.

Una vez que se han seleccionado entidades químicas o fragmentos adecuados, pueden ser ensamblados para dar lugar a un inhibidor o a un agonista. El ensamblaje puede ser mediante inspección visual de la relación de los fragmentos entre sí sobre la imagen tridimensional mostrada en una pantalla de ordenador, en relación con las coordenadas estructurales descritas en la presente.

Alternativamente, pueden diseñarse las entidades químicas *de novo*, experimentalmente, utilizando un sitio de unión vacío u opcionalmente incluyendo una porción de una molécula con la actividad deseada. Así, por ejemplo, pueden utilizarse técnicas de selección en fase sólida en las que IGF-1 o un fragmento del mismo, o entidades químicas candidato para ser evaluadas, son fijados a una fase sólida, identificando de este modo potenciales agentes que se unen para un estudio posterior.

Básicamente, puede emplearse cualquier técnica de modelado molecular de acuerdo con la invención; estas técnicas son conocidas o están fácilmente disponibles para los expertos en la técnica. Se comprenderá que los métodos y composiciones descritos en la presente pueden ser utilizados para identificar, diseñar o caracterizar no sólo entidades que se asocien o se unan a IGF-1, sino también, alternativamente, para identificar, diseñar o caracterizar entidades que, igual que el IGF-1, se unirán al receptor, alterando de este modo la interacción IGF-1-receptor. La invención reivindicada tiene la intención de incluir estos métodos y composiciones en general.

Una vez que un compuesto ha sido diseñado o seleccionado mediante los métodos anteriores, la eficacia con la cual ese compuesto puede unirse al IGF-1 puede ser analizada y modificada para obtener la(s) característica(s) deseada(s) máxima(s) utilizando evaluación computacional o experimental. Varios parámetros pueden ser maximizados dependiendo del resultado deseado. Éstos incluyen, pero no se limitan a, especificidad, afinidad, tasas de todo o nada, hidrofobicidad, solubilidad y otras características fácilmente identificables por el técnico experto.

Adicionalmente, la invención es útil para la producción de fármacos de molécula pequeña candidatos. De este modo, las estructuras cristalinas reivindicadas pueden ser utilizadas también para obtener información sobre las estructuras cristalinas de complejos del IGF-1 e inhibidores de molécula pequeña. Por ejemplo, si el inhibidor de molécula pequeña es cocrystalizado con IGF-1, la estructura cristalina del complejo puede ser posteriormente resuelta mediante sustitución molecular utilizando las coordenadas conocidas del IGF-1 para el cálculo de fases. Tal información es útil, por ejemplo, para determinar la naturaleza de la interacción entre el IGF-1 y el inhibidor de molécula pequeña, y por tanto puede sugerir modificaciones que mejorarían las características de unión tales como la afinidad, la especificidad y la cinética.

d. Otros métodos

La invención de la presente es también útil para proporcionar un método de identificación de agonistas indirectos del IGF-1 basado en las propiedades inhibitorias de la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina con respecto a las IGFBPs. Este método comprende las etapas de: comparación de la capacidad de la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina para inhibir la unión de IGFBP-1 o -3 al IGF-1 con la capacidad de un agonista indirecto del IGF-1 candidato para inhibir tal unión; y la determinación de si el agonista indirecto del IGF-1 candidato puede inhibir tal unión al menos igual de bien que la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina puede inhibir la unión.

Preferiblemente, la comparación se lleva a cabo mediante un ensayo de competición entre la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina y el agonista indirecto del IGF-1 candidato, utilizando la CI_{50} con el fin de medir la capacidad para inhibir la unión de IGFBP. En una realización más preferida, la inhibición de la unión es medida preincubando N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina o la molécula del agonista candidato con IGF-1 expresado en partículas de bacteriófago y midiendo la unión residual de IGF-1 a IGFBP-1 o a IGFBP-3 en un ensayo en placas tal como un ELISA.

Se describe un método para identificar agonistas indirectos del IGF-1 que comprende la cocrystalización del agonista candidato con IGF-1 para formar una estructura cocrystalina y la determinación de si la molécula del agonista candidato se une a uno o a los dos parches sobre el IGF-1. El primer parche contiene los residuos de aminoácidos Glu 3, Thr 4, Leu 5, Asp 12, Ala 13, Phe 16, Val 17, Cys 47, Ser 51, Cys 52, Asp 53, Leu 54 y Leu 57, y el segundo parche contiene los residuos de aminoácidos Val 11, Gln 15, Phe 23, Phe 25, Asn 26, Val 44, Phe 49 y Arg 55. Para los fines de la presente, unión significa que existe al menos un contacto entre cada uno de los residuos de aminoácidos enumerados de un parche dado y la molécula del agonista candidato que es menor o igual que 6 angstroms en la estructura cocrystalina. Tal molécula de agonista candidato tendrá la propiedad de inhibir la unión de IGFBP-1 o IGFBP-3 al IGF-1. La molécula de tal agonista candidato preferida inhibirá la unión de IGFBP-1 o -3 al IGF-1 al menos tan bien como la hace la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina. Es más preferido el método en el que la inhibición de la unión es medida utilizando un ensayo de competición entre la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina y la molécula del agonista candidato. El método más preferido de todos es aquél en el que la inhibición de la unión es medida preincubando la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina o la molécula del agonista candidato con IGF-1 expresado en partículas de bacteriófago y midiendo la unión residual del IGF-1 a IGFBP-1 o a IGFBP-3 en un ensayo de ELISA en placas.

El detergente N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina de la presente puede ser utilizado como molde para realizar el diseño de fármacos de molécula pequeña que produzcan el mismo efecto que el detergente (que compitan con el IGF-1 por la unión a IGFBP y alteren posteriormente la interacción de la IGFBP con IGF-1 para liberar IGF-1 *in situ*, de tal manera que sea activo e interaccione con el receptor. Al contrario que los demás detergentes ensayados en los Ejemplos posteriores, la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina carece de un átomo de oxígeno en la posición C10. Esta región del detergente está en estrecho contacto con los átomos de la cadena lateral de los residuos Leu 5, Leu 54 y Leu 57 del IGF-1. Moléculas con este mismo tipo de conformación funcionarían como agonistas indirectos del IGF-1.

El agonista indirecto así identificado puede ser utilizado en un método para tratar un trastorno de agonista en el que una cantidad eficaz del agonista indirecto del IGF-1 es administrada a un mamífero con tal trastorno. Por tanto, tal agonista puede ser utilizado terapéuticamente en una preparación farmacéutica, por ejemplo en ensayos clínicos, o comercializado para los trastornos de agonista definidos en la presente. De este modo, la formulación del agonista indirecto de la presente puede ser utilizada para tratar cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con IGF-1 incluyendo, por ejemplo, diabetes, trastornos renales crónicos y agudos tales como la insuficiencia renal crónica, necrosis, etc., obesidad, hiperinsulinemia, insuficiencia de GH, síndrome de Turner, estatura baja, los síntomas indeseables asociados con el envejecimiento tales como el incremento de la proporción masa magra respecto a grasa, inmunodeficiencias incluyendo el recuento incrementado de CD4 y la tolerancia inmune incrementada, estados catabólicos asociados con el desgaste, etc., el enanismo de Laron, la resistencia a insulina, etcétera.

Para uso terapéutico, la composición del agonista indirecto de la presente puede ser administrada directamente al mamífero mediante cualquier técnica adecuada incluyendo oralmente, parenteralmente, intranasalmente o intrapulmonariamente, y puede ser administrada localmente o sistémicamente. La vía de administración específica dependerá de, por ejemplo, la historia médica del paciente, incluyendo cualquier efecto colateral o reducido percibido o anticipado utilizando IGF-1, y del trastorno a tratar. Ejemplos de administración parenteral incluyen la administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial e intraperitoneal. Muy preferiblemente, la administración es por infusión continua (utilizando, por ejemplo, minibombas tales como bombas osmóticas), o mediante inyección (utilizando, por

ejemplo, medios intravenosos o subcutáneos). La administración puede ser también como un único bolus o mediante una formulación de depósito de liberación lenta. Muy preferiblemente, el agonista directo es administrado oralmente o mediante infusión o inyección a una frecuencia de, preferiblemente, la mitad, una vez, dos veces o tres veces al día, muy preferiblemente diariamente.

La composición del agonista para ser utilizada en terapia será formulada y dosificada de una forma consistente con la buena práctica médica, teniendo en consideración la condición clínica del paciente individual (especialmente los efectos colaterales del tratamiento con el agonista), el lugar de administración de la composición del agonista, el método de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los médicos clínicos. La "cantidad eficaz" del agonista para los fines de la presente es por tanto determinada mediante tales consideraciones y debe ser una cantidad que trate el trastorno en cuestión.

Como una proposición general, la cantidad total farmacéuticamente eficaz del agonista administrada parenteralmente por dosis estará en el rango de 1 $\mu\text{g/kg/día}$ aproximadamente hasta 100 mg/kg/día aproximadamente, preferiblemente de 10 $\mu\text{g/kg/día}$ hasta 10 mg/kg/día aproximadamente. Si es administrado continuamente, el agonista es administrado generalmente en dosis de 1 $\mu\text{g/kg/hora}$ aproximadamente hasta 100 $\mu\text{g/kg/hora}$ aproximadamente, ya sea mediante 1-4 inyecciones por día aproximadamente o mediante infusiones subcutáneas continuas utilizando, por ejemplo, una minibomba o una bomba de infusión portátil. Puede emplearse también una solución en una bolsa intravenosa. El factor clave en la selección de una dosis apropiada es el resultado obtenido medido mediante criterios que son considerados apropiados por el médico asistente. Si el agonista es administrado junto con insulina, esta última es utilizada en menores cantidades que si fuera utilizada sola, reduciéndola hasta cantidades que por sí mismas tienen poco efecto sobre la glucosa sanguínea, esto es en cantidades de entre 0,1 UI/kg/24 horas aproximadamente hasta 0,5 UI/kg/24 horas aproximadamente.

Para la administración parenteral, en una realización, el agonista es formulado generalmente mezclando el mismo con el grado de pureza deseado en una forma inyectable de dosificación unidad (solución, suspensión o emulsión), con un vehículo farmacéuticamente aceptable, esto es uno que no sea tóxico para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas y que sea compatible con otros ingredientes de la formulación. Por ejemplo, la formulación preferiblemente no incluye agentes oxidantes y otros compuestos que se sabe que son nocivos para los polipéptidos.

Generalmente, la formulación es preparada poniendo en contacto el agonista uniformemente e íntimamente con un vehículo líquido o con un vehículo sólido finamente dividido o con ambos. Preferiblemente, el vehículo es un vehículo parenteral, más preferiblemente una solución que sea isotónica con la sangre del receptor. Ejemplos de tales vehículos transportadores incluyen agua, solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. Vehículos no acuosos tales como aceites fijados y oleato de etilo son también útiles en la presente, al igual que los liposomas.

El vehículo contiene idóneamente pequeñas cantidades de aditivos tales como sustancias que incrementan la isotonicidad y la estabilidad química. Tales materiales no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, succinato, ácido acético y otros ácidos orgánicos o sus sales; antioxidantes tales como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de diez residuos aproximadamente), por ejemplo poliarginina o tripéptidos; proteínas tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; glicina; aminoácidos tales como ácido glutámico, ácido aspártico o arginina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo celulosa o sus derivados, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones tales como sodio; surfactantes no iónicos tales como polisorbatos, poloxámeros o PEG; y/o sales neutras, por ejemplo, NaCl, KCl, MgCl_2 , CaCl_2 , etc.

El agonista es típicamente formulado individualmente en tales vehículos a una concentración de 0,1 mg/ml a 100 mg/ml aproximadamente, preferiblemente de 1 a 10 mg/ml , a un pH de 4,5 a 8 aproximadamente. La formulación final, si es un líquido, es almacenada preferiblemente a una temperatura de 2-8°C aproximadamente hasta cuatro semanas aproximadamente. Alternativamente, la formulación puede ser liofilizada y suministrada como un polvo para ser reconstituido con agua para inyección que es almacenada según se describió para la formulación líquida.

El agonista que va ser utilizado para administración terapéutica debe ser estéril. La esterilidad es fácilmente conseguida mediante filtración a través de membranas de filtración estériles (por ejemplo, membranas de 0,2 micras). Las composiciones del agonista terapéutico son colocadas generalmente en un recipiente que tiene una entrada de acceso estéril, por ejemplo en una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica.

El agonista será normalmente almacenado en recipientes de dosis unidad o multidosis, por ejemplo en ampollas o viales cerrados herméticamente, como una solución acuosa o como una formulación liofilizada para ser reconstituida.

La invención se comprenderá mucho mejor mediante referencia a los ejemplos siguientes. Los mismos no deben ser considerados, sin embargo, como limitantes del ámbito de la invención. Las descripciones de todas las citas de literatura y de patentes mencionadas en la presente son incorporadas expresamente por referencia.

Ejemplo 1

*Cristalización y Caracterización de los Cristales de IGF-1*5 *Cristalización de IGF-1 y recogida de datos*

Se obtuvo IGF-1 humano recombinante (rhIGF-1) según está descrito en los Ejemplos de la Patente de EE.UU. N° 5.723.310 utilizando una combinación de polímero/sal para la especie formadora de fases y se formuló según está descrito en los Ejemplos de la Patente de EE.UU. N° 5.681.814 (acetato, NaCl, polisorbato 20 y alcohol bencílico) y se colocó en un vial conteniendo 7 ml de 10 mg/ml de rhIGF-1. Fue desalado en NaCl 0,15 M, NaOAc 20 mM, pH 4,5, y diluido hasta una concentración final de 10 mg/ml. Una gotita de 4 μ l de la solución de IGF-1 fue mezclada con 5 μ l de la solución reservorio (polietilén glicol 3350 al 24% tamponado a pH 6,5 con cacodilato de sodio 0,1 M) y 1 μ l de N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina 14 mM, que se obtiene en un kit de reactivos CRYSTAL SCREEN™ utilizado para cribados de condiciones de cristalización y que está disponible en Hampton Research, Laguna Nigel, CA. Esta solución se dejó equilibrar mediante difusión de vapor (Jancarik y col., *supra*) con 1 ml de solución reservorio. Así, una gota de la mezcla fue suspendida bajo un cubreobjetos de plástico sobre la solución reservorio. Pequeños cristales con una morfología delgada, similar a una placa, aparecieron en 4-5 días. En este punto, se añadieron a la gotita de cristalización 2 μ l de metil pentanodiol (MPD) al 100% (hasta una concentración final del 20%) y los cristales se disolvieron durante una noche. En una semana, reaparecieron los cristales y crecieron hasta dimensiones finales de 0,2 mm X 0,1 mm X 0,05 mm con aristas notablemente más afiladas. Estos cristales fueron utilizados para todos los análisis posteriores.

Los expertos en la técnica apreciarán que las condiciones de cristalización anteriormente mencionadas pueden variarse. Variando las condiciones de cristalización pueden obtenerse otras formas cristalinas del IGF-1. Tales variaciones pueden ser utilizadas solas o en combinación e incluyen, por ejemplo, la variación de las concentraciones de proteína finales entre 5 y 35 mg/ml aproximadamente; la variación de la proporción de IGF-1 respecto al precipitante, la variación de las concentraciones del precipitante de entre el 20 y el 30% aproximadamente para polietilén glicol, la variación de los rangos de pH entre 5,5 y 7,5 aproximadamente, la variación de la concentración o del tipo de detergente, la variación de la temperatura entre -5 y 30°C aproximadamente y la cristalización del IGF-1 por el método discontinuo, de puente líquido o de diálisis utilizando las condiciones o variaciones de los mismos anteriores. Ver McPherson y col. (1982), *supra*.

Caracterización de los cristales de IGF-1

Un cristal individual fue transferido desde el líquido madre a una solución crioprotectora que constaba de polietilén glicol 3350 al 25% (p/v), MPD al 30%, cacodilato de sodio 0,2 M pH 6,5, N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina 2,8 mM y NaBr 1 M. La difracción fue a 1,8 Å. Después de 30 segundos en esta solución, los cristales fueron enfriados instantáneamente sumergiendo la solución en nitrógeno líquido. La técnica de congelar los cristales inmoviliza esencialmente los mismos y produce un conjunto de datos de mucha mayor calidad. Todas las manipulaciones posteriores y la recogida de datos de rayos X se realizaron a 100° Kelvin.

Se recogió un conjunto de datos de MAD a 4 longitudes de onda en una línea de haz 9-2 en el Stanford Synchrotron Radiation Laboratory, fijándose el orden de los datos según sigue: pico del Br (λ_1), remoto de baja energía (λ_2), inflexión del Br (λ_3) y remoto de alta energía (λ_4). Los puntos del pico y la inflexión del Br fueron estimados a partir de barridos de fluorescencia del cristal, y se eligió que el remoto de baja energía fuera de 1,54 angstroms, para maximizar la pequeña señal anómala del azufre a esta longitud de onda a la vez que se minimizaban los efectos de la absorción. No se utilizó geometría del haz inverso. La reducción de datos se llevó a cabo utilizando Denzo y Scalepack (Otwinowski y Minor, *Methods in Enzymology*, 276: 307-326 (1997)). Con el fin de determinar los factores de escala y *B* más precisos posibles, los datos para las cuatro longitudes de onda fueron inicialmente escalados juntos, asumiendo que no había señal anómala. Los factores de escala y *B* determinados a partir de este proceso de escalado fueron posteriormente aplicados a cada uno de los cuatro conjuntos de datos.

Los cristales pertenecen al grupo espacial C222₁ con las constantes de celda unidad $a = 31,83 \text{ Å}$, $b = 71,06 \text{ Å}$, $c = 66,00 \text{ Å}$ y $\alpha=\beta=\gamma= 90,000^\circ$. La unidad asimétrica de los cristales contenía un monómero de IGF-1 unido a una única molécula de detergente, dando lugar a un coeficiente de Matthew de $2,4 \text{ Å}^3/\text{Da}$, o un 48,1% de solvente. El contenido de solvente de los cristales era del 55% aproximadamente.

Determinación de la estructura

Los intentos iniciales para determinar la estructura del IGF-1 mediante sustitución molecular, utilizando los modelos disponibles de RMN del IGF-1 o la estructura cristalina de la insulina, no tuvieron éxito. Por esta razón, la estructura fue determinada de novo mediante dispersión anómala a múltiples longitudes de onda (MAD) del Br (Dauter y col., *Acta Crystallogr.*, D56: 232-237 (2000)).

Las coordenadas del único bromuro unido fueron determinadas mediante inspección manual de los mapas de Patterson de la diferencia anómala y dispersiva. La ambigüedad de lados fue resuelta mediante refinamiento de las fases utilizando el programa SHARP (De La Fortelle y Bricogne, *Methods in Enzymology*, 276: 472-494 (1997)) de

Global Phasing Limited, 43 Newton Road, Cambridge CB2 2AL, INGLATERRA, seguido por el examen de mapas de Fourier de las diferencias anómalas calculados utilizando las diferencias de Bijvoet de λ_2 . Un grupo de seis picos para un lado de las coordenadas del Br era consistente con la estructura del disulfuro de la insulina (código PDB: IZNI). Estos seis picos corresponden a los seis átomos de S _{γ} de Cys del IGF-1; un séptimo azufre (S δ de Met 59) no fue nunca detectado en los mapas de Fourier de diferencias anómalas, debido presumiblemente a su factor de temperatura más elevado (36,7 Å²). En este punto, las seis posiciones del S _{γ} de Cys fueron incluidas en el refinamiento de fases, utilizándose como referencia el conjunto de datos de λ_1 . Mediante el refinamiento de fases, la f'' del Br fue refinada para el conjunto de datos de λ_1 , f' y f'' fueron refinadas para λ_3 y ambas fueron mantenidas fijas para los conjuntos de datos de λ_2 y λ_4 ; los valores de f'' y f' para el azufre se mantuvieron fijados en los valores teóricos para cada longitud de onda. La pequeña señal anómala procedente de los átomos de azufre tuvo un efecto modesto sobre la estadística de las fases, pero los mapas de densidad electrónica resultantes mostraron una conectividad mejorada, especialmente en las regiones peores ordenadas del IGF-1.

La modificación de la densidad (achatación del solvente y creación de mapas histogramas) fue realizada utilizando DM (Collaborative Computational Project Número 4, *Acta Crystallogr.*, D50: 760-763 (1994); Cowtan, *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography*, 31: 34-38 (1994)) y los mapas de densidad electrónica resultantes eran de alta calidad. Un 50% aproximadamente de la estructura, correspondiente a las tres regiones helicoidales del IGF-1, fue construido directamente en los mapas de densidad electrónica experimentales utilizando los programas O (Jones y col., *Acta Crystallogr.*, A47: 110-119 (1991)) y QUANTA (versión 97.0, MSI, San Diego, CA). Varios ciclos de combinación de fases utilizando Sigmaa (Collaborative Computational Project Número 4, *supra*; Read, *Acta Crystallogr.*, A42: 140-149 (1986)) permitieron modelar el resto de la molécula. El refinamiento posicional atómico y del factor B restringido utilizó la función diana de máxima probabilidad del CNX (Brünger y col., *Acta Crystallogr.*, D54: 905-921 (1998) y MSI, San Diego, CA), acoplada con una corrección del solvente puro de tipo "máscara" y el escalado del factor B total anisotrópico.

El modelo final contiene los residuos 3-34 y 41-64 del IGF-1, una molécula de N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina, un Br y 50 moléculas de agua. El modelo fue refinado frente al conjunto de datos de λ_3 , ya que la estadística de los datos demostró que este grupo de datos era de mayor calidad que los demás. Todos los datos de una resolución de 20 a 1,8 angstroms fueron incluidos en el refinamiento, sin aplicar un corte sigma. Las asignaciones de estructura secundarias fueron realizadas con el programa PROMOTIF (Hutchinson y Thornton, *Protein Science*, 5: 212-220 (1996)).

Mientras que las posiciones bien ordenadas del IGF-1 eran esencialmente idénticas utilizando los dos conjuntos de fases, las regiones más flexibles de la molécula mostraron una conectividad enormemente mejorada tras la inclusión de los azufres en la determinación de fases. Los mapas experimentales de densidad electrónica que mostraban la región del giro del IGF-1 inmediatamente después de la primera hélice (residuos 19, 20 y 21) indican que la utilización de las fases combinadas de Br y S tenía como resultado un mapa mucho mejor conectado que la utilización únicamente de las fases de Br solo. En este punto, mediante la utilización de las fases de Br + S, pudo trazarse un 50% aproximadamente de la molécula directamente en los mapas experimentales.

Descripción de la estructura

Después de varios ciclos de construcción de modelos y de combinación de fases, el modelo final, mostrado en la Figura 2, contiene los residuos 3-34 y 41-64 del IGF-1, una única molécula de detergente unida y 46 moléculas de agua. El factor R para 1,8 Å es del 23,7% y el factor R libre es del 26,9%, con una buena estereoquímica. La región B N-terminal corresponde a los residuos 3-28, la región C a los residuos 29-34, un tramo de residuos mal ordenados desde el residuo 35 al 40 y la región A del 42 al 62. La región D (63-70) está esencialmente desordenada.

La estructura del IGF-1 es similar a la de la insulina (ver la Figura 3), con una Raíz de la Desviación Cuadrática Media (RMSD) de 3 Å sobre los átomos del esqueleto que están conservados entre las dos moléculas. La mayoría de estas desviaciones tienen lugar en las regiones flexibles y, cuando se consideran únicamente las regiones helicoidales, la RMSD entre los átomos de carbono alfa es de 0,47 Å aproximadamente. La principal diferencia es la extensión de la región C, para la que no hay equivalente en la insulina madura, lejos del cuerpo de la molécula. Este bucle contiene muchos de los residuos que se sabe que son importantes para la unión al receptor.

Un extenso estudio de mutagénesis por barrido de alanina del IGF-1 ha mostrado qué residuos son importantes para la unión a IGFBP-1 e IGFBP-3 (Dubaque y Lowman, *supra*). Los residuos que se unen a IGFBP-3 son similares a los que se unen a IGFBP-1, aunque se cree que IGFBP-3 depende más de interacciones con el esqueleto y es afectada menos gravemente por las mutaciones de alanina. No hay ninguna mancha dramática en el lugar en el que los residuos importantes para la unión de IGFBP-1 e IGFBP-3 se agrupan, y mutaciones que disminuyen la unión están dispersas por toda la molécula. Parece haber un ligero agrupamiento de sitios en el extremo N, siendo muchos de estos sitios intrínsecamente hidrofóbicos.

Según se muestra en las Figuras 4 y 7, la molécula de detergente se une en una pequeña hendidura hidrofóbica en la base de la hélice B. Hay varios contactos directos de cadenas laterales de los residuos 5, 7 y 10 con el detergente. A pesar del solapamiento del sitio de unión del detergente con una porción del epítopo que se une a IGFBP-1/IGFBP-3, los resultados preliminares sugieren, sin limitarse a ninguna teoría, que el detergente no inhibe la unión de estas

proteínas al IGF-1. La cara opuesta del detergente está produciendo un contacto de simetría con la cara opuesta del IGF-1.

Según se muestra en la Figura 5, hay solamente un contacto de empaquetado del cristal grande entre moléculas de IGF-1 con simetría relacionada, el cual tiene como resultado un homodímero simétrico. El área de la superficie enmascarada es de 1378 \AA^2 , que está en el rango de las interfases proteína-proteína fisiológicamente relevantes.

La Figura 6 muestra que los residuos que se sabe que son importantes para la unión al receptor se agrupan en esta interfase dimérica. Se muestran Tyr 24, Thr 29, Tyr 31 y Tyr 60. La mutación de estos residuos tiene como resultado una pérdida de afinidad por el receptor de 6-20X para las mutaciones individuales, o una pérdida de la afinidad de 240->1200X para las mutaciones dobles. Se muestran también Phe 23 y Phe 25, que son intercambiables con Phe 24 y Tyr 26 de la insulina, sin pérdida de afinidad.

Descripción adicional de la estructura

El IGF-1 está compuesto principalmente por tres segmentos helicoidales correspondientes a la hélice B (residuos 7-18 del IGF-1) y a las dos hélices A (residuos 43-47 y 54-58 del IGF-1) de la insulina. El núcleo central hidrofóbico es esencialmente idéntico al descrito para las estructuras de RMN del IGF-1, incluyendo los tres enlaces disulfuro entre Cys 6 y Cys 48, Cys 18 y Cys 61 y Cys 47 y Cys 52, según se indicó en las referencias anteriores. Los residuos 3 a 6 no forman ninguna estructura secundaria regular y por tanto la estructura descrita en la presente puede ser clasificada como muy similar a la forma T de la insulina (Derewenda y col., *Nature*, 338: 594-596 (1989)); en efecto, cuando se superponen IGF-1 y la forma T de la insulina sobre las posiciones $C\alpha$ de sus segmentos helicoidales respectivos (residuos 8-19, 42-49 y 54-61 del IGF-1; residuos B9-B20, A1-A8 y A13-A20 de la insulina) la RMSD es solamente de 0,93 angstroms. Igual que la insulina, los residuos 18-21 en el extremo de la hélice B forman un giro β de tipo II', que redirige el esqueleto desde la hélice B hacia una región extendida. Los residuos 24-27 forman un giro β de tipo VIII para acomodarse a la región C, que se extiende lejos del núcleo central del IGF-1, e interacciona con una molécula de simetría relacionada. Los residuos 30-33 forman un giro beta de tipo II bien definido, mostrando destacadamente Tyr 31 en la posición i+1. Los residuos 35-40 no han sido modelados, ya que la densidad electrónica en esta región es débil y está desconectada. Solamente los dos primeros residuos de la región D (residuos 63 y 64) están ordenados en la estructura.

La región C del IGF-1 media una interacción de empaquetado de cristales simétricos doble a través del eje *a* de la celda unidad. Esta interacción enmascara 689 \AA^2 de área de superficie accesible al solvente de cada molécula de IGF-1, o un total de 1378 \AA^2 , y es la interfase más grande en el cristal. Se forman un total de 28 contactos intermoleculares de $3,6 \text{ \AA}$ de distancia o menos a través de esta interfase, formando la siguiente interacción de empaquetado de cristales más extensa solamente nueve contactos. El núcleo central de la interfase está dominado por Tyr 24 y Pro 28 de cada monómero, que enmascaran 39 \AA^2 y 57 \AA^2 de áreas de superficies accesibles al solvente, respectivamente. El anillo aromático de Tyr 31, que está en el extremo del bucle en el punto más alejado del núcleo central de IGF-1 se empaqueta frente a los anillos fenólicos de Phe 23 y Phe 25 de la molécula con simetría relacionada. Además de estas interacciones hidrofóbicas, están presentes dos enlaces de hidrógeno de la cadena principal (Tyr 31 N-Phe 23 O; Ser 34 N-Asp 20 O) en la superficie dimérica. Residuos de la región D (62-64) son también secuestrados parcialmente por la formación de dímeros. Debido a estas interacciones, la mayor parte de la región C del cristal está bien ordenada, proporcionando la primera vista de alta resolución de la conformación de este bucle biológicamente importante.

Aunque se sometieron a selección en ensayos de cristalización 72 compuestos detergentes, incluyendo los detergentes similares sulfonato de 3-((3-colaminopropil)dimetilamonio)-1-propano (CHAPS) y ácido 3-((3-colamidopropil)dimetilamonio)-2-hidroxiopropanosulfónico (CHAPSO), solamente N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina produjo cristales. Una única molécula de N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina interacciona con residuos, formando una pequeña hendidura hidrofóbica sobre una superficie del IGF-1 (Leu 5, Phe 16, Val 17, Leu 54 y Leu 57) (Fig. 7A). La preferencia por N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina es explicada, sin limitarse a ninguna teoría, por la ausencia de un átomo de oxígeno en la posición C10 de la molécula de detergente. Esta región del detergente está en estrecho contacto con los átomos de las cadenas laterales de los residuos Leu 5, Leu 54 y Leu 57 del IGF-1. La cara opuesta del detergente media un contacto de simetría con los residuos Val 11, Leu 14 y Gln 15 de una molécula de IGF-1 de simetría relacionada. Y lo que es más intrigante, esta cara de la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina contacta también con el borde de la interfase dimérica, con estrechos contactos con Phe 23 y Phe 25 de la misma molécula de IGF-1, así como con Tyr 31 y Gly 32 de la pareja dimérica (Fig. 7B). Un análisis más detallado indica que el detergente de une a dos parches de bolsillos de unión del IGF-1. Un parche tiene los residuos de aminoácidos Glu 3, Thr 4, Leu 5, Asp 12, Ala 13, Phe 16, Val 17, Cys 47, Ser 51, Cys 52, Asp 53, Leu 54 y Leu 57, y el segundo parche tiene los residuos de aminoácidos Val 11, Gln 15, Phe 23, Phe 25, Asn 26, Val 44, Phe 49 y Arg 55. La unión es definida por tener al menos un contacto entre cada residuo de aminoácido enumerado y la molécula de agonista candidato que es menor o igual que 6 angstroms.

Discusión

La región C de la estructura cristalina del IGF-1 se extiende hacia fuera desde el núcleo central de la molécula, formando los residuos 30-33 un giro beta de tipo II canónico, y formando el resto de la región C un dímero cristalográfico con una molécula de simetría relacionada. Tyr 31 ha sido implicado como determinante crítico para la unión

al IGF-1R, y su posición en el extremo de esta extensión lo sitúa en una posición ideal para interactuar con una molécula del receptor. Aunque esta región del IGF-1 no está bien definida por los datos de RMN, es probable que la conformación de la región C en el cristal refleje la conformación en solución. Hay evidencia de un giro inverso en el extremo del bucle y de una bisagra que se dobla en los extremos del bucle de IGF-2 (Torres y col., *supra*). Por tanto, aunque las fuerzas de empaquetado de los cristales ayudan indudablemente a estabilizar la orientación de este bucle, su conformación es consistente con la estructura en solución del IGF-2 estrechamente relacionado.

El tamaño de la interfase formada por el dímero cristalográfico está dentro del rango del área de la superficie enmascarada en complejos biológicos conocidos (Janin y Chothia, *J. Biol. Chem.*, 264: 16027-16030 (1990)). Además, esta interacción excluye parcialmente del solvente a varios de los residuos que se sabe que son importantes para la unión al IGF-1R, incluyendo Phe 23 (un 69% enmascarado), Tyr 24 (un 64%), Phe 25 (un 29%) y Tyr 31 (un 38%). Se ha informado también de interacciones homodiméricas de otros grupos de IGF-1 e IGF-2. Laajoki y col. (2000), *supra*, describen que a una concentración de 1 mM, una forma manipulada de IGF-1 (Largo-[Arg³]IGF-1) se reparte en un 20% aproximadamente de dímero/un 80% de monómero, una proporción que está bastante de acuerdo con el cálculo de una K_d de 3,6 mM. En su estudio de RMN del IGF-2, Torres y col., *supra*, informaron que los protones amida de los residuos de la región C se intercambiaban lentamente con el solvente, sugiriendo que IGF-2 forma un homodímero en solución. Sin embargo, a pesar de la cantidad significativa del área de la superficie que está enmascarada después de la formación de dímeros en el cristal, la afinidad del IGF-1 por sí mismo muy débil. Además, la estequiometría de unión conocida de una molécula de IGF-1 por dímero de receptor (De Meyts, *supra*) hace difícil racionalizar el significado biológico de la dimerización del IGF-1. En conclusión, el dímero de IGF-1 en esta forma de cristal resulta de la alta concentración de IGF-1 en el experimento de cristalización, y no representa una forma fisiológicamente relevante de la molécula.

La muy baja calidad de los datos espectroscópicos de RMN obtenidos para IGF-1 a pH casi neutro, ha sido atribuida a una combinación de autoasociación y movilidad interna que da lugar a una gran variación de la anchura de la línea de resonancia (Cooke y col., *supra*). Como resultado, los espectros NOESY adquiridos sobre IGF-1 contienen muchos picos anchos, solapados, y pocas correlaciones precisas bien resueltas. Los espectros NOESY recogidos de IGF-1 en presencia de un exceso de N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina tienen un aspecto similar. Por tanto, la unión del detergente no es suficiente para eliminar la agregación o la flexibilidad inherente del IGF-1 y no facilita la caracterización de la conformación de la proteína en solución. Esto contrasta con las observaciones en el estado cristalino donde la adición del detergente da lugar a un dímero cristalográfico bien empaquetado que difracciona con alta resolución. Jansson y col., *J. Biol. Chem.*, 273: 24701-24707 (1998) observaron que la falta de asignaciones de la RMN en la región inmediatamente circundante a Cys 6, que incluye Leu 5 y Gly 7, era indicativa de que el disulfuro Cys 6-Cys 48 estaba experimentando un intercambio intermedio entre una configuración cis y una configuración trans. El hecho de que el detergente se una a una cara de la hélice B inmediatamente opuesta a este disulfuro sugiere, sin limitarse a ninguna teoría, que puede servir para estabilizar esta región de la molécula mediante un empaquetado más completo de la hendidura hidrofóbica. En efecto, en la estructura cristalina de la presente, el Cys 6-Cys 48 está claramente en la conformación trans y no hay evidencia de conformaciones múltiples.

40 Conclusión

La estructura cristalina del IGF-1 ha sido determinada utilizando dispersión anómala procedente de los átomos de azufre intrínsecos y de un ión Br unido en un sitio de unión de haluro fortuito. La estructura es muy similar a la de la insulina, estando la única diferencia importante en la región C, que sobresale del cuerpo de la proteína y media una interacción homodimérica. El nivel del área de la superficie enmascarada es consistente con el hecho de que a pH neutro el IGF-1 experimenta una autoasociación de manera dependiente de la concentración. Además, varios residuos que son importantes para la unión al receptor se encuentran en esta interfase dimérica, sugiriendo, sin limitarse a ninguna teoría, que los efectos sobre la unión al receptor por mutación de estos residuos pueden ser el resultado de una ruptura del dímero, más que de un contacto directo con la superficie del receptor.

50 Ejemplo 2

Medida de la unión del detergente basada en la difusión

Se utilizaron medidas de difusión derivadas de RMN para estimar la K_d para la interacción entre IGF-1 y N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina. Se prepararon muestras en tampón fosfato 50 mM en D₂O, pH 6,5 (lectura del medidor sin corregir) y contenían: N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina 1,0 mM + IGF-1 0,5 mM; N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina 0,5 mM + IGF-1 0,25 mM; N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina 0,25 mM + IGF-1 0,125 mM; o N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina únicamente (1,0, 0,5 ó 0,25 mM). Todos los espectros fueron adquiridos a 40°C en un espectrómetro AVANCE 500™ de Bruker (Bruker Analytik GmbH) equipado con una sonda de triple resonancia, con un gradiente de triple eje de 5 mm. Las medidas de difusión se realizaron con un método de par de pulsos bipolares con $\delta = 5$ ms, $\tau = 2$ ms y $\Delta = 25$ ó 40 ms para la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina sola o para la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina + IGF-1, respectivamente (Wu y col., *J. Magn. Reson., Ser. A* 115: 260-264 (1995)). Los espectros fueron recogidos con 128 a 1024 corrientes transitorias a medida que se incrementó la potencia del gradiente z desde 0,009 hasta 0,45 T_m-1 en 18 incrementos iguales; las medidas se realizaron al menos dos veces en cada muestra. Los espectros fueron procesados y se extrajeron las alturas de los picos con el programa FELIX (v98.0, MSI, San Diego). Las constantes de difusión, la proporción de detergente unido y la K_d resultante fueron extraídos según está descrito por Fejzo y col.,

Chemistry & Biology, 6: 755-769 (1999). Se recogieron también espectros de muestras que contenían sulfonato de 3-((3-colamidopropil)dimetilamonio)-1-propano 1,0 mM, un detergente anfotérico utilizado para la solubilización de membranas, y sulfonato de 3-((3-colamidopropil)dimetilamonio)-1-propano 1,0 mM + IGF-1 0,5 mM. Se recogieron espectros NOESY bidimensionales (Jeener y col., *J. Chem. Phys.*, 71: 4546-4553 (1979)) en una muestra de IGF-1 0,5 mM en presencia o ausencia de N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina 1,0 mM con un tiempo de mezclado de 100 ms.

ELISA de fagos con IGF-1

Células de *E. coli* (XL1-Blue, Stratagene) recién transformadas con el vector fágico pIGF-g3 que presenta el IGF-1 humano según está descrito en Dubaquié y Lowman, *supra*, fueron cultivadas durante una noche en 5 ml de medio 2YT (Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)). Las partículas de fago que presentaban IGF-1 fueron tituladas frente a IGFBP-1 e IGFBP-3 con el fin de obtener una dilución de 500-1000 veces para la preincubación con diluciones seriadas de los detergentes y los estándares de proteínas de unión durante 35 minutos. Inmunoplasacas de micropocillos de poliestireno transparente con una superficie de MAXISORP™ (Nunc, Dinamarca), fueron revestidas con la proteína IGFBP-1 o IGFBP-3 durante una noche a 4°C (50 µl a 3 µg/ml en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6), bloqueadas con TWEEN® 20 al 0,5% (monolaurato de polioxietilén sorbitán) (Atlas Chemical Co.) y PBS y lavadas ocho veces con PBS, TWEEN® 20 al 0,05% (monolaurato de polioxietilén sorbitán). Las muestras fueron añadidas a las placas durante 30 minutos. Las placas fueron lavadas ocho veces con PBS, TWEEN® 20 al 0,05% (monolaurato de polioxietilén sorbitán), incubadas con 50 µl de conjugado peroxidasa de rábano picante/anticuerpo anti-M13 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 1:10.000 en PBS, BSA 0,5%, durante 30 minutos y posteriormente lavadas ocho veces con PBS, TWEEN® 20 al 0,05% (monolaurato de polioxietilén sorbitán) y dos veces con PBS. Las placas fueron reveladas utilizando el sustrato tetrametilbencidina (Kirkegaard and Perry, Gaithersburg, MD), paradas con H₃PO₄ 1,0 y leídas espectrofotométricamente a 450 nm.

Análisis del equilibrio de sedimentación

La autoasociación de IGF-1 fue determinada mediante análisis del equilibrio de sedimentación. Los experimentos fueron llevados a cabo a 20°C en una ultracentrífuga analítica OPTIMA™ XL-A/XL-I (Beckman Coulter, Inc.). Las muestras fueron preparadas en tampón citrato 0,1 M, pH 6,5, NaCl 75 mM con una concentración de carga desde 1 mM a 0,01 mM. Los gradientes de concentración fueron medidos a velocidades del rotor de 25000 y 30000 rpm a 280 nm o a 285 nm utilizando un sistema óptico de absorción de barrido. Se verificó la consecución de un estado de equilibrio comparando barridos sucesivos después de 16 horas aproximadamente. El volumen específico parcial del IGF-1 fue calculado a partir de su composición de aminoácidos. Los datos fueron ajustados como un modelo de una única especie ideal o como un modelo de autoasociación dimérica ideal utilizando un programa de ajuste de mínimos cuadrados no lineal, NONLIN (Johnson y col., *Biophys. J.*, 36: 578-588 (1981)). Las constantes de asociación fueron determinadas a partir de los valores de mejor ajuste del modelo, proporcionados por la regresión de mínimos cuadrados no lineal.

Resultados

N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina se une al IGF-1 en solución

La afinidad del IGF-1 por el sulfonato de 3-((3-colamidopropil)dimetilamonio)-1-propano y por la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina fue determinada utilizando métodos de RMN en solución. Los cambios del desplazamiento químico observados durante una titulación de N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina en una solución de IGF-1 0,5 mM sugerían que la afinidad era submilimolar y no era fácilmente medible a partir de tales datos. En lugar de ello, se realizaron medidas de difusión en muestras a concentraciones variables de IGF-1 que contenían 2 equivalentes molares de detergente y también en varias muestras de detergente solo (la concentración del detergente era siempre menor que la concentración micelar crítica de 1,4 mM para la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina y 14 mM para el sulfonato de 3-((3-colamidopropil)dimetilamonio)-1-propano). La disminución de la constante de difusión del detergente en presencia de la proteína puede ser utilizada para calcular la proporción de detergente unida a la proteína (Fejzo y col., *supra*). Como la concentración total de detergente y de proteína es conocida, puede determinarse un valor de la constante de disociación. A las tres concentraciones de proteína estudiadas (0,5 mM, 0,25 mM y 0,125 mM), se obtuvieron valores de K_d de 220, 440 y 430 µM, respectivamente. Esta técnica ha sido aplicada rutinariamente a moléculas pequeñas (varios cientos de Daltons de peso molecular o menores) que se unen a proteínas grandes. En este caso particular, el ligando es relativamente grande (862 Da) y la proteína es relativamente pequeña (7648 Da); por tanto, la disminución diferencial de la constante de difusión tras la unión es pequeña. Esto aumenta la incertidumbre con la cual puede medirse la constante de disociación. Dado esto, los datos descritos anteriormente sugieren que la K_d para la interacción entre N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina e IGF-1 es de 300 ± 150 µM. Un análisis similar de los datos de la difusión del sulfonato de 3-((3-colamidopropil)dimetilamonio)-1-propano sugiere que la K_d en este caso es mayor de 3 mM.

La N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina bloquea la unión de IGFBP-1 e IGFBP-3

Con el fin de examinar el epítipo de unión de la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina en el IGF-1, el detergente fue preincubado con IGF-1 expresado en partículas de bacteriófago, y se midió el nivel de unión residual

a IGFBP-1 y a IGFBP-3 en un ensayo en placas (ELISA). Como control, se ensayó también la molécula de sulfonato de 3-((3-colamidopropil)dimetilamonio)-1-propano. Según se muestra en la Figura 8, la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina inhibía completamente la unión del IGF-1 en el fago a IGFBP-1 e IGFBP-3 con valores de la CI_{50} de $740 \pm 260 \mu M$ y $231 \pm 29 \mu M$, respectivamente. Sin embargo, estos números debe ser interpretados de forma conservadora, ya que la concentración micelar crítica de la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina (1,4 mM) presenta un límite superior en la curva de la Figura 8. En contraste con el efecto de la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina, el detergente estrechamente relacionado sulfonato de 3-((3-colamidopropil)dimetilamonio)-1-propano no mostró ninguna inhibición de la unión a ninguna de las concentraciones analizadas hasta 1 mM. A pesar de las limitaciones del experimento, los valores de la CI_{50} obtenidos para la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina concuerdan bien con la estimación anterior de la K_d para la interacción N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina-IGF-1.

Autoasociación del IGF-1

Los datos del equilibrio de sedimentación muestran que IGF-1 experimenta autoasociación en solución. El peso molecular medio aumentaba al aumentar la concentración de proteína desde 0,01 mM a 1 mM. El peso molecular medio a la concentración más elevada estudiada (1 mM) es alrededor de un 37% mayor que el peso molecular del monómero (10,4 KDa a 1 mM frente a un peso molecular del monómero de 7,6 KDa). A concentraciones inferiores a 0,05 mM, no se observó autoasociación e IGF-1 existe únicamente como monómero en solución a pH neutro. Si se asume que las especies de peso molecular más elevado son dímeros de IGF-1, los datos de sedimentación pueden ser ajustados como un modelo de monómero-dímero con una K_d de $3,6 \pm 1,0$ mM (Figura 9).

Varios estudios han identificado residuos en IGF-1 que son importantes para la unión a IGFBP (Clemmons y col., *Endocrinology*, 131: 890-895 (1992); Dubaquié y Lowman, *supra*; Jansson y col., *supra*; Oh y col. (1993), *supra*; Lowman y col. (1998), *supra*; y Dubaquié y col., *Endocrinology*, 142: 165-173 (2001)). Dubaquié y Lowman, *supra*, identificaron dos parches distintos en IGF-1 que interaccionan con IGFBP-1 e IGFBP-3. El Parche 1 consta de Glu 7, Leu 10, Val 11, Leu 14, Phe 25, Ile 43 y Val 44, mientras que el Parche 2 consta de Glu 3, Thr 4, Leu 5, Phe 16, Val 17 y Leu 54. En la estructura cristalina del IGF-1, estos dos parches están implicados en los contactos de empaquetado de los cristales mediados por detergente. (Específicamente, el Parche 1 de la estructura cristalina de IGF-1 consta de los residuos de aminoácidos Glu 3, Thr 4, Leu 5, Asp 12, Ala 13, Phe 16, Val 17, Cys 47, Ser 51, Cys 52, Asp 53, Leu 54 y Leu 57, y el Parche 2 de la estructura cristalina del IGF-1 consta de los residuos de aminoácidos Val 11, Gln 15, Phe 23, Phe 25, Asn 26, Val 44, Phe 49 y Arg 55, en los que tiene lugar la unión si hay al menos un contacto entre cada residuo de aminoácido enumerado y la molécula de agonista candidato que sea menor o igual que 6 angstroms).

El solapamiento del sitio de unión del detergente con las superficies de interacción de las IGFBP es totalmente consistente con la observación de la presente de que la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina bloquea la unión de IGFBP-1 e IGFBP-3. En contraste, la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina no inhibe la generación de señales mediada por el IGF-1R en un ensayo de activación de receptores basado en células. Estos resultados son consistentes con estudios previos que demostraron diferentes epítomos de unión en el IGF-1 para las interacciones con el receptor y las IGFBP (Bayne y col., *supra*, (Vol. 264); Bayne y col., *supra*, (Vol. 265); Cascieri y col., *supra*). La identificación de la N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina como inhibidor de las interacciones con IGFBP, permite la capacidad para desarrollar fármacos o peptidomiméticos de molécula pequeña que rompan el complejo IGF-1/IGFBP *in vivo*, liberando de este modo IGF-1 activo para los receptores del conjunto sistémico, inactivo. Tales fármacos incluyen la terapia biodisponible oralmente para enfermedades metabólicas tales como la diabetes.

Recientemente, Zeslawski y col. (*EMBO J.*, 20: 3638-3644 (2001)) publicaron la estructura cristalina del IGF-1 en un complejo con el dominio N-terminal de la IGFBP-5. La estructura de ese complejo es totalmente consistente con el modelo de inhibición por un detergente de la unión de IGFBP presentado en la presente, y descrito también por Vajdos y col., *Biochemistry*, 40: 11022-11029 (2001). La determinación mediante RMN de un complejo de IGF-1 unido a un péptido antagonista de IGF-1 derivado de un fago denominado IGF-F1-1 (RNCFESVAALRRRCMYG (SEC ID N°:4)), en comparación con otras estructuras cristalinas de IGF-1, muestra que, sin limitarse a ninguna teoría, una porción de la cadena A (hélice III) es móvil en solución y adopta conformaciones ligeramente diferentes cuando se une a diferentes ligandos (detergente, péptido, proteína de unión).

El complejo entre el péptido IGF-F1-1 e IGF-1 fue determinado a partir de los datos de espectroscopía de RMN recogidos a 600 y 800 MHz. Se preparó IGF-1 marcado uniformemente con ^{13}C y ^{15}N utilizando el esquema descrito por Reilly y Fairbrother, *J. Biomol. NMR*, 4: 459-462 (1994) y se purificó de acuerdo con el protocolo de Vajdos y col., *supra*. Un ligero exceso molar de IGF-F1-1 no marcado fue mezclado con una solución 1,5 mM de $^{13}C/^{15}N$ IGF-1 y se asignaron resonancias de RMN de 1H , ^{13}C y ^{15}N a partir de experimentos de RMN de resonancia doble y triple, según está descrito por Cavanagh y col., *Protein NMR Spectroscopy, Principles and Practice* (Academic Press: New York, 1996). Las restricciones de distancia en IGF-1 fueron identificadas a partir de los espectros NOESY HSQC editados para ^{13}C y de los espectros NOESY HSQC editados para ^{15}N (Cavanagh y col., *supra*).

Las restricciones intermoleculares entre IGF-1 y el péptido fueron obtenidas a partir de un espectro HSQC-NOESY de ^{13}C editado para ω_2 , filtrado para ω_1 (Lee y col., *FEBS Lett.*, 350: 87-90 (1994)). Las restricciones de distancia intrapéptido fueron obtenidas a partir de un espectro NOESY 2-D filtrado para ^{13}C . Además, se obtuvieron las restricciones de ángulos diedros Φ a partir de un espectro HNHA (Cavanagh y col., *supra*) y las restricciones χ^1 derivaban de espectros HNHB y TOCSY con corto tiempo de mezclado (Clare y col., *J. Biomolec. RMN*, 1: 13-22 (1991)). Se obtuvieron

restricciones Φ , ψ adicionales a partir de un análisis de los desplazamientos químicos de H^{α} , N, C^{α} , C^{β} y CO utilizando el programa TALOS (Cornilescu y col., J. Biomol. NMR, 13: 289-302 (1999)).

En total, se utilizaron 899 restricciones de distancia (779 intra-IGF-1, 33 intrapéptido; 87 intermoleculares), 16 restricciones de enlaces de hidrógeno en la hélice I y 138 restricciones de ángulos diedros (71Φ ; 44ψ ; $23 \chi^1$) para generar un conjunto de estructuras utilizando un protocolo de dinámica de ángulo de torsión con el programa de ordenador CNX (Accelrys Inc., San Diego). La estructura del IGF-1 estaba bien definida para la región B (residuos 2-25) y para la región A (residuos 41-63) con una RMSD media de la estructura media para los átomos pesados del esqueleto de $0,32 \pm 0,06$ Å. La región C (26-40) y la región D (62-70) no estaban bien definidas por los datos disponibles. Las 20 estructuras con la energía de violación de la restricción más baja tenían una buena estereoquímica del esqueleto (el 80% de los residuos en la región más favorecida del espacio Φ/ψ con ninguno en las regiones no permitidas) y contenían pocas violaciones de las restricciones experimentales (violación de la restricción de distancia máxima media $0,09 \pm 0,02$ Å). IGF-F1-1 adopta una conformación muy similar a la determinada para el propio péptido en solución. La conformación de IGF-1 contiene tres hélices (residuos 7-18, 43-49 y 54-60) y es similar a la observada a una resolución menor en previos estudios de RMN de IGF-1 sin acomplejar (ver, por ejemplo, Cooke y col., *supra*; Sato y col., *supra*; y Laajoki y col., *supra*).

La Fig. 10 muestra la comparación para los complejos con el detergente y el péptido del fago. Específicamente, la Fig. 10A muestra un diagrama de cintas de un complejo de IGF-1 y N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina y la Fig. 10B muestra un complejo de IGF-1 unido al péptido IGF-F1-1 derivado de un fago. La región B (hélice I) adopta una conformación muy similar en ambos complejos. El bucle C está ordenado sólo parcialmente en el complejo del detergente, y mal definido en el complejo del péptido. Se observan diferencias inducidas por el ligando para la región A del IGF-1 (hélice III), a nivel del esqueleto (residuos 52-60) y a nivel de cadena lateral (leucina 54 y 57). Sin limitarse a ninguna teoría, se cree que la maleabilidad en este área de la región A es lo que permite al IGF-1 unirse a tantas proteínas (seis IGFBPs y tres receptores).

La presente invención ha sido discutida por necesidad en la presente mediante referencia a ciertos métodos y materiales específicos. Debe comprenderse que la discusión de estos métodos y materiales específicos no constituye de ninguna manera una limitación del ámbito de la presente invención, que se extiende a cualquiera y a todos los materiales y métodos alternativos adecuados para alcanzar los objetivos de la presente invención.

(Apéndice pasa a página siguiente)

ES 2 278 020 T3

Apéndice 1

OBSERVACIÓN 3 ESTRUCTURA CRISTALINA DEL IGF-1 RESUELTA UTILIZANDO MAD
5 OBSERVACIÓN 3 REFINAMIENTO.
OBSERVACIÓN 3 PROGRAMA: X-PLOT(en línea) 98.1
OBSERVACIÓN 3 AUTORES: BRUNGER
10 OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 DATOS UTILIZADOS EN EL REFINAMIENTO.
OBSERVACIÓN 3 RANGO DE RESOLUCIÓN ELEVADO (ANGSTROMS): 1,80
15 OBSERVACIÓN 3 RANGO DE RESOLUCIÓN BAJO (ANGSTROMS): 20,00
OBSERVACIÓN 3 CORTE DE DATOS (SIGMA(F)): 0,2
OBSERVACIÓN 3 CORTE DE DATOS ALTO (ABS(F)): 10000000,00
20 OBSERVACIÓN 3 CORTE DE DATOS BAJO (ABS(F)): 0,001000
OBSERVACIÓN 3 COMPLETITUD (TRABAJO + ANÁLISIS) (%): 94,8
25 OBSERVACIÓN 3 NÚMERO DE REFLEXIONES: 6870
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 AJUSTE A LOS DATOS UTILIZADOS EN EL REFINAMIENTO.
30 OBSERVACIÓN 3 MÉTODO DE VALIDACIÓN CRUZADA: COMPLETO
OBSERVACIÓN 3 SELECCIÓN DEL CONJUNTO DE ANÁLISIS DEL VALOR DE R LIBRE:
ALEATORIA
35 OBSERVACIÓN 3 VALOR DE R (JUEGO OPERATIVO): 237
OBSERVACIÓN 3 VALOR DE R LIBRE: 0,269
OBSERVACIÓN 3 TAMAÑO DEL CONJUNTO DE ANÁLISIS DEL VALOR DE R LIBRE (%): 5,6
40 OBSERVACIÓN 3 RECuento DEL CONJUNTO DE ANÁLISIS DEL VALOR DE R LIBRE: 382
OBSERVACIÓN 3 ERROR ESTIMADO DEL VALOR DE R LIBRE: 0,014
45 OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 AJUSTE EN EL RECIPIENTE DE RESOLUCIÓN MÁS ELEVADA.

ES 2 278 020 T3

OBSERVACIÓN 3 NÚMERO TOTAL DE RECIPIENTES UTILIZADOS: 6
 5 OBSERVACIÓN 3 RANGO ALTO DE RESOLUCIÓN DEL RECIPIENTE (A): 1,80
 OBSERVACIÓN 3 RANGO BAJO DE RESOLUCIÓN DEL RECIPIENTE (A): 1,91
 OBSERVACIÓN 3 COMPLETITUD DEL RECIPIENTE (TRABAJO + ANÁLISIS) (%): 74,4
 10 OBSERVACIÓN 3 REFLEXIONES EN EL RECIPIENTE (JUEGO OPERATIVO): 826
 OBSERVACIÓN 3 VALOR DE R DEL RECIPIENTE (JUEGO OPERATIVO): 0,343
 OBSERVACIÓN 3 VALOR DE R LIBRE EN EL RECIPIENTE: 0,439
 15 OBSERVACIÓN 3 TAMAÑO DEL CONJUNTO DE ANÁLISIS DEL VALOR DE R LIBRE EN EL
 RECIPIENTE (%): 5,5
 OBSERVACIÓN 3 RECUENTO DEL CONJUNTO DE ANÁLISIS DEL VALOR DE R LIBRE EN EL
 20 RECIPIENTE: 48
 OBSERVACIÓN 3 ERROR ESTIMADO DEL VALOR DE R LIBRE EN EL RECIPIENTE: 0,063
 OBSERVACIÓN 3
 25 OBSERVACIÓN 3 NÚMEROS DE ÁTOMOS DISTINTOS DE HIDRÓGENO UTILIZADOS EN EL
 REFINAMIENTO.
 OBSERVACIÓN 3 ÁTOMOS DE PROTEÍNA: 475
 30 OBSERVACIÓN 3 ÁTOMOS DE ÁCIDO NUCLEICO: 0
 OBSERVACIÓN 3 ÁTOMOS HETERÓGENOS: 62
 35 OBSERVACIÓN 3 ÁTOMOS DE SOLVENTE: 102
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 VALORES DE B.
 40 OBSERVACIÓN 3 A PARTIR DE LA REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE WILSON (A**2): 25,1
 OBSERVACIÓN 3 VALOR MEDIO DE B (TOTAL, A**2): 33,8
 OBSERVACIÓN 3 VALOR DE B ANISOTRÓPICO TOTAL.
 45 OBSERVACIÓN 3 B11 (A**2): 0,00
 OBSERVACIÓN 3 B22 (A**2): 0,00
 50 OBSERVACIÓN 3 B33 (A**2): 0,00
 OBSERVACIÓN 3 B12 (A**2): 0,00
 OBSERVACIÓN 3 B13 (A**2): 0,00
 55 OBSERVACIÓN 3 B23 (A**2): 0,00
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 ERROR ESTIMADO DE LAS COORDENADAS.
 60 OBSERVACIÓN 3 ESD A PARTIR DE LA REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LUZZATI (A):
 0,23
 OBSERVACIÓN 3 ESD A PARTIR DE SIGMAA (A): 0,16
 65

ES 2 278 020 T3

OBSERVACIÓN 3 CORTE DE BAJA RESOLUCIÓN (A): 20,00
 OBSERVACIÓN 3
 5 OBSERVACIÓN 3 ERROR ESTIMADO DE LAS COORDENADAS VALIDADO DE MANERA CRUZADA.
 OBSERVACIÓN 3 ESD A PARTIR DE LA REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE C-V DE LUZZATI
 10 (A): 0,28
 OBSERVACIÓN 3 ESD A PARTIR DE C-V DE SIGMAA (A): 0,18
 OBSERVACIÓN 3
 15 OBSERVACIÓN 3 DESVIACIONES DE RMS DE LOS VALORES IDEALES.
 OBSERVACIÓN 3 LONGITUDES DE ENLACE (A): 0,020
 OBSERVACIÓN 3 ÁNGULOS DE ENLACE (GRADOS): 2,0
 20 OBSERVACIÓN 3 ÁNGULOS DIEDROS (GRADOS): 23,2
 OBSERVACIÓN 3 ÁNGULOS IMPROPIOS (GRADOS): 1,09
 OBSERVACIÓN 3
 25 OBSERVACIÓN 3 MODELO TÉRMICO ISOTRÓPICO: RESTRINGIDO
 OBSERVACIÓN 3
 30 OBSERVACIÓN 3 RESTRICCIONES DE FACTORES TÉRMICOS ISOTRÓPICOS. RMS SIGMA
 OBSERVACIÓN 3 ENLACE DE LA CADENA PRINCIPAL (A**2): 4,33 ; 4,00
 OBSERVACIÓN 3 ÁNGULO DE LA CADENA PRINCIPAL (A**2): 6,46 ; 4,00
 35 OBSERVACIÓN 3 ENLACE DE LA CADENA LATERAL (A**2): 5,41 ; 8,50
 OBSERVACIÓN 3 ÁNGULO DE LA CADENA LATERAL (A**2): 8,14 ; 9,00
 OBSERVACIÓN 3
 40 OBSERVACIÓN 3 MODELO NCS: NINGUNO
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 RESTRICCIONES DE NCS. RMS SIGMA/PESO
 45 OBSERVACIÓN 3 GRUPO 1 POSICIONAL (A): NULO ; NULO
 OBSERVACIÓN 3 GRUPO 1 FACTOR B (A**2): NULO ; NULO
 OBSERVACIÓN 3
 50 OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE PARÁMETROS 1: MSI_XPLOR_TOPPAR/protein_rep.param
 OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE PARÁMETROS 2: ../parameter.element
 55 OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE PARÁMETROS 3: ../cyc.par
 OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE PARÁMETROS 4: ../../g2mz/param19.sol
 OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE TOPOLOGÍA 1:
 60 /usr/prop/msi/980/data/xplor/toppar/tophcsdx.pro
 OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE TOPOLOGÍA 2: ../topology.element
 OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE TOPOLOGÍA 3: ../cyc.top
 65

ES 2 278 020 T3

OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE TOPOLOGÍA 4: ../../g2mz/toph19.sol

OBSERVACIÓN 3

OBSERVACIÓN 3 OTRAS OBSERVACIONES SOBRE EL REFINAMIENTO: MODELO
SOLVENTE PURO UTILIZADO

SEQRES 1 A 100 GLU THR LEU CYS GLY ALA GLU LEU VAL ASP ALA LEU GLN

SEQRES 2 A 100 PHE VAL CYS GLY ASP ARG GLY PHE TYR PHE ASN LYS PRO

SEQRES 3 A 100 THR GLY TYR GLY SER SER THR GLY ILE VAL ASP GLU CYS

SEQRES 4 A 100 CYS PHE ARG SER CYS ASP LEU ARG ARG LEU GLU MET TYR

SEQRES 5 A 100 CYS ALA PRO LEU HOH HOH HOH HOH HOH HOH HOH HOH

SEQRES 6 A 100 HOH HOH HOH HOH HOH HOH HOH HOH HOH HOH HOH HOH

SEQRES 7 A 100 HOH HOH HOH HOH HOH HOH HOH HOH HOH HOH HOH HOH

SEQRES 8 A 100 HOH HOH HOH HOH HOH HOH HOH HOH HOH

SEQRES 1 B 3 CYC BR HOH

SSBOND 1 CYS A 6 CYS A 48

SSBOND 2 CYS A 18 CYS A 61

SSBOND 3 CYS A 47 CYS A 52

CRYST1 31,830 71,074 66,014 90,00 90,00 90,00 C 2 2 21 16

ORIGX1 1,000000 0,000000 0,000000 0,000000

ORIGX2 0,000000 1,000000 0,000000 0,000000

ORIGX3 0,000000 0,000000 1,000000 0,000000

ESCALA 1 0,031417 0,000000 0,000000 0,000000

ESCALA 2 0,000000 0,014070 0,000000 0,000000

ESCALA 3 0,000000 0,000000 0,015148 0,000000

OBSERVACIÓN NOMBRE DE ARCHIVO="final.pdb"

OBSERVACIÓN r= 0,237371 r libre= 0,26887

OBSERVACIÓN FECHA: 30-Enero-01 14:51:37 creado por el usuario: mhu

ÁTOMO 1 CB GLU A 3 20,808 24,058 21,698 1,00 46,92

ÁTOMO 2 CG GLU A 3 19,515 23,283 21,499 1,00 61,66

ÁTOMO 3 CD GLU A 3 18,281 24,029 22,025 1,00 70,74

ÁTOMO 4 OE1 GLU A 3 18,254 24,408 23,221 1,00 74,11

ÁTOMO 5 OE2 GLU A 3 17,332 24,237 21,238 1,00 75,50

ÁTOMO 6 C GLU A 3 22,417 22,169 21,324 1,00 36,23

ÁTOMO 7 O GLU A 3 21,616 21,223 21,375 1,00 38,90

ÁTOMO 8 N GLU A 3 21,623 23,389 19,405 1,00 38,88

ÁTOMO 9 CA GLU A 3 21,994 23,550 20,854 1,00 40,66

ES 2 278 020 T3

	ÁTOMO 10	N THR A 4	23,696	22,040	21,647	1,00	31,38
5	ÁTOMO 11	CA THR A 4	24,213	20,754	22,059	1,00	24,88
	ÁTOMO 12	CB THR A 4	25,301	20,217	21,051	1,00	23,86
	ÁTOMO 13	OG1 THR A 4	26,426	21,106	21,070	1,00	30,08
10	ÁTOMO 14	CG2 THR A 4	24,786	20,115	19,645	1,00	25,92
	ÁTOMO 15	C THR A 4	24,825	20,983	23,441	1,00	20,71
	ÁTOMO 16	O THR A 4	24,715	22,065	24,036	1,00	19,97
15	ÁTOMO 17	N LEU A 5	25,435	19,949	23,986	1,00	19,32
	ÁTOMO 18	CA LEU A 5	25,976	20,054	25,319	1,00	15,87
	ÁTOMO 19	CB LEU A 5	25,300	19,036	26,254	1,00	22,19
20	ÁTOMO 20	CG LEU A 5	23,859	19,367	26,714	1,00	28,27
	ÁTOMO 21	CD1 LEU A 5	23,229	18,123	27,479	1,00	23,45
	ÁTOMO 22	CD2 LEU A 5	23,916	20,612	27,594	1,00	25,44
25	ÁTOMO 23	C LEU A 5	27,472	19,662	25,252	1,00	19,16
	ÁTOMO 24	O LEU A 5	27,742	18,527	24,980	1,00	20,58
30	ÁTOMO 25	N CYS A 6	28,352	20,591	25,572	1,00	19,74
	ÁTOMO 26	CA CYS A 6	29,809	20,320	25,520	1,00	21,84
	ÁTOMO 27	C CYS A 6	30,485	20,754	26,790	1,00	16,04
35	ÁTOMO 28	O CYS A 6	29,990	21,602	27,535	1,00	18,05
	ÁTOMO 29	CB CYS A 6	30,448	21,077	24,361	1,00	22,37
	ÁTOMO 30	SG CYS A 6	29,753	20,589	22,733	1,00	32,91
40	ÁTOMO 31	N GLY A 7	31,685	20,185	27,039	1,00	19,09
	ÁTOMO 32	CA GLY A 7	32,397	20,613	28,217	1,00	17,15
	ÁTOMO 33	C GLY A 7	31,698	20,668	29,536	1,00	18,61
45	ÁTOMO 34	O GLY A 7	31,069	19,683	29,965	1,00	15,50
	ÁTOMO 35	N ALA A 8	31,835	21,779	30,240	1,00	13,90
50	ÁTOMO 36	CA ALA A 8	31,276	21,897	31,553	1,00	15,72
	ÁTOMO 37	CB ALA A 8	31,630	23,239	32,150	1,00	21,73
	ÁTOMO 38	C ALA A 8	29,715	21,774	31,498	1,00	14,12
55	ÁTOMO 39	O ALA A 8	29,116	21,316	32,469	1,00	14,45
	ÁTOMO 40	N GLU A 9	29,145	22,263	30,412	1,00	15,00
	ÁTOMO 41	CA GLU A 9	27,653	22,198	30,355	1,00	21,86
60	ÁTOMO 42	CB GLU A 9	27,118	22,975	29,140	1,00	23,00
	ÁTOMO 43	CG GLU A 9	27,116	24,481	29,346	1,00	33,94
65	ÁTOMO 44	CD GLU A 9	26,424	25,279	28,204	1,00	53,09

ES 2 278 020 T3

	ÁTOMO 45	OE1 GLU A 9	25,790	24,700	27,260	1,00	50,65
5	ÁTOMO 46	OE2 GLU A 9	26,521	26,528	28,270	1,00	63,42
	ÁTOMO 47	C GLU A 9	27,200	20,732	30,278	1,00	19,13
	ÁTOMO 48	O GLU A 9	26,180	20,376	30,831	1,00	15,61
10	ÁTOMO 49	N LEU A 10	27,974	19,902	29,589	1,00	16,50
	ÁTOMO 50	CA LEU A 10	27,688	18,488	29,435	1,00	19,32
	ÁTOMO 51	CB LEU A 10	28,637	17,845	28,384	1,00	16,05
15	ÁTOMO 52	CG LEU A 10	28,552	16,296	28,272	1,00	18,02
	ÁTOMO 53	CD1 LEU A 10	27,080	15,875	27,864	1,00	17,22
	ÁTOMO 54	CD2 LEU A 10	29,459	15,858	27,153	1,00	17,33
20	ÁTOMO 55	C LEU A 10	27,850	17,812	30,788	1,00	20,39
	ÁTOMO 56	O LEU A 10	27,030	16,968	31,173	1,00	13,49
	ÁTOMO 57	N VAL A 11	28,924	18,126	31,531	1,00	16,73
25	ÁTOMO 58	CA VAL A 11	29,089	17,550	32,838	1,00	13,49
	ÁTOMO 59	CB VAL A 11	30,518	17,917	33,453	1,00	16,29
	ÁTOMO 60	CG1 VAL A 11	30,636	17,370	34,882	1,00	19,22
30	ÁTOMO 61	CG2 VAL A 11	31,603	17,350	32,528	1,00	17,93
	ÁTOMO 62	C VAL A 11	28,006	18,025	33,824	1,00	13,78
	ÁTOMO 63	O VAL A 11	27,532	17,272	34,668	1,00	11,61
35	ÁTOMO 64	N ASP A 12	27,599	19,280	33,717	1,00	14,34
	ÁTOMO 65	CA ASP A 12	26,573	19,795	34,651	1,00	15,14
40	ÁTOMO 66	CB ASP A 12	26,166	21,243	34,290	1,00	14,66
	ÁTOMO 67	CG ASP A 12	26,960	22,337	34,970	1,00	27,52
	ÁTOMO 68	OD1 ASP A 12	27,448	22,152	36,103	1,00	29,53
45	ÁTOMO 69	OD2 ASP A 12	27,031	23,422	34,314	1,00	31,00
	ÁTOMO 70	C ASP A 12	25,275	18,941	34,366	1,00	11,41
	ÁTOMO 71	O ASP A 12	24,564	18,555	35,313	1,00	14,02
50	ÁTOMO 72	N ALA A 13	25,006	18,744	33,115	1,00	16,37
	ÁTOMO 73	CA ALA A 13	23,761	18,002	32,720	1,00	18,28
	ÁTOMO 74	CB ALA A 13	23,558	18,014	31,189	1,00	15,65
55	ÁTOMO 75	C ALA A 13	23,803	16,590	33,235	1,00	17,95
	ÁTOMO 76	O ALA A 13	22,833	16,073	33,788	1,00	15,70
60	ÁTOMO 77	N LEU A 14	24,954	15,920	33,065	1,00	11,92
	ÁTOMO 78	CA LEU A 14	25,077	14,560	33,611	1,00	15,01
	ÁTOMO 79	CB LEU A 14	26,443	13,965	33,164	1,00	13,58

65

ES 2 278 020 T3

	ÁTOMO 80	CG LEU A 14	26,457	13,638	31,695	1,00	15,59
5	ÁTOMO 81	CD1 LEU A 14	27,939	13,345	31,250	1,00	17,99
	ÁTOMO 82	CD2 LEU A 14	25,601	12,370	31,414	1,00	22,05
	ÁTOMO 83	C LEU A 14	24,944	14,495	35,098	1,00	15,56
10	ÁTOMO 84	O LEU A 14	24,341	13,550	35,626	1,00	18,96
	ÁTOMO 85	N GLN A 15	25,591	15,431	35,831	1,00	12,18
	ÁTOMO 86	CA GLN A 15	25,494	15,426	37,273	1,00	14,03
15	ÁTOMO 87	CB GLN A 15	26,379	16,526	37,916	1,00	17,47
	ÁTOMO 88	CG GLN A 15	27,917	16,185	37,673	1,00	23,70
	ÁTOMO 89	CD GLN A 15	28,863	16,851	38,656	1,00	32,76
20	ÁTOMO 90	OE1 GLN A 15	29,187	18,020	38,510	1,00	28,85
	ÁTOMO 91	NE2 GLN A 15	29,314	16,095	39,658	1,00	29,69
25	ÁTOMO 92	C GLN A 15	24,061	15,631	37,745	1,00	18,29
	ÁTOMO 93	O GLN A 15	23,684	15,090	38,729	1,00	18,76
	ÁTOMO 94	N PHE A 16	23,297	16,400	37,012	1,00	18,23
30	ÁTOMO 95	CA PHE A 16	21,916	16,692	37,438	1,00	17,04
	ÁTOMO 96	CB PHE A 16	21,438	17,935	36,706	1,00	18,66
	ÁTOMO 97	CG PHE A 16	20,060	18,334	37,110	1,00	18,49
35	ÁTOMO 98	CD1 PHE A 16	19,874	18,960	38,310	1,00	23,45
	ÁTOMO 99	CD2 PHE A 16	18,959	17,947	36,339	1,00	21,34
	ÁTOMO 100	CE1 PHE A 16	18,558	19,216	38,788	1,00	27,25
40	ÁTOMO 101	CE2 PHE A 16	17,646	18,190	36,789	1,00	21,50
	ÁTOMO 102	CZ PHE A 16	17,457	18,829	38,020	1,00	24,95
45	ÁTOMO 103	C PHE A 16	21,018	15,479	37,110	1,00	15,52
	ÁTOMO 104	O PHE A 16	20,248	15,013	37,971	1,00	20,37
	ÁTOMO 105	N VAL A 17	21,160	14,923	35,916	1,00	16,12
50	ÁTOMO 106	CA VAL A 17	20,338	13,761	35,490	1,00	17,94
	ÁTOMO 107	CB VAL A 17	20,392	13,598	33,932	1,00	21,28
	ÁTOMO 108	CG1 VAL A 17	19,831	12,219	33,456	1,00	25,51
55	ÁTOMO 109	CG2 VAL A 17	19,619	14,737	33,295	1,00	22,15
	ÁTOMO 110	C VAL A 17	20,720	12,454	36,182	1,00	21,98
	ÁTOMO 111	O VAL A 17	19,843	11,655	36,556	1,00	24,05
60	ÁTOMO 112	N CYS A 18	22,015	12,222	36,411	1,00	17,42
	ÁTOMO 113	CA CYS A 18	22,430	10,964	37,039	1,00	20,54
65	ÁTOMO 114	C CYS A 18	22,420	10,998	38,579	1,00	26,67

ES 2 278 020 T3

5	ÁTOMO 115	O CYS A 18	22,386	9,967	39,239	1,00	24,96
	ÁTOMO 116	CB CYS A 18	23,841	10,565	36,505	1,00	16,00
	ÁTOMO 117	SG CYS A 18	23,947	10,463	34,717	1,00	29,49
10	ÁTOMO 118	N GLY A 19	22,462	12,198	39,147	1,00	32,94
	ÁTOMO 119	CA GLY A 19	22,464	12,366	40,595	1,00	31,76
	ÁTOMO 120	C GLY A 19	23,563	11,580	41,263	1,00	37,69
15	ÁTOMO 121	O GLY A 19	24,730	11,631	40,869	1,00	40,61
	ÁTOMO 122	N ASP A 20	23,186	10,815	42,276	1,00	39,20
	ÁTOMO 123	CA ASP A 20	24,150	10,009	42,989	1,00	47,44
20	ÁTOMO 124	CB ASP A 20	23,471	9,355	44,187	1,00	60,22
	ÁTOMO 125	CG ASP A 20	23,633	10,169	45,437	1,00	73,16
	ÁTOMO 126	OD1 ASP A 20	24,132	11,311	45,326	1,00	79,05
25	ÁTOMO 127	OD2 ASP A 20	23,275	9,675	46,524	1,00	78,87
	ÁTOMO 128	C ASP A 20	24,843	8,946	42,149	1,00	37,42
	ÁTOMO 129	O ASP A 20	25,954	8,521	42,472	1,00	38,02
30	ÁTOMO 130	N ARG A 21	24,213	8,484	41,084	1,00	26,27
	ÁTOMO 131	CA ARG A 21	24,883	7,495	40,267	1,00	33,90
35	ÁTOMO 132	CB ARG A 21	23,930	6,931	39,223	1,00	36,79
	ÁTOMO 133	CG ARG A 21	22,513	7,382	39,490	1,00	50,60
	ÁTOMO 134	CD ARG A 21	21,547	6,260	39,495	1,00	46,09
40	ÁTOMO 135	NE ARG A 21	21,068	5,971	38,157	1,00	44,95
	ÁTOMO 136	CZ ARG A 21	20,533	6,865	37,329	1,00	42,44
	ÁTOMO 137	NH1 ARG A 21	20,397	8,132	37,692	1,00	49,97
45	ÁTOMO 138	NH2 ARG A 21	20,103	6,474	36,138	1,00	34,61
	ÁTOMO 139	C ARG A 21	25,951	8,301	39,565	1,00	36,17
	ÁTOMO 140	O ARG A 21	25,786	9,474	39,374	1,00	37,51
50	ÁTOMO 141	N GLY A 22	27,056	7,707	39,184	1,00	35,48
	ÁTOMO 142	CA GLY A 22	27,983	8,551	38,437	1,00	28,95
	ÁTOMO 143	C GLY A 22	27,566	8,445	36,983	1,00	24,58
55	ÁTOMO 144	O GLY A 22	26,409	8,046	36,674	1,00	22,09
	ÁTOMO 145	N PHE A 23	28,465	8,786	36,065	1,00	15,51
60	ÁTOMO 146	CA PHE A 23	28,157	8,704	34,664	1,00	15,18
	ÁTOMO 147	CB PHE A 23	27,665	10,080	34,127	1,00	20,92
	ÁTOMO 148	CG PHE A 23	28,539	11,242	34,571	1,00	20,47
65	ÁTOMO 149	CD1 PHE A 23	28,271	11,908	35,762	1,00	24,30

ES 2 278 020 T3

	ÁTOMO 150	CD2 PHE A 23	29,644	11,596	33,815	1,00	20,21
5	ÁTOMO 151	CE1 PHE A 23	29,126	12,965	36,237	1,00	25,52
	ÁTOMO 152	CE2 PHE A 23	30,520	12,636	34,261	1,00	20,52
	ÁTOMO 153	CZ PHE A 23	30,259	13,307	35,458	1,00	22,56
10	ÁTOMO 154	C PHE A 23	29,397	8,332	33,920	1,00	20,77
	ÁTOMO 155	O PHE A 23	30,484	8,463	34,494	1,00	24,08
	ÁTOMO 156	N TYR A 24	29,242	7,891	32,673	1,00	20,54
15	ÁTOMO 157	CA TYR A 24	30,396	7,562	31,821	1,00	25,88
	ÁTOMO 158	CB TYR A 24	30,393	6,126	31,295	1,00	33,47
	ÁTOMO 159	CG TYR A 24	29,706	5,125	32,115	1,00	31,26
20	ÁTOMO 160	CD1 TYR A 24	30,356	4,551	33,204	1,00	43,74
	ÁTOMO 161	CE1 TYR A 24	29,763	3,573	33,939	1,00	47,84
	ÁTOMO 162	CD2 TYR A 24	28,422	4,680	31,785	1,00	41,08
25	ÁTOMO 163	CE2 TYR A 24	27,818	3,692	32,524	1,00	39,08
	ÁTOMO 164	CZ TYR A 24	28,492	3,151	33,589	1,00	44,15
30	ÁTOMO 165	OH TYR A 24	27,949	2,164	34,357	1,00	56,07
	ÁTOMO 166	C TYR A 24	30,332	8,362	30,588	1,00	24,71
	ÁTOMO 167	O TYR A 24	29,264	8,859	30,221	1,00	31,49
35	ÁTOMO 168	N PHE A 25	31,473	8,437	29,901	1,00	21,41
	ÁTOMO 169	CA PHE A 25	31,546	9,091	28,625	1,00	18,28
	ÁTOMO 170	CB PHE A 25	32,885	9,831	28,479	1,00	22,56
40	ÁTOMO 171	CG PHE A 25	32,945	11,076	29,294	1,00	22,04
	ÁTOMO 172	CD1 PHE A 25	33,336	11,040	30,625	1,00	22,70
	ÁTOMO 173	CD2 PHE A 25	32,496	12,281	28,757	1,00	29,30
45	ÁTOMO 174	CE1 PHE A 25	33,264	12,190	31,432	1,00	25,64
	ÁTOMO 175	CE2 PHE A 25	32,415	13,440	29,557	1,00	28,31
50	ÁTOMO 176	CZ PHE A 25	32,794	13,394	30,888	1,00	27,30
	ÁTOMO 177	C PHE A 25	31,385	8,046	27,534	1,00	20,94
	ÁTOMO 178	O PHE A 25	30,992	8,341	26,411	1,00	21,90
55	ÁTOMO 179	N ASN A 26	31,708	6,793	27,868	1,00	25,83
	ÁTOMO 180	CA ASN A 26	31,598	5,697	26,899	1,00	27,61
	ÁTOMO 181	CB ASN A 26	33,020	5,296	26,396	1,00	28,31
60	ÁTOMO 182	CG ASN A 26	33,737	6,469	25,737	1,00	29,50
	ÁTOMO 183	OD1 ASN A 26	34,438	7,267	26,395	1,00	38,35
65	ÁTOMO 184	ND2 ASN A 26	33,508	6,626	24,462	1,00	32,35

ES 2 278 020 T3

	ÁTOMO 185	C ASN A 26	30,924	4,534	27,633	1,00	23,53
5	ÁTOMO 186	O ASN A 26	31,274	4,214	28,753	1,00	23,60
	ÁTOMO 187	N LYS A 27	29,958	3,879	27,025	1,00	26,93
	ÁTOMO 188	CA LYS A 27	29,325	2,795	27,791	1,00	33,05
10	ÁTOMO 189	CB LYS A 27	28,018	2,384	27,113	1,00	34,53
	ÁTOMO 190	CG LYS A 27	27,014	3,521	27,084	1,00	37,05
15	ÁTOMO 191	CD LYS A 27	26,126	3,416	25,878	1,00	39,60
	ÁTOMO 192	CE LYS A 27	24,768	4,078	26,139	1,00	42,35
	ÁTOMO 193	NZ LYS A 27	24,244	4,674	24,865	1,00	39,82
20	ÁTOMO 194	C LYS A 27	30,242	1,603	27,870	1,00	31,68
	ÁTOMO 195	O LYS A 27	30,732	1,173	26,848	1,00	31,77
	ÁTOMO 196	N PRO A 28	30,494	1,065	29,073	1,00	35,47
25	ÁTOMO 197	CD PRO A 28	30,001	1,491	30,392	1,00	34,96
	ÁTOMO 198	CA PRO A 28	31,388	-0,110	29,148	1,00	36,66
	ÁTOMO 199	CB PRO A 28	31,468	-0,435	30,637	1,00	40,26
30	ÁTOMO 200	CG PRO A 28	30,367	0,359	31,287	1,00	40,80
	ÁTOMO 201	C PRO A 28	30,784	-1,252	28,322	1,00	36,18
	ÁTOMO 202	O PRO A 28	29,558	-1,344	28,152	1,00	36,79
35	ÁTOMO 203	N THR A 29	31,614	-2,107	27,763	1,00	34,63
	ÁTOMO 204	CA THR A 29	31,026	-3,155	26,945	1,00	41,92
40	ÁTOMO 205	CB THR A 29	31,824	-3,391	25,661	1,00	51,94
	ÁTOMO 206	OG1 THR A 29	32,938	-4,249	25,947	1,00	52,79
	ÁTOMO 207	CG2 THR A 29	32,313	-2,071	25,086	1,00	55,75
45	ÁTOMO 208	C THR A 29	30,897	-4,498	27,635	1,00	35,36
	ÁTOMO 209	O THR A 29	30,068	-5,322	27,238	1,00	34,58
	ÁTOMO 210	N GLY A 30	31,721	-4,720	28,643	1,00	33,36
50	ÁTOMO 211	CA GLY A 30	31,659	-5,997	29,323	1,00	33,97
	ÁTOMO 212	C GLY A 30	32,109	-7,243	28,536	1,00	31,86
	ÁTOMO 213	O GLY A 30	32,227	-7,275	27,305	1,00	34,94
55	ÁTOMO 214	N TYR A 31	32,265	-8,325	29,275	1,00	23,05
	ÁTOMO 215	CA TYR A 31	32,723	-9,576	28,690	1,00	25,72
60	ÁTOMO 216	CB TYR A 31	33,144	-10,505	29,813	1,00	21,15
	ÁTOMO 217	CG TYR A 31	34,274	-9,992	30,633	1,00	24,03
	ÁTOMO 218	CD1 TYR A 31	34,066	-9,497	31,892	1,00	17,01
65	ÁTOMO 219	CE1 TYR A 31	35,106	-8,997	32,644	1,00	26,09

ES 2 278 020 T3

	ÁTOMO 220	CD2 TYR A 31	35,579	-9,983	30,121	1,00	29,13
5	ÁTOMO 221	CE2 TYR A 31	36,616	-9,502	30,870	1,00	25,81
	ÁTOMO 222	CZ TYR A 31	36,383	-9,009	32,115	1,00	25,77
	ÁTOMO 223	OH TYR A 31	37,419	-8,560	32,875	1,00	34,26
10	ÁTOMO 224	C TYR A 31	31,678	-10,274	27,840	1,00	29,45
	ÁTOMO 225	O TYR A 31	30,468	-10,172	28,112	1,00	30,08
	ÁTOMO 226	N GLY A 32	32,141	-10,990	26,808	1,00	29,62
15	ÁTOMO 227	CA GLY A 32	31,228	-11,746	25,972	1,00	33,28
	ÁTOMO 228	C GLY A 32	30,235	-10,912	25,198	1,00	36,13
20	ÁTOMO 229	O GLY A 32	29,161	-11,380	24,832	1,00	32,23
	ÁTOMO 230	N SER A 33	30,606	-9,668	24,937	1,00	41,08
	ÁTOMO 231	CA SER A 33	29,722	-8,787	24,217	1,00	47,10
25	ÁTOMO 232	CB SER A 33	30,130	-7,331	24,386	1,00	46,73
	ÁTOMO 233	OG SER A 33	29,397	-6,557	23,463	1,00	52,64
	ÁTOMO 234	C SER A 33	29,816	-9,142	22,764	1,00	57,93
30	ÁTOMO 235	O SER A 33	30,807	-9,735	22,317	1,00	57,01
	ÁTOMO 236	N SER A 34	28,772	-8,755	22,039	1,00	65,04
	ÁTOMO 237	CA SER A 34	28,657	-8,989	20,613	1,00	70,41
35	ÁTOMO 238	CB SER A 34	28,414	-7,659	19,899	1,00	72,65
	ÁTOMO 239	OG SER A 34	27,049	-7,299	19,995	1,00	72,85
40	ÁTOMO 240	C SER A 34	29,885	-9,671	20,028	1,00	71,58
	ÁTOMO 241	O SER A 34	30,642	-9,053	19,289	1,00	69,77
	ÁTOMO 242	CB THR A 41	30,810	6,812	19,043	1,00	59,11
45	ÁTOMO 243	OG1 THR A 41	29,666	5,952	18,975	1,00	64,04
	ÁTOMO 244	CG2 THR A 41	31,511	6,892	17,700	1,00	59,18
	ÁTOMO 245	C THR A 41	31,044	6,416	21,449	1,00	51,54
50	ÁTOMO 246	O THR A 41	30,689	5,415	22,079	1,00	55,44
	ÁTOMO 247	N THR A 41	32,206	4,887	19,817	1,00	58,60
	ÁTOMO 248	CA THR A 41	31,763	6,289	20,105	1,00	57,60
55	ÁTOMO 249	N GLY A 42	30,804	7,654	21,870	1,00	35,08
	ÁTOMO 250	CA GLY A 42	30,159	7,853	23,151	1,00	21,75
	ÁTOMO 251	C GLY A 42	29,409	9,184	23,225	1,00	18,36
60	ÁTOMO 252	O GLY A 42	29,011	9,724	22,200	1,00	21,32
	ÁTOMO 253	N ILE A 43	29,298	9,708	24,431	1,00	21,07
65	ÁTOMO 254	CA ILE A 43	28,475	10,899	24,619	1,00	22,17

ES 2 278 020 T3

	ÁTOMO 255	CB ILE A 43	28,247	11,113	26,148	1,00	18,01
5	ÁTOMO 256	CG2 ILE A 43	29,474	11,764	26,819	1,00	20,05
	ÁTOMO 257	CG1 ILE A 43	27,124	12,102	26,413	1,00	20,02
	ÁTOMO 258	CD1 ILE A 43	26,793	12,170	27,882	1,00	22,13
10	ÁTOMO 259	C ILE A 43	28,947	12,145	23,921	1,00	25,61
	ÁTOMO 260	O ILE A 43	28,118	12,955	23,466	1,00	18,04
	ÁTOMO 261	N VAL A 44	30,260	12,336	23,748	1,00	19,35
15	ÁTOMO 262	CA VAL A 44	30,629	13,560	23,090	1,00	19,83
	ÁTOMO 263	CB VAL A 44	32,187	13,809	23,157	1,00	22,51
	ÁTOMO 264	CG1 VAL A 44	32,587	14,916	22,238	1,00	29,90
20	ÁTOMO 265	CG2 VAL A 44	32,568	14,056	24,605	1,00	22,31
	ÁTOMO 266	C VAL A 44	30,137	13,492	21,655	1,00	18,37
	ÁTOMO 267	O VAL A 44	29,664	14,477	21,127	1,00	20,08
25	ÁTOMO 268	N ASP A 45	30,257	12,308	21,027	1,00	19,78
	ÁTOMO 269	CA ASP A 45	29,821	12,142	19,657	1,00	22,36
30	ÁTOMO 270	CB ASP A 45	30,132	10,738	19,207	1,00	29,90
	ÁTOMO 271	CG ASP A 45	31,588	10,395	19,435	1,00	38,30
	ÁTOMO 272	OD1 ASP A 45	32,374	10,700	18,516	1,00	34,84
35	ÁTOMO 273	OD2 ASP A 45	31,929	9,881	20,546	1,00	39,04
	ÁTOMO 274	C ASP A 45	28,304	12,345	19,531	1,00	23,03
	ÁTOMO 275	O ASP A 45	27,830	13,023	18,613	1,00	22,16
40	ÁTOMO 276	N GLU A 46	27,610	11,772	20,489	1,00	21,13
	ÁTOMO 277	CA GLU A 46	26,139	11,784	20,505	1,00	24,96
	ÁTOMO 278	CB GLU A 46	25,676	10,660	21,418	1,00	32,84
45	ÁTOMO 279	CG GLU A 46	24,220	10,314	21,307	1,00	38,09
	ÁTOMO 280	CD GLU A 46	23,877	8,973	21,913	1,00	41,51
50	ÁTOMO 281	OE1 GLU A 46	24,713	8,378	22,621	1,00	41,76
	ÁTOMO 282	OE2 GLU A 46	22,739	8,505	21,689	1,00	45,60
	ÁTOMO 283	C GLU A 46	25,472	13,084	20,952	1,00	24,92
55	ÁTOMO 284	O GLU A 46	24,450	13,450	20,376	1,00	23,35
	ÁTOMO 285	N CYS A 47	26,045	13,747	21,970	1,00	20,20
	ÁTOMO 286	CA CYS A 47	25,477	14,961	22,590	1,00	19,56
60	ÁTOMO 287	C CYS A 47	26,174	16,282	22,474	1,00	28,23
	ÁTOMO 288	O CYS A 47	25,563	17,328	22,769	1,00	21,99
65	ÁTOMO 289	CB CYS A 47	25,240	14,687	24,091	1,00	21,60

ES 2 278 020 T3

	ÁTOMO 290	SG CYS A 47	24,245	13,186	24,373	1,00	26,79
5	ÁTOMO 291	N CYS A 47	27,452	16,263	22,074	1,00	18,45
	ÁTOMO 292	CA CYS A 48	28,181	17,537	21,940	1,00	17,21
	ÁTOMO 293	C CYS A 48	28,382	17,818	20,473	1,00	19,88
10	ÁTOMO 294	O CYS A 48	28,082	18,890	20,040	1,00	23,54
	ÁTOMO 295	CB CYS A 48	29,521	17,456	22,686	1,00	22,56
	ÁTOMO 296	SG CYS A 48	30,678	18,814	22,279	1,00	25,89
15	ÁTOMO 297	N PHE A 49	28,854	16,830	19,706	1,00	19,44
	ÁTOMO 298	CA PHE A 49	29,044	17,010	18,279	1,00	26,47
	ÁTOMO 299	CB PHE A 49	29,939	15,912	17,710	1,00	27,72
20	ÁTOMO 300	CG PHE A 49	31,343	15,940	18,268	1,00	32,07
	ÁTOMO 301	CD1 PHE A 49	32,098	14,764	18,363	1,00	31,76
	ÁTOMO 302	CD2 PHE A 49	31,902	17,133	18,703	1,00	29,85
25	ÁTOMO 303	CE1 PHE A 49	33,396	14,798	18,889	1,00	32,64
	ÁTOMO 304	CE2 PHE A 49	33,203	17,153	19,230	1,00	29,98
	ÁTOMO 305	CZ PHE A 49	33,938	15,987	19,320	1,00	24,87
30	ÁTOMO 306	C PHE A 49	27,706	17,000	17,573	1,00	27,42
	ÁTOMO 307	O PHE A 49	27,561	17,598	16,517	1,00	31,83
35	ÁTOMO 308	N ARG A 50	26,744	16,298	18,167	1,00	29,59
	ÁTOMO 309	CA ARG A 50	25,381	16,219	17,640	1,00	26,05
	ÁTOMO 310	CB ARG A 50	25,106	14,832	17,157	1,00	23,82
40	ÁTOMO 311	CG ARG A 50	25,916	14,488	15,899	1,00	26,06
	ÁTOMO 312	CD ARG A 50	25,953	13,031	15,742	1,00	29,51
	ÁTOMO 313	NE ARG A 50	26,583	12,750	14,479	1,00	39,53
45	ÁTOMO 314	CZ ARG A 50	27,849	12,386	14,370	1,00	41,06
	ÁTOMO 315	NH1 ARG A 50	28,603	12,260	15,466	1,00	40,37
	ÁTOMO 316	NH2 ARG A 50	28,354	12,198	13,163	1,00	40,98
50	ÁTOMO 317	C ARG A 50	24,434	16,539	18,794	1,00	25,89
	ÁTOMO 318	O ARG A 50	24,864	16,563	19,966	1,00	19,42
	ÁTOMO 319	N SER A 51	23,161	16,811	18,501	1,00	25,83
55	ÁTOMO 320	CA SER A 51	22,229	17,080	19,633	1,00	28,49
	ÁTOMO 321	CB SER A 51	21,122	18,072	19,248	1,00	29,44
60	ÁTOMO 322	OG SER A 51	20,679	17,787	17,954	1,00	42,62
	ÁTOMO 323	C SER A 51	21,569	15,761	20,025	1,00	22,34
	ÁTOMO 324	O SER A 51	21,229	14,963	19,164	1,00	28,05

65

ES 2 278 020 T3

	ÁTOMO 325	N CYS A 52	21,385	15,517	21,325	1,00	21,96
5	ÁTOMO 326	CA CYS A 52	20,771	14,278	21,762	1,00	24,73
	ÁTOMO 327	C CYS A 52	19,637	14,683	22,708	1,00	25,51
	ÁTOMO 328	O CYS A 52	19,616	15,780	23,240	1,00	23,80
10	ÁTOMO 329	CB CYS A 52	21,791	13,373	22,494	1,00	24,55
	ÁTOMO 330	SG CYS A 52	22,331	13,922	24,151	1,00	28,05
	ÁTOMO 331	N ASP A 53	18,671	13,815	22,896	1,00	27,35
15	ÁTOMO 332	CA ASP A 53	17,622	14,228	23,789	1,00	28,62
	ÁTOMO 333	CB ASP A 53	16,248	13,872	23,201	1,00	34,84
	ÁTOMO 334	CG ASP A 53	16,078	12,408	22,968	1,00	39,80
20	ÁTOMO 335	OD1 ASP A 53	16,598	11,616	23,782	1,00	44,65
	ÁTOMO 336	OD2 ASP A 53	15,413	12,052	21,965	1,00	46,35
25	ÁTOMO 337	C ASP A 53	17,848	13,616	25,147	1,00	23,60
	ÁTOMO 338	O ASP A 53	18,735	12,762	25,324	1,00	21,40
	ÁTOMO 339	N LEU A 54	17,012	14,005	26,099	1,00	20,38
30	ÁTOMO 340	CA LEU A 54	17,163	13,558	27,477	1,00	14,25
	ÁTOMO 341	CB LEU A 54	16,015	14,169	28,329	1,00	21,53
	ÁTOMO 342	CG LEU A 54	16,024	13,807	29,805	1,00	22,22
35	ÁTOMO 343	CD1 LEU A 54	17,283	14,383	30,476	1,00	21,85
	ÁTOMO 344	CD2 LEU A 54	14,733	14,336	30,497	1,00	20,36
	ÁTOMO 345	C LEU A 54	17,276	12,046	27,683	1,00	23,79
40	ÁTOMO 346	O LEU A 54	18,075	11,598	28,496	1,00	23,74
	ÁTOMO 347	N ARG A 55	16,449	11,253	26,978	1,00	23,24
	ÁTOMO 348	CA ARG A 55	16,489	9,795	27,104	1,00	26,67
45	ÁTOMO 349	CB ARG A 55	15,469	9,140	26,140	1,00	33,74
	ÁTOMO 350	CG ARG A 55	14,013	9,234	26,618	1,00	47,08
50	ÁTOMO 351	CD ARG A 55	13,838	8,500	27,974	1,00	59,43
	ÁTOMO 352	NE ARG A 55	13,580	9,398	29,104	1,00	68,64
	ÁTOMO 353	CZ ARG A 55	14,359	9,527	30,182	1,00	73,73
55	ÁTOMO 354	NH1 ARG A 55	15,485	8,813	30,302	1,00	74,93
	ÁTOMO 355	NH2 ARG A 55	14,028	10,401	31,134	1,00	72,23
	ÁTOMO 356	C ARG A 55	17,876	9,229	26,774	1,00	25,72
60	ÁTOMO 357	O ARG A 55	18,365	8,348	27,470	1,00	28,77
	ÁTOMO 358	N ARG A 56	18,482	9,765	25,726	1,00	21,19
65	ÁTOMO 359	CA ARG A 56	19,785	9,285	25,276	1,00	27,70

ES 2 278 020 T3

	ÁTOMO 360	CB ARG A 56	20,049	9,798	23,892	1,00	35,27
5	ÁTOMO 361	CG ARG A 56	19,140	9,134	22,892	1,00	42,72
	ÁTOMO 362	CD ARG A 56	19,352	7,624	22,897	1,00	52,32
	ÁTOMO 363	NE ARG A 56	20,565	7,280	22,150	1,00	59,61
10	ÁTOMO 364	CZ ARG A 56	21,142	6,075	22,108	1,00	61,66
	ÁTOMO 365	NH1 ARG A 56	20,646	5,046	22,789	1,00	64,42
	ÁTOMO 366	NH2 ARG A 56	22,244	5,906	21,389	1,00	62,77
15	ÁTOMO 367	C ARG A 56	20,850	9,724	26,246	1,00	25,14
	ÁTOMO 368	O ARG A 56	21,755	8,952	26,618	1,00	25,99
20	ÁTOMO 369	N LEU A 57	20,743	10,967	26,689	1,00	21,87
	ÁTOMO 370	CA LEU A 57	21,684	11,448	27,701	1,00	22,79
	ÁTOMO 371	CB LEU A 57	21,367	12,923	28,059	1,00	22,01
25	ÁTOMO 372	CG LEU A 57	22,188	13,715	29,089	1,00	22,86
	ÁTOMO 373	CD1 LEU A 57	21,537	15,099	29,190	1,00	27,83
	ÁTOMO 374	CD2 LEU A 57	22,115	13,120	30,453	1,00	32,64
30	ÁTOMO 375	C LEU A 57	21,665	10,578	28,970	1,00	20,53
	ÁTOMO 376	O LEU A 57	22,720	10,208	29,525	1,00	19,79
	ÁTOMO 377	N GLU A 58	20,486	10,199	29,479	1,00	18,07
35	ÁTOMO 378	CA GLU A 58	20,425	9,390	30,682	1,00	17,97
	ÁTOMO 379	CB GLU A 58	18,951	9,351	31,198	1,00	24,34
	ÁTOMO 380	CG GLU A 58	18,883	8,941	32,660	1,00	36,31
40	ÁTOMO 381	CD GLU A 58	17,473	9,016	33,227	1,00	41,86
	ÁTOMO 382	OE1 GLU A 58	17,316	8,902	34,474	1,00	39,29
	ÁTOMO 383	OE2 GLU A 58	16,549	9,198	32,406	1,00	36,76
45	ÁTOMO 384	C GLU A 58	21,005	7,942	30,537	1,00	14,19
	ÁTOMO 385	O GLU A 58	21,331	7,279	31,508	1,00	26,60
50	ÁTOMO 386	N MET A 59	21,172	7,487	29,307	1,00	15,83
	ÁTOMO 387	CA MET A 59	21,767	6,166	29,115	1,00	21,59
	ÁTOMO 388	CB MET A 59	21,626	5,746	27,672	1,00	23,71
55	ÁTOMO 389	CG MET A 59	20,195	5,145	27,372	1,00	27,46
	ÁTOMO 390	SD MET A 59	19,916	5,067	25,648	1,00	38,20
	ÁTOMO 391	CE MET A 59	18,000	5,126	25,597	1,00	38,66
60	ÁTOMO 392	C MET A 59	23,261	6,169	29,521	1,00	23,34
	ÁTOMO 393	O MET A 59	23,859	5,124	29,663	1,00	25,38
65	ÁTOMO 394	N TYR A 60	23,847	7,353	29,726	1,00	19,16

ES 2 278 020 T3

	ÁTOMO 395	CA TYR A 60	25,266	7,386	30,144	1,00	18,17
5	ÁTOMO 396	CB TYR A 60	25,982	8,549	29,452	1,00	18,20
	ÁTOMO 397	CG TYR A 60	26,144	8,364	27,992	1,00	20,05
	ÁTOMO 398	CD1 TYR A 60	25,193	8,855	27,086	1,00	20,40
10	ÁTOMO 399	CE1 TYR A 60	25,339	8,675	25,713	1,00	22,99
	ÁTOMO 400	CD2 TYR A 60	27,245	7,686	27,482	1,00	23,58
	ÁTOMO 401	CE2 TYR A 60	27,398	7,501	26,131	1,00	24,88
15	ÁTOMO 402	CZ TYR A 60	26,475	7,980	25,258	1,00	25,27
	ÁTOMO 403	OH TYR A 60	26,676	7,780	23,940	1,00	24,52
	ÁTOMO 404	C TYR A 60	25,406	7,424	31,634	1,00	22,93
20	ÁTOMO 405	O TYR A 60	26,519	7,507	32,199	1,00	22,51
	ÁTOMO 406	N CYS A 61	24,290	7,385	32,352	1,00	18,42
25	ÁTOMO 407	CA CYS A 61	24,402	7,303	33,809	1,00	15,63
	ÁTOMO 408	C CYS A 61	24,808	5,872	34,207	1,00	19,70
	ÁTOMO 409	O CYS A 61	24,394	4,908	33,563	1,00	25,04
30	ÁTOMO 410	CB CYS A 61	23,065	7,562	34,511	1,00	22,45
	ÁTOMO 411	SG CYS A 62	22,415	9,181	34,212	1,00	24,27
	ÁTOMO 412	N ALA A 62	25,543	5,738	35,298	1,00	24,74
35	ÁTOMO 413	CA ALA A 62	26,004	4,424	35,756	1,00	31,14
	ÁTOMO 414	CB ALA A 62	27,273	4,588	36,641	1,00	24,85
	ÁTOMO 415	C ALA A 62	24,902	3,747	36,563	1,00	36,05
40	ÁTOMO 416	O ALA A 62	23,920	4,394	36,962	1,00	33,02
	ÁTOMO 417	N PRO A 63	25,014	2,427	36,780	1,00	44,06
	ÁTOMO 418	CD PRO A 63	26,021	1,447	36,310	1,00	47,05
45	ÁTOMO 419	CA PRO A 63	23,942	1,803	37,576	1,00	46,88
	ÁTOMO 420	CB PRO A 63	24,182	0,296	37,393	1,00	47,68
50	ÁTOMO 421	CG PRO A 63	25,651	0,166	37,068	1,00	49,88
	ÁTOMO 422	C PRO A 63	24,111	2,253	39,027	1,00	48,13
	ÁTOMO 423	O PRO A 63	23,135	2,412	39,773	1,00	54,36
55	ÁTOMO 424	N LEU A 64	25,379	2,467	39,379	1,00	51,56
	ÁTOMO 425	CA LEU A 64	25,835	2,896	40,693	1,00	61,37
	ÁTOMO 426	CB LEU A 64	26,997	1,994	41,170	1,00	63,79
60	ÁTOMO 427	CG LEU A 64	26,761	0,984	42,312	1,00	60,23
	ÁTOMO 428	CD1 LEU A 64	26,872	-0,435	41,767	1,00	61,06
	ÁTOMO 429	CD2 LEU A 64	27,781	1,210	43,447	1,00	58,43

65

ES 2 278 020 T3

	ÁTOMO 430	C LEU A 64	26,327	4,343	40,607	1,00	67,33
5	ÁTOMO 431	O LEU A 64	27,441	4,612	40,132	1,00	71,54
	ÁTOMO 432	C1 CYC B 1	19,808	21,082	25,297	1,00	29,47
	ÁTOMO 433	C6 CYC B 1	19,974	19,730	24,564	1,00	31,45
10	ÁTOMO 434	O21 CYC B 1	21,316	19,561	24,000	1,00	30,05
	ÁTOMO 435	C5 CYC B 1	19,707	18,570	25,545	1,00	24,70
	ÁTOMO 436	C4 CYC B 1	18,349	18,647	26,185	1,00	28,97
15	ÁTOMO 437	C11 CYC B 1	18,069	17,503	27,203	1,00	25,55
	ÁTOMO 438	C10 CYC B 1	18,915	17,625	28,449	1,00	26,59
20	ÁTOMO 439	C9 CYC B 1	18,774	19,062	29,167	1,00	22,28
	ÁTOMO 440	C15 CYC B 1	19,668	19,202	30,407	1,00	18,50
	ÁTOMO 441	C18 CYC B 1	19,488	18,173	31,529	1,00	17,96
25	ÁTOMO 442	C17 CYC B 1	20,033	18,861	32,738	1,00	20,63
	ÁTOMO 443	C16 CYC B 1	20,478	20,370	32,210	1,00	19,19
	ÁTOMO 444	C43 CYC B 1	20,408	21,271	33,357	1,00	17,91
30	ÁTOMO 445	C55 CYC B 1	21,476	20,723	34,438	1,00	26,47
	ÁTOMO 446	C56 CYC B 1	21,498	21,442	35,738	1,00	31,90
	ÁTOMO 447	C57 CYC B 1	22,417	22,653	36,015	1,00	39,26
35	ÁTOMO 448	N59 CYC B 1	22,473	23,332	37,133	1,00	46,97
	ÁTOMO 449	C74 CYC B 1	23,443	24,507	37,216	1,00	56,76
40	ÁTOMO 450	C75 CYC B 1	22,897	25,835	36,400	1,00	62,01
	ÁTOMO 451	C76 CYC B 1	23,920	27,038	36,528	1,00	66,74
	ÁTOMO 452	N77 CYC B 1	23,715	27,349	37,968	1,00	68,00
45	ÁTOMO 453	C78 CYC B 1	24,623	27,135	39,017	1,00	72,42
	ÁTOMO 454	C80 CYC B 1	24,134	27,596	40,383	1,00	76,46
	ÁTOMO 455	O86 CYC B 1	22,731	28,037	40,272	1,00	73,03
50	ÁTOMO 456	C81 CYC B 1	25,194	28,755	40,862	1,00	85,35
	ÁTOMO 457	O87 CYC B 1	25,451	29,858	39,876	1,00	86,03
	ÁTOMO 458	C82 CYC B 1	24,767	29,384	42,284	1,00	92,20
55	ÁTOMO 459	O88 CYC B 1	23,400	29,939	42,115	1,00	92,22
	ÁTOMO 460	C83 CYC B 1	25,777	30,529	42,728	1,00	96,59
	ÁTOMO 461	O89 CYC B 1	27,124	29,924	42,873	1,00	99,38
60	ÁTOMO 462	C84 CYC B 1	25,395	31,205	44,130	1,00	97,03
	ÁTOMO 463	O85 CYC B 1	26,318	32,274	44,541	1,00	95,57
65	ÁTOMO 464	O79 CYC B 1	25,765	26,665	38,880	1,00	74,76

ES 2 278 020 T3

	ÁTOMO 465	C68 CYC B 1	21,737	23,120	38,324	1,00	39,41
5	ÁTOMO 466	C69 CYC B 1	20,223	23,496	38,137	1,00	38,89
	ÁTOMO 467	C70 CYC B 1	19,523	23,355	39,421	1,00	38,22
	ÁTOMO 468	N71 CYC B 1	20,564	22,987	40,353	1,00	50,02
10	ÁTOMO 469	C72 CYC B 1	20,399	22,763	41,607	1,00	55,62
	ÁTOMO 470	C90 CYC B 1	21,157	21,536	42,121	1,00	57,83
	ÁTOMO 471	O96 CYC B 1	20,407	20,319	41,993	1,00	56,55
15	ÁTOMO 472	C91 CYC B 1	21,664	21,940	43,578	1,00	63,18
	ÁTOMO 473	O97 CYC B 1	21,600	20,757	44,471	1,00	63,88
	ÁTOMO 474	C92 CYC B 1	23,186	22,499	43,622	1,00	66,58
20	ÁTOMO 475	O98 CYC B 1	23,971	21,462	44,307	1,00	68,12
	ÁTOMO 476	C93 CYC B 1	23,135	23,867	44,446	1,00	67,49
	ÁTOMO 477	O99 CYC B 1	22,357	24,774	43,597	1,00	66,74
25	ÁTOMO 478	C94 CYC B 1	24,493	24,656	44,683	1,00	74,63
	ÁTOMO 479	O95 CYC B 1	24,178	25,865	45,490	1,00	80,12
30	ÁTOMO 480	O73 CYC B 1	19,735	23,526	42,349	1,00	63,35
	ÁTOMO 481	O58 CYC B 1	23,106	22,977	35,125	1,00	40,42
	ÁTOMO 482	C54 CYC B 1	20,742	22,893	32,977	1,00	18,54
35	ÁTOMO 483	C14 CYC B 1	19,521	20,648	31,087	1,00	23,61
	ÁTOMO 484	C19 CYC B 1	17,911	20,963	31,644	1,00	16,19
	ÁTOMO 485	C13 CYC B 1	19,810	21,781	30,035	1,00	19,97
40	ÁTOMO 486	O20 CYC B 1	21,223	21,655	29,535	1,00	19,41
	ÁTOMO 487	C12 CYC B 1	18,975	21,668	28,869	1,00	17,80
	ÁTOMO 488	C8 CYC B 1	19,095	20,197	28,184	1,00	20,86
45	ÁTOMO 489	C3 CYC B 1	18,129	20,072	26,867	1,00	26,70
	ÁTOMO 490	C7 CYC B 1	16,492	20,310	27,375	1,00	27,90
50	ÁTOMO 491	C2 CYC B 1	18,448	21,212	25,824	1,00	28,19
	ÁTOMO 492	BR BR C 1	34,062	6,612	30,395	0,50	33,08
	ÁTOMO 493	O HOH W 1	19,167	24,790	26,224	1,00	26,47
55	ÁTOMO 494	O HOH W 2	23,897	21,958	31,132	1,00	22,60
	ÁTOMO 495	O HOH W 3	21,553	23,642	27,485	1,00	29,42
	ÁTOMO 496	O HOH W 4	24,680	19,970	37,794	1,00	27,43
60	ÁTOMO 497	O HOH W 5	30,918	19,401	40,676	1,00	23,25
	ÁTOMO 498	O HOH W 6	16,708	17,200	40,896	1,00	28,59
	ÁTOMO 499	O HOH W 7	16,516	25,080	41,353	1,00	25,88

65

ES 2 278 020 T3

	ÁTOMO 500	O HOH W 8	18,741	11,412	20,841	1,00	29,70
5	ÁTOMO 501	O HOH W 9	27,307	23,459	25,693	1,00	22,59
	ÁTOMO 502	O HOH W 10	29,313	-4,298	41,568	1,00	37,18
	ÁTOMO 503	O HOH W 11	24,485	23,989	32,854	1,00	35,58
10	ÁTOMO 504	O HOH W 12	17,430	11,457	36,970	1,00	26,36
	ÁTOMO 505	O HOH W 13	22,518	16,744	15,421	1,00	37,65
	ÁTOMO 506	O HOH W 14	22,764	17,648	22,807	1,00	29,54
15	ÁTOMO 507	O HOH W 15	22,916	12,486	18,554	1,00	30,85
	ÁTOMO 508	O HOH W 16	21,127	13,160	16,233	1,00	67,05
	ÁTOMO 509	O HOH W 18	33,941	3,332	34,867	1,00	47,13
20	ÁTOMO 510	O HOH W 19	28,659	24,132	37,361	1,00	34,15
	ÁTOMO 511	O HOH W 20	26,049	12,100	38,687	1,00	43,38
25	ÁTOMO 512	O HOH W 22	22,998	5,484	43,119	1,00	56,07
	ÁTOMO 513	O HOH W 23	21,091	10,590	19,804	1,00	37,65
	ÁTOMO 514	O HOH W 24	27,553	20,681	37,920	1,00	40,51
30	ÁTOMO 515	O HOH W 25	21,539	4,646	32,538	1,00	35,17
	ÁTOMO 516	O HOH W 35	36,200	4,986	34,099	1,00	55,94
	ÁTOMO 517	O HOH W 36	25,301	25,430	41,805	1,00	45,43
35	ÁTOMO 518	O HOH W 37	28,063	14,145	40,069	1,00	39,11
	ÁTOMO 519	O HOH W 38	20,561	25,768	50,428	1,00	38,92
	ÁTOMO 520	O HOH W 39	22,841	23,744	25,080	1,00	40,88
40	ÁTOMO 521	O HOH W 40	16,781	11,726	39,998	1,00	65,62
	ÁTOMO 522	O HOH W 41	29,705	23,094	40,234	1,00	40,48
45	ÁTOMO 523	O HOH W 42	18,375	14,116	41,324	1,00	58,97
	ÁTOMO 524	O HOH W 43	15,538	9,778	20,639	1,00	61,25
	ÁTOMO 525	O HOH W 44	34,144	2,745	20,168	1,00	48,45
50	ÁTOMO 526	O HOH W 45	20,621	8,952	42,429	1,00	33,04
	ÁTOMO 527	O HOH W 46	17,087	6,329	28,850	1,00	32,70
	ÁTOMO 528	O HOH W 47	25,800	23,668	39,622	1,00	46,80
55	ÁTOMO 529	O HOH W 48	16,978	27,199	25,066	1,00	44,77
	ÁTOMO 530	O HOH W 49	22,764	7,118	24,736	1,00	38,06
	ÁTOMO 531	O HOH W 50	24,770	22,332	46,924	1,00	48,70
60	ÁTOMO 532	O HOH W 51	21,688	25,678	41,327	1,00	52,53
	ÁTOMO 533	O HOH W 52	19,396	17,922	42,396	1,00	53,49
65	ÁTOMO 534	O HOH W 53	21,375	18,431	46,997	1,00	57,91

ES 2 278 020 T3

5	ÁTOMO 535	O HOH W 54	19,736	20,961	17,193	1,00	46,33
	ÁTOMO 536	O HOH W 55	30,374	4,915	45,161	1,00	52,15
	ÁTOMO 537	O HOH W 56	18,588	26,408	48,436	1,00	44,58
	ÁTOMO 538	O HOH W 57	23,722	24,504	28,990	1,00	38,53
10							
15							
20							
25							
30							
35							
40							
45							
50							
55							
60							
65							

REIVINDICACIONES

1. Un cristal de IGF-1 que tiene aproximadamente las siguientes constantes celulares: $a = 31,831 \text{ \AA}$, $b = 71,055 \text{ \AA}$,
5 $c = 65,995 \text{ \AA}$ y un grupo espacial de $C222_1$ para permitir la determinación de la estructura tridimensional del IGF-1 mediante estudios de difracción de rayos X.
2. El cristal de la reivindicación 1, en el que el IGF-1 contiene una región A, B, C y D y forma un dímero en el
10 cristal y en el que el cristal contiene un sitio de unión al receptor en la interfase dimérica.
3. Una composición que contiene el cristal de la reivindicación 1 y un vehículo.
4. La composición de la reivindicación 3, en la que el IGF-1 es biológicamente activo cuando es resolubilizado.
- 15 5. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, para ser utilizada en un método de tratamiento de un mamífero que padezca un trastorno de agonista, comprendiendo dicho método la administración a dicho mamífero de una cantidad eficaz de la composición de la reivindicación 4.
- 20 6. La composición de la reivindicación 5, en la que el mamífero es humano.
7. La composición de la reivindicación 5, en la que el trastorno es diabetes, obesidad, una disfunción cardíaca, el desgaste relacionado con el SIDA, un trastorno renal, un trastorno neurológico, un trastorno de crecimiento de todo el organismo o un trastorno inmunológico.
- 25 8. Un método de cristalización del factor de crecimiento similar a insulina de tipo 1 (IGF-1) de SEC ID N°:1 que comprende las etapas:
 - (a) la mezcla de una solución acuosa que contiene dicho IGF-1 en una concentración de a 1 a 50 mg/ml
30 aproximadamente con una solución reservorio que contiene un precipitante seleccionado del grupo que consta de polietilén glicol, citrato de sodio, sulfato de amonio, cacodilato de sodio y una mezcla de los mismos, para formar un volumen mixto; y
 - (b) la cristalización del volumen mixto para producir cristales de IGF-1 que producen difracción de la radiación
35 de rayos X con el fin de producir un patrón de difracción que representa la estructura tridimensional del IGF-1 y que tienen aproximadamente las siguientes constantes celulares: $a = 31,831 \text{ \AA}$, $b = 71,055 \text{ \AA}$, $c = 65,995 \text{ \AA}$ y un grupo espacial $C222_1$ y $\alpha=\beta=\gamma$.
9. El método de la reivindicación 8, en el que el IGF-1 es obtenido de una célula procariótica.
- 40 10. El método de la reivindicación 8, en el que la solución acuosa de la etapa (a) contiene de 5 a 15 mg por ml de IGF-1 aproximadamente.
11. El método de la reivindicación 8, en el que el precipitante es polietilén glicol tamponado con citrato de sodio o
45 cacodilato de sodio.
12. El método de la reivindicación 11, en el que el precipitante está presente en la solución reservorio en una cantidad del 20 al 25% aproximadamente si es polietilén glicol, y de 1 a 10 M aproximadamente si es citrato de sodio, sulfato de amonio o cacodilato de sodio.
- 50 13. El método de la reivindicación 8, en el que la solución reservorio contiene además un detergente; en particular en el que el detergente está presente en una cantidad de 10 a 50 mM aproximadamente; en particular en el que el detergente es N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina.
14. El método de la reivindicación 8, en el que el pH de la solución reservorio es de 4 a 10 aproximadamente.
- 55 15. El método de la reivindicación 8, en el que el pH es 6,5 aproximadamente.
16. El método de la reivindicación 8, en el que la etapa (b) se lleva a cabo mediante cristalización por difusión de vapor, cristalización discontinua, cristalización por puente líquido o cristalización por diálisis; en particular en el que
60 la etapa (b) se lleva a cabo mediante cristalización por difusión de vapor.
17. El método de la reivindicación 8, que comprende además la recristalización del IGF-1 después de la etapa (b); en particular en el que la recristalización tiene lugar utilizando metilpentanodiol.
- 65 18. El método de la reivindicación 8, que comprende además el aislamiento del IGF-1 cristalino.

19. El método de la reivindicación 8, en el que la solución acuosa es mezclada con polietilén glicol al 24% aproximadamente tamponado a pH 6,5 aproximadamente con citrato de sodio 0,1 M aproximadamente o cacodilato de sodio 0,1 M aproximadamente y 1 μ l aproximadamente del detergente N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamina 1,4 mM aproximadamente, esta solución es equilibrada mediante cristalización por difusión de vapor con 1 ml aproximadamente de polietilén glicol al 24% aproximadamente tamponado a pH 6,5 aproximadamente con citrato de sodio 0,1 M aproximadamente o cacodilato de sodio 0,1 M aproximadamente hasta que forman gotitas de cristalización, y se añaden a las gotitas de cristalización 2 μ l aproximadamente de metilpentanodiol al 100% aproximadamente con el fin de disolver los cristales durante una noche y formar de este modo nuevos cristales.

20. IGF-1 cristalino producido mediante el método de la reivindicación 8.

21. Un método para determinar una estructura tridimensional del IGF-1 que comprende:

(a) la cristalización del IGF-1 mediante el método de acuerdo con la reivindicación 8;

(b) la irradiación del IGF-1 cristalino que tiene aproximadamente las siguientes constantes celulares: $a = 31,831 \text{ \AA}$, $b = 71,055 \text{ \AA}$, $c = 65,995 \text{ \AA}$ y un grupo espacial de $C222_1$, con el fin de obtener un patrón de difracción característico del IGF-1 cristalino; y

(c) la transformación del patrón de difracción en la estructura tridimensional del IGF-1.

22. Un método para utilizar una estructura tridimensional del IGF-1 derivada de un cristal de IGF-1 de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la estructura tridimensional del IGF-1 incluye una región de unión al receptor de IGF-1, comprendiendo el método la identificación de compuestos con estructuras que interaccionen con la región de unión al receptor de la estructura tridimensional del IGF-1 y que funcionen como agonistas o antagonistas del IGF-1.

23. El método de la reivindicación 22, en el que la estructura tridimensional del IGF-1 incluye coordenadas del carbono alfa sustancialmente idénticas a las de la información estructural presentada en el Apéndice 1.

24. Un método para identificar agonistas o antagonistas del IGF-1 que comprende las etapas de:

(a) la cristalización del IGF-1 para formar un cristal de IGF-1 de acuerdo con la reivindicación 1, conteniendo los cristales de IGF-1 un grupo de residuos de aminoácidos que definen una región de unión al receptor de IGF-1;

(b) la irradiación de los cristales de IGF-1 de la etapa (a) para obtener un patrón de difracción de los cristales de IGF-1;

(c) la determinación de una estructura tridimensional de IGF-1 a partir del patrón de difracción, incluyendo la estructura una región de unión al receptor de IGF-1; y

(d) la identificación de un agonista o antagonista de IGF-1 que tenga una estructura tridimensional que reproduzca funcionalmente residuos esenciales para la unión al receptor de IGF-1, accesibles al solvente, que presenten la estructura tridimensional de la región de unión al receptor de IGF-1, teniendo dicho agonista o antagonista del IGF-1 una capacidad de transducción de señales alterada para las células sensibles a IGF-1 en comparación con IGF-1.

25. El método de la reivindicación 24, en el que los residuos accesibles al solvente no participan en la formación de la interfase del IGF-1.

26. Un método para diseñar un compuesto que remede la estructura de la superficie tridimensional del IGF-1 que comprende las etapas de:

(a) la determinación de la estructura tridimensional del IGF-1 a partir de un cristal de IGF-1 de acuerdo con la reivindicación 1; y

(b) el diseño de un compuesto que remede la estructura de la superficie tridimensional del IGF-1.

27. Un método para identificar un peptidomimético que se une a IGF-1 y bloquee la unión de una IGFBP o de un receptor que se une a IGF-1, que comprende las etapas:

(a) la búsqueda en una base de datos de estructuras moleculares con los parámetros estructurales o las coordenadas estructurales proporcionadas en el Apéndice 1; y

(b) la selección de una molécula de la base de datos que remede los parámetros estructurales o las coordenadas estructurales del IGF-1.

ES 2 278 020 T3

28. Un método para determinar al menos una porción de una estructura tridimensional de un complejo molecular, conteniendo dicho complejo IGF-1 y comprendiendo dicho método las etapas de:

- (a) la determinación de las coordenadas estructurales de un cristal de IGF-1 de acuerdo con la reivindicación 1;
- (b) el cálculo de fases a partir de las coordenadas estructurales;
- (c) el cálculo de un mapa de densidad electrónica a partir de las fases obtenidas en la etapa (b); y
- (d) la determinación de la estructura de al menos una porción del complejo sobre la base de dicho mapa de densidad electrónica.

29. El método de la reivindicación 28, en el que las coordenadas estructurales utilizadas en la etapa (a) son sustancialmente las mismas que las descritas en el Apéndice 1 o describen sustancialmente el mismo cristal que las coordenadas del Apéndice 1.

30. Un método para evaluar la capacidad de una entidad química para asociarse con IGF-1 o con un complejo del mismo, comprendiendo el método las etapas de:

- (a) el empleo de un medio computacional o experimental para llevar a cabo una operación de ajuste entre la entidad química y el IGF-1 que tiene las coordenadas estructurales descritas en el Apéndice 1 o un complejo del mismo, obteniendo de este modo datos relacionados con la asociación; y
- (b) el análisis de los datos obtenidos en la etapa (a) para determinar las características de la asociación entre la entidad química y el IGF-1 o un complejo del mismo.

31. Un derivado de un átomo pesado de una forma cristalizada de IGF-1 de acuerdo con las reivindicaciones 1 u 8.

* * * * * ** ! * ! ! *

IGF-1 G...PETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPOTGIVDECCFR-
 IGF-2 AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPAS...RVSRRSR...GIVEECCFR-
 INS F...VNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK.....GIVEQCCTS-

! *

IGF-1 SCDLRRLEMYCAPLKPAKSA (SEC ID N°:1)
 IGF-2 SCDLALLETYCA T...PAKSE (SEC ID N°:2)
 INS ICSLYQLENYCN (SEC ID N°:3)

FIG._1

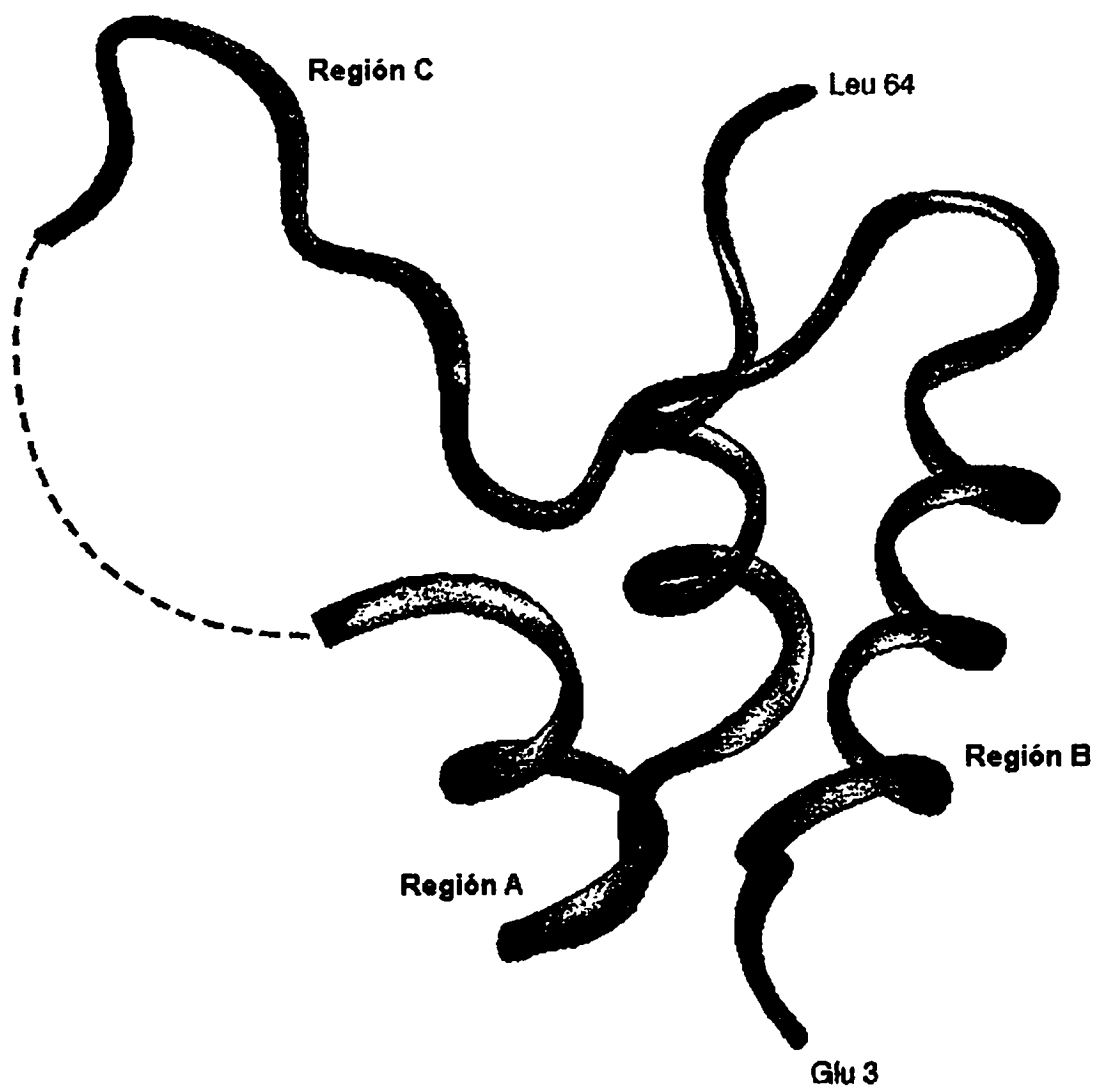
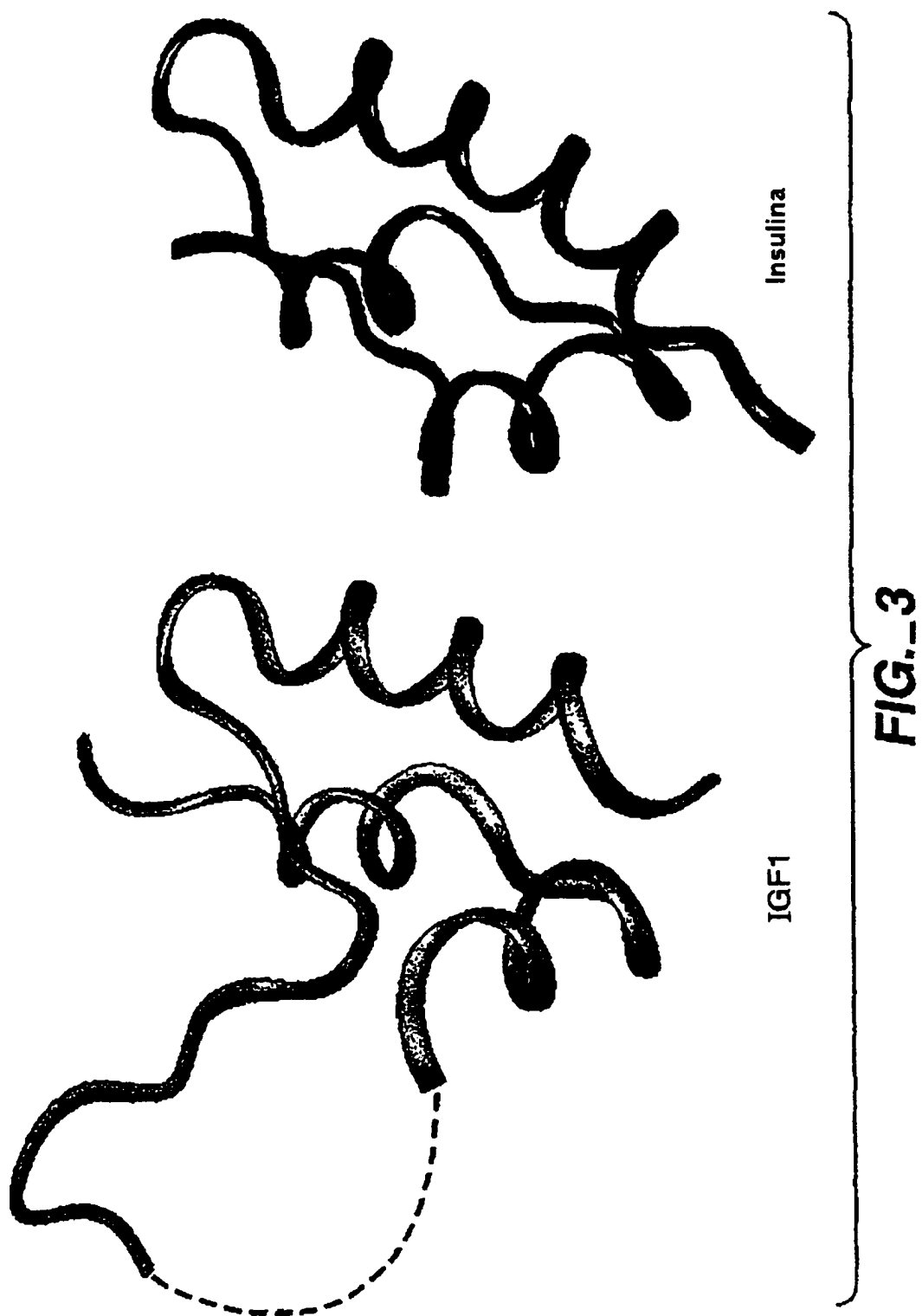


FIG._2



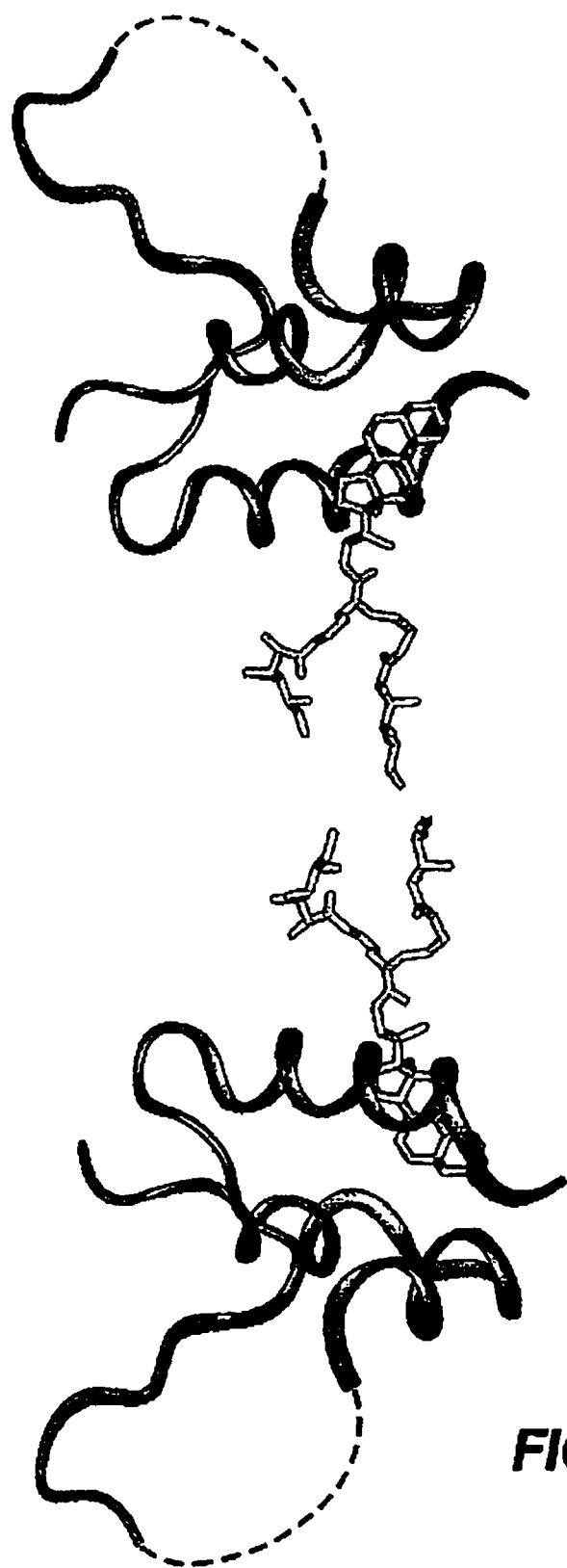
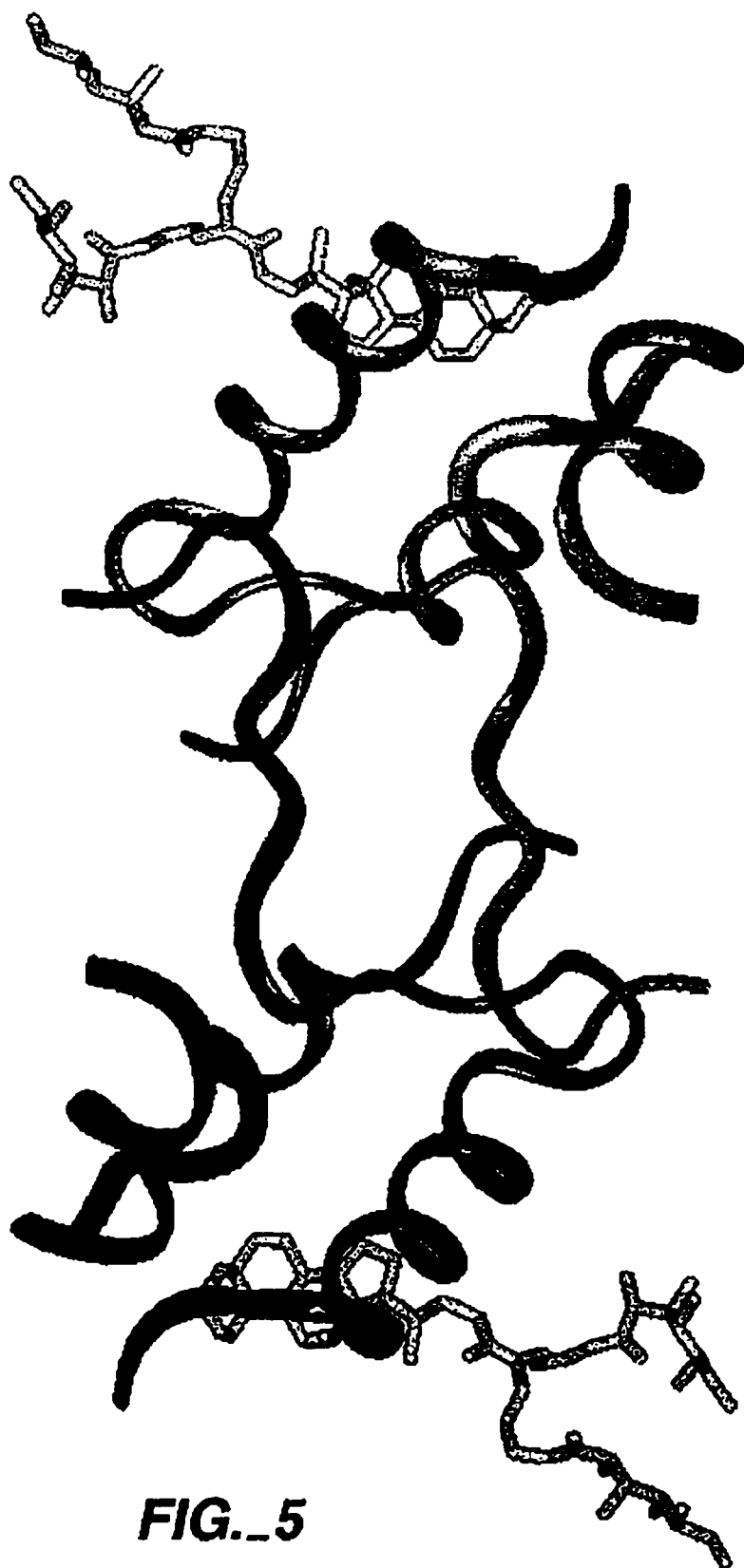


FIG. 4



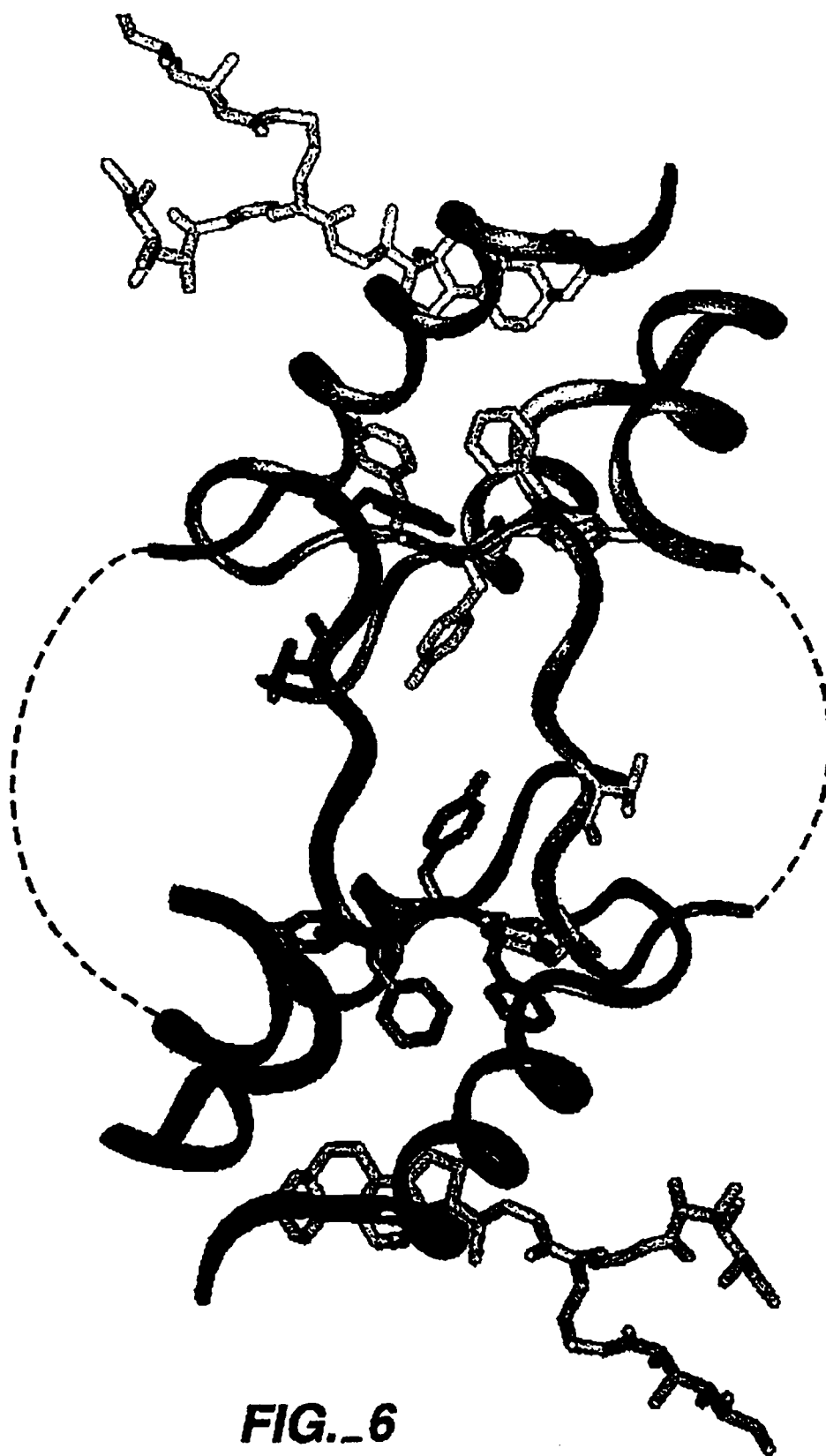


FIG._6

FIG._7A

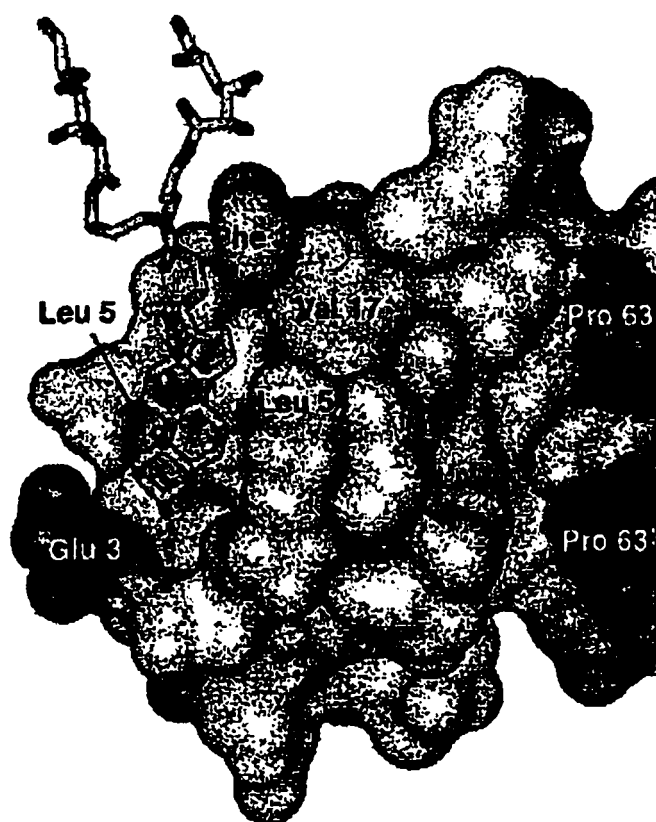
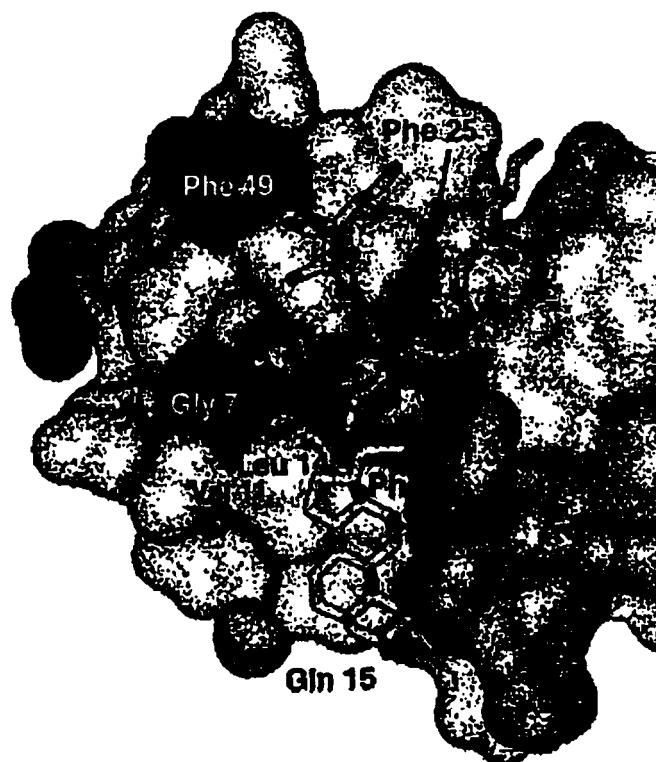


FIG._7B



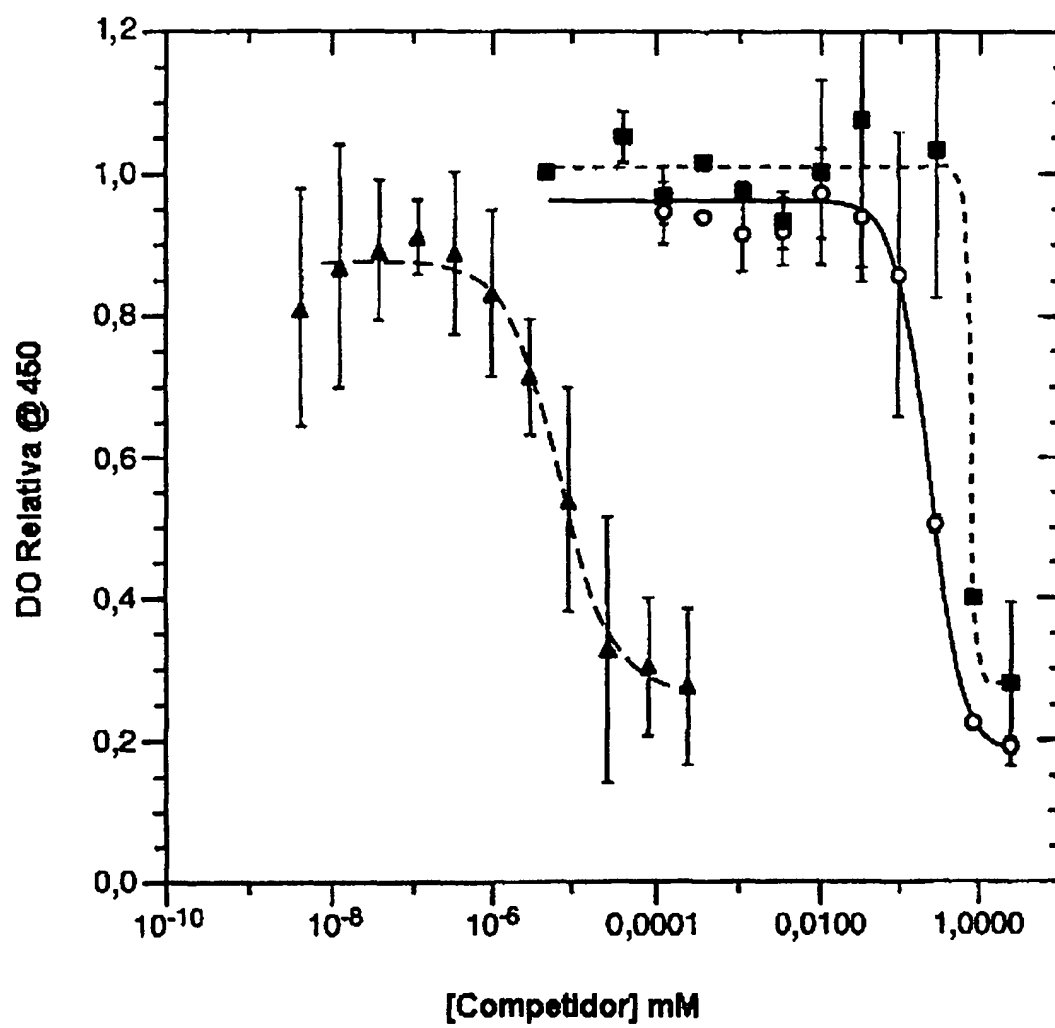


FIG. 8

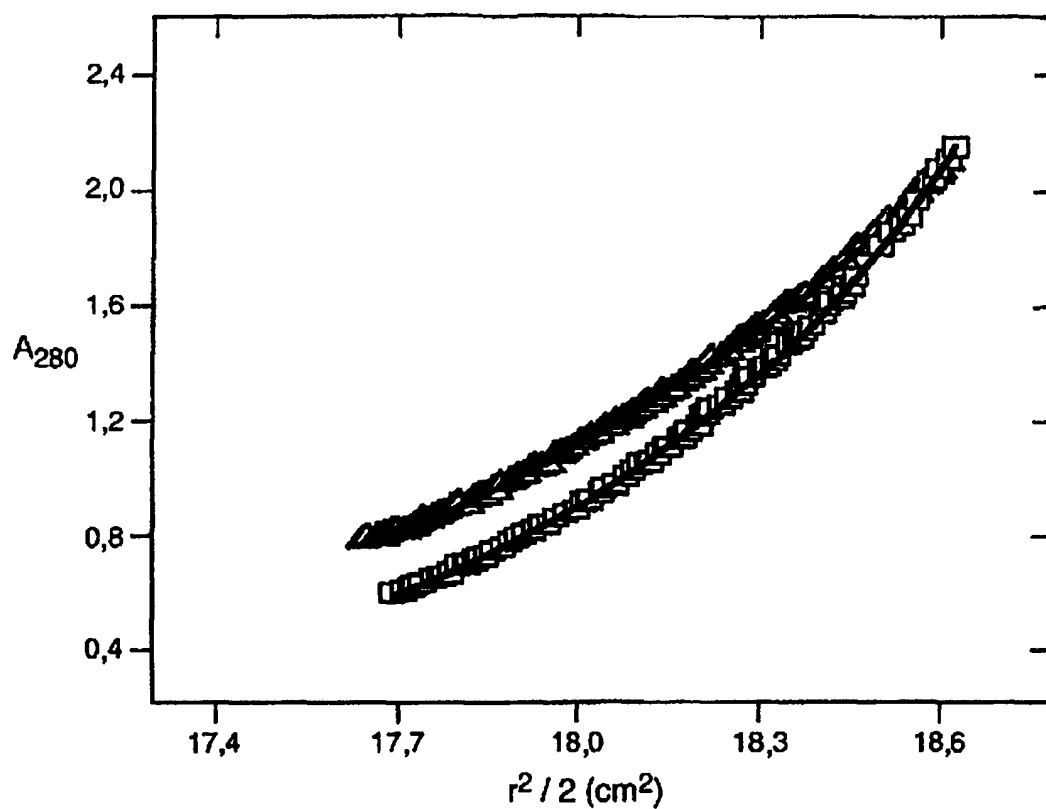


FIG._9A

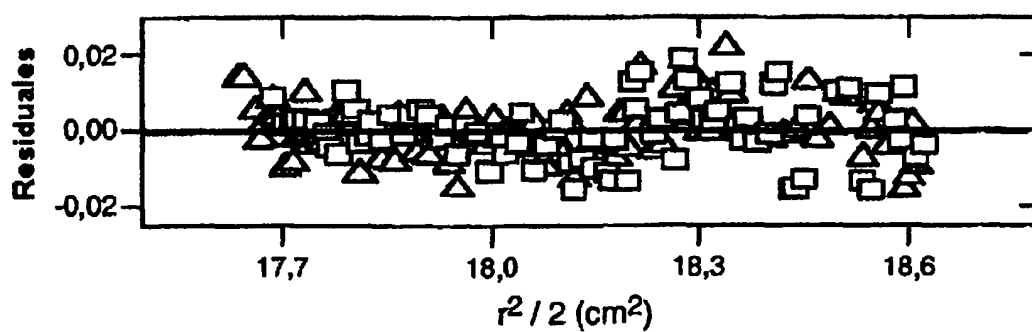


FIG._9B

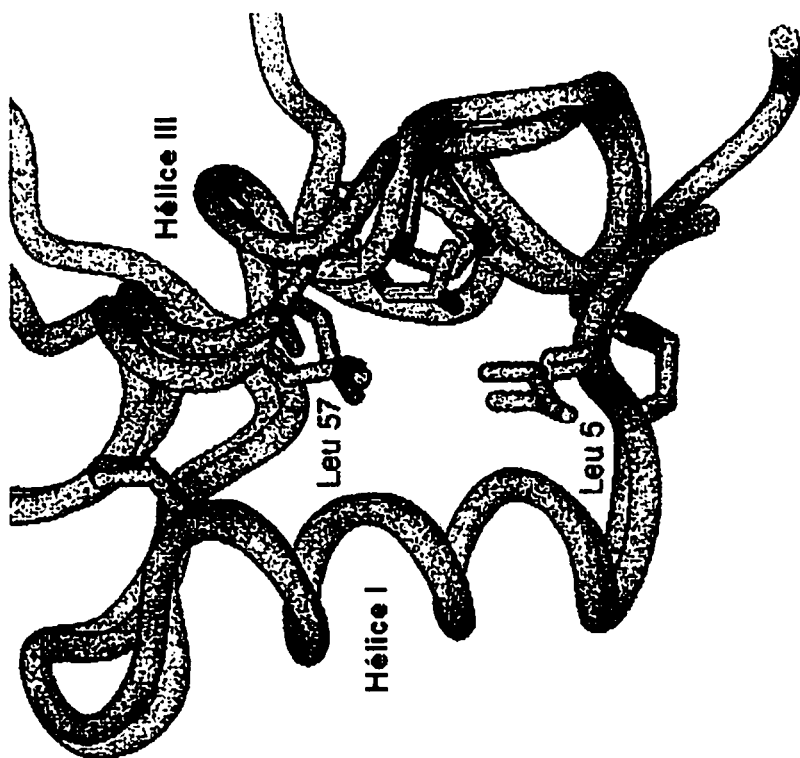


FIG._10B

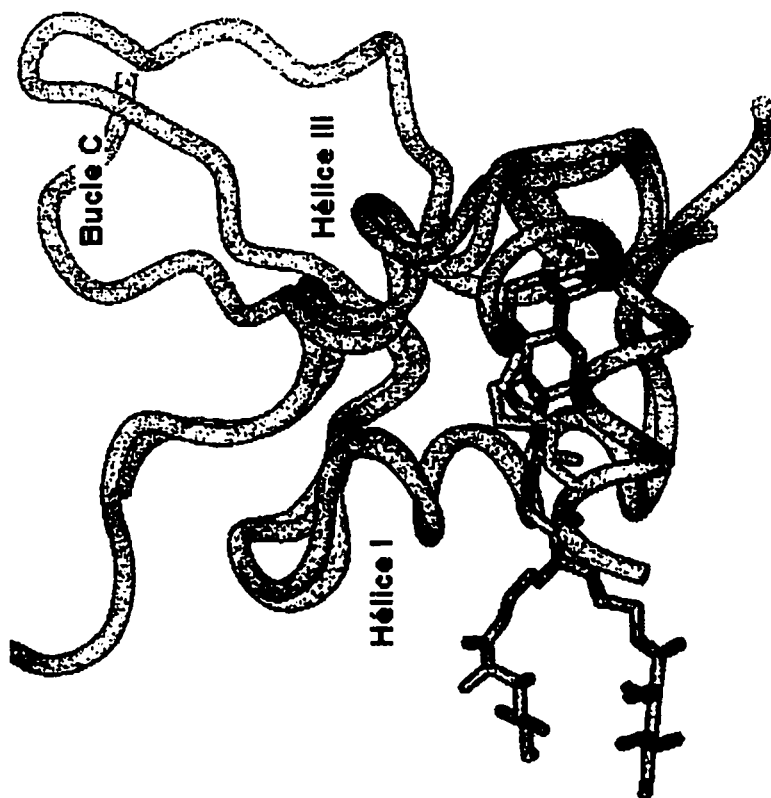


FIG._10A