

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 971**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2009 E 09704660 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015 EP 2252321**

54 Título: **Composición que comprende dos o más isoformas del factor de crecimiento de hepatocitos para uso en el tratamiento de revascularización incompleta del miocardio después de un injerto de derivación de la arteria coronaria**

30 Prioridad:

25.01.2008 US 23756 P

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

16.06.2015

73 Titular/es:

**VIROMED CO., LTD. (100.0%)
Building 203, College of Natural Science Seoul
National University San 56-1, Sinlim-dong
Gwanak-gu
Seoul 151-747, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, JONG-MOOK;
KIM, SUJEONG y
HAHN, WOONG**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 537 971 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición que comprende dos o más isoformas del factor de crecimiento de hepatocitos para uso en el tratamiento de revascularización incompleta del miocardio después de un injerto de derivación de la arteria coronaria

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere a métodos para tratar o prevenir afecciones cardíacas en un sujeto que comprenden administrar al sujeto dos o más isoformas del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). La presente descripción se refiere adicionalmente a métodos para promover el crecimiento de células endoteliales en un vaso sanguíneo que comprenden administrar al vaso sanguíneo dos o más isoformas del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). En una realización, las dos o más isoformas de HGF se administran en forma de uno o más polinucleótidos que codifican las isoformas.

Antecedentes de la invención

El HGF es una glicoproteína de unión a heparina también conocido como factor de dispersión o hepatopoyetina A. Originalmente identificado como un factor de crecimiento hepatotrófico potente (Nakamura et al., *Nature* 342: 440 (1989)), el HGF es una proteína de unión a heparina derivada del mesénquima que tiene múltiples efectos biológicos, tales como mitogénesis, motogénesis y morfogénesis de diversos tipos de células. Un gen que codifica el HGF se localiza en el cromosoma 7q21.1 y comprende 18 exones y 17 intrones, que tienen la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 (Seki T., et al., *Gene* 102: 213-219 (1991)). Un transcrito de aproximadamente 6 kb se transcribe a partir del gen de HGF, y a continuación se sintetiza a partir de ahí un polipéptido precursor de HGF completo (flHGF) que consiste en 728 aminoácidos, que comprende los siguientes dominios: bucle de horquilla N-terminal-kringle1-kringle2-kringle3-kringle4-dominio de serina proteasa inactivado. Al mismo tiempo, se sintetizan otras varias isoformas del polipéptido HGF mediante corte y empalme alternativo del gen de HGF. Las isoformas conocidas incluyen la variante por delección de HGF (HGF completo excepto por una delección de cinco residuos en kringle1), NK1 (bucle de horquilla N-terminal kringle1), NK2 (bucle de horquilla N-terminal kringle1-kringle2), y NK4 (bucle de horquilla N-terminal kringle1-kringle2-kringle3-kringle4). Además, existen variantes alélicas de cada isoforma. Los precursores biológicamente inactivos se pueden convertir en formas activas de heterodímero unido por enlaces disulfuro por una proteasa en el suero. En los heterodímeros, la cadena alfa que tiene un peso molecular elevado forma cuatro dominios kringle y un bucle de horquilla N-terminal como una región peptídica preactivada de plasminógeno. Los dominios kringle de una estructura de bucles unidos por tres enlaces disulfuro que consiste en aproximadamente 80 aminoácidos pueden jugar un papel importante en la interacción proteína-proteína. La cadena beta de bajo peso molecular forma un dominio de tipo serina proteasa inactivo. El dHGF que consiste en 723 aminoácidos es un polipéptido con una delección de cinco aminoácidos en el primer dominio kringle de la cadena alfa, es decir, F, L, P, S y S, debido al corte y empalme alternativo entre el exón 4 y el exón 5.

In vivo, se generan dos isoformas de HGF (flHGF que tiene 728 aminoácidos y dHGF que tiene 723 aminoácidos) por medio de corte y empalme alternativo entre el exón 4 y el exón 5. Aunque tanto flHGF como dHGF comparten varias funciones biológicas, son diferentes en términos de propiedades inmunológicas y varias propiedades biológicas.

Se ha demostrado que el HGF estimula la angiogénesis mediante la regulación del crecimiento de las células endoteliales y la migración de células musculares lisas vasculares. Debido a su actividad angiogénica, el HGF es considerado como uno de los candidatos prometedores en la angiogénesis terapéutica. "Angiogénesis terapéutica" se refiere a una intervención que utiliza factores angiogénicos, ya sea en forma de proteínas recombinantes o en forma de genes, para el tratamiento de enfermedades isquémicas, tales como la enfermedad arterial coronaria (EAC), o la enfermedad arterial periférica (EAP). También se sabe que el HGF estimula no solo el crecimiento sino también la migración de las células endoteliales (Bussolino et al., *J Cell Biol.* 119: 629 (1992); Nakamura et al., *J Hypertens* 14: 1067 (1996).), y se ha sometido a ensayo para determinar su papel como agente estimulador de la reendotelización (Yasuda et al., *Circulation* 101: 2546 (2000); Hayashi et al., *Gene Ther* 7: 1664 (2000)).

El HGF se ha utilizado como agente para la angiogénesis terapéutica. Morishita et al., han utilizado el gen de HGF para el tratamiento de EAP y EAC. Observaron cierta respuesta terapéutica para EAP después de administrar el gen de HGF, pero no estuvo claro si la transferencia del gen de HGF fue eficaz para el tratamiento de EAC. Hasta la fecha, la transferencia del gen de HGF se ha sometido a ensayo en varios modelos animales para EAC (Miyagawa et al., *Circulation* 105: 2556 (2002); Azuma et al., *Gene Ther.* 13: 1206 (2006); Aoki et al., *Gene Ther* 7: 411 (2000); Funatsu et al., *J. Thoracic Cardiovasc Surg* 124: 1099 (2002)). Sin embargo, todavía existe controversia sobre si la transferencia del gen de HGF tiene efectos beneficiosos sobre EAC. Por ejemplo, Miyagawa et al., demostraron que la transferencia de HGF humano no pudo aumentar la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) del corazón infartado 8 semanas después del tratamiento en un modelo de infarto de miocardio de rata (Miyagawa et al., *Circulation* 105: 2556 (2002), Figura 2). Por otra parte, la transferencia del gen de HGF tuvo poco efecto sobre el porcentaje de acortamiento de la fracción y el grosor de la pared anterior del VI 8 semanas después del tratamiento en el mismo modelo (Miyagawa et al., *Circulation* 105: 2556 (2002), Figuras 3 y 5).

El HGF también se ha utilizado como agente para inhibir la reestenosis. Los procedimientos de angioplastia coronaria, p. ej., con balón o implante endoluminal, son métodos ampliamente utilizados para el tratamiento de los vasos sanguíneos oscurecidos. Sin embargo, el engrosamiento de la íntima, p. ej., la reestenosis de la arteria coronaria plantea un problema significativo cuando se utiliza la angioplastia. Una de las causas de la reestenosis es la hiperproliferación y migración de células musculares lisas vasculares con el acompañamiento de síntesis de matriz extracelular, como resultado de una respuesta a la lesión del vaso. Existe evidencia de que la rápida renovación endotelial podría suprimir la proliferación de células musculares lisas, y de ese modo inhibir la reestenosis (p. ej., Bauters et al., *Prog Cardiovasc Dis.* 40: 107 (1997)). Como un método para la prevención de la reestenosis, se intentó la administración local de factores de crecimiento endotelial tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) al vaso sanguíneo lesionado y mostró efectos sobre la atenuación de la reestenosis (Asahara et al., *Circulación* 94: 3291 (1996); Yasuda et al., *Circulation* 101: 2546 (2000); Hayashi et al., *Gene Ther.* 7: 1664 (2000); Walter et al., *Circulation* 110: 36 (2004)). Todos los estudios sobre la terapia génica con HGF descritos anteriormente se han realizado con el ADNc de flHGF que codifica 728 aminoácidos, pero no con ADNc de dHGF que codifica 723 aminoácidos (Miyagawa et al.; Azuma et al.; Aoki et al.; Funatsu et al.; Yasuda et al.; y Hayashi et al.).

Hahan W., et al., *Molecular Therapy* 2006, vol. 13 (Sup. 1), P876 describen experimentos para evaluar el potencial terapéutico del híbrido de HGF HGF-X7, en un modelo de enfermedad de extremidad isquémica de conejo y un modelo de enfermedad de corazón isquémico de rata.

El documento US 2005/0079581 describe un gen de HGF híbrido y su uso para el tratamiento o la prevención de enfermedades isquémicas o del hígado.

Jayasankar, V., et al., *Circulation*, 2003, vol. 108 (Sup. II), II-230 - II-236 describen que la transferencia génica de HGF al miocardio de ratas atenúa la insuficiencia cardíaca post-infarto después de la ligación de la arteria coronaria descendente anterior izquierda.

Sagakuchi, G., et al., *Annals of Thoracic Surgery*, 2005, Vol. 79, 1626-1634 describen que el HGF liberado de manera controlada previene el progreso de la insuficiencia cardíaca en ratas hipertensas espontáneamente propensas al ictus.

La presente invención proporciona la primera demostración de que la transferencia de secuencias de nucleótidos que expresan múltiples isoformas de HGF (p. ej., flHGF y dHGF) puede tratar eficazmente la EAC en animales y seres humanos, en comparación con el ADNc para flHGF que se había sometido a ensayo en la mayoría de los informes anteriores. La presente invención también proporciona la primera demostración de que la transferencia de secuencias de nucleótidos que expresan múltiples isoformas de HGF puede acelerar el proceso de re-endotelización de un vaso sanguíneo.

Compendio de la invención

En un primer aspecto la invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de la revascularización incompleta del miocardio en un sujeto que ha tenido un injerto de derivación de la arteria coronaria, pero ha habido una revascularización incompleta del miocardio, comprendiendo la composición dos o más isoformas de HGF o uno o más polinucleótidos que codifican las isoformas como ingredientes activos, en donde dichas dos o más isoformas de HGF se seleccionan del grupo que consiste en HGF completo (flHGF), variante por delección de HGF (dHGF), NK1, NK2 y NK4.

En un segundo aspecto, la invención proporciona el uso de una composición que comprende dos o más isoformas de HGF o uno o más polinucleótidos que codifican las isoformas para la fabricación de un medicamento para tratar la revascularización incompleta del miocardio en un sujeto que ha tenido un injerto de derivación de la arteria coronaria pero ha habido una revascularización incompleta del miocardio, en donde dichas dos o más isoformas se seleccionan del grupo que consiste en HGF completo (flHGF), variante por delección de HGF (dHGF), NK1, NK2 y NK4.

Adicionalmente se describe en la presente memoria el uso de una composición que comprende dos o más isoformas de HGF o uno o más polinucleótidos que codifican las isoformas para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una afección cardíaca en un sujeto.

Adicionalmente se describe en la presente memoria el uso de una composición que comprende dos o más isoformas de HGF o uno o más polinucleótidos que codifican las isoformas para la fabricación de un medicamento para promover el crecimiento de células endoteliales en un vaso sanguíneo.

Adicionalmente se describen en la presente memoria métodos para tratar o prevenir una afección cardíaca mediante la administración de dos o más isoformas de HGF.

Adicionalmente se describen en la presente memoria métodos para aumentar la perfusión de tejido cardíaco isquémico o aumentar la densidad vascular en el miocardio en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una composición que comprende dos o más isoformas de HGF.

Adicionalmente se describen en la presente memoria métodos para tratar una afección cardíaca en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una composición que comprende dos o más isoformas de HGF.

5 Adicionalmente se describen en la presente memoria métodos para potenciar la reparación endotelial o proporcionar tratamiento en el sitio de una lesión vascular o un vaso enfermo en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una composición que comprende dos o más isoformas de HGF.

Adicionalmente se describen en la presente memoria métodos para promover el crecimiento de las células endoteliales en un vaso sanguíneo, que comprenden administrar al vaso sanguíneo una composición que comprende dos o más isoformas de HGF. En un caso, el vaso sanguíneo está dañado. En un caso adicional, se promueve la re-endotelización del vaso sanguíneo

10 En una realización, las dos o más isoformas de HGF incluyen HGF completo (referido en la presente memoria como flHGF) y variantes por delección de HGF (referido en la presente memoria como dHGF). En otra realización, las dos o más isoformas de HGF también incluyen NK1.

En una realización adicional, las dos o más isoformas de HGF se administran en la forma de polinucleótidos que codifican las isoformas.

15 En una realización de la invención, la composición se administra mediante inyección.

En otra realización de la invención, la composición se administra mediante el uso de un dispositivo de liberación. En una realización, el dispositivo de liberación es un implante endoluminal. En una realización adicional, el implante endoluminal se selecciona del grupo que consiste de un implante endoluminal de acero inoxidable no basado en polímero, un implante endoluminal de acero inoxidable con una base de polímero, un implante endoluminal de cobalto-cromo no basado en polímero, y un implante endoluminal de cobalto-cromo con una base de polímero.

20 En una realización de la invención, las dos o más isoformas de HGF se administran directamente al tejido cardíaco isquémico en un sujeto.

Adicionalmente se describen en la presente memoria composiciones que comprenden dos o más isoformas de HGF.

En un caso, las composiciones comprenden polinucleótidos que codifican las dos o más isoformas de HGF.

25 Adicionalmente se describe en la presente memoria una composición para aumentar la perfusión del tejido cardíaco isquémico en un sujeto, que comprende dos o más isoformas de HGF.

Adicionalmente se describe en la presente memoria una composición para promover el crecimiento de células endoteliales en un vaso sanguíneo en un sujeto, que comprende dos o más isoformas de HGF.

30 En una realización, la administración de la composición al vaso sanguíneo del sujeto promueve la endotelización del vaso sanguíneo. En otra realización, la administración de la composición al vaso sanguíneo de un sujeto promueve y/o acelera la re-endotelización del vaso sanguíneo.

En una realización adicional, el sujeto necesita tratamiento de reestenosis.

Breve descripción de los dibujos

35 Los objetos y características anteriores y otros de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción de la invención, cuando se tome junto con los dibujos adjuntos.

La Figura 1 muestra los efectos de las isoformas de HGF sobre la migración de HUVEC.

La Figura 2 muestra los efectos de las isoformas de HGF sobre la migración de células C2C12.

La Figura 3 muestra los efectos de las isoformas de HGF sobre la migración de células H9C2.

La Figura 4 muestra los efectos de las isoformas de HGF sobre la proliferación de HUVEC.

40 La Figura 5 muestra un diagrama esquemático del procedimiento experimental para evaluar la eficacia farmacológica de HGF en un modelo de enfermedad isquémica de corazón de rata.

La Figura 6 muestra el efecto de HGF sobre la función de la fracción de eyección ventricular izquierda.

La Figura 7 muestra el efecto de HGF en la función del septum interventricular sistólico.

La Figura 8 muestra el efecto de la inyección de HGF en el miocardio isquémico sobre la densidad capilar.

45 La Figura 9 muestra el efecto de la inyección de HGF en el miocardio isquémico sobre la fibrosis miocárdica.

La Figura 10 muestra el territorio de la arteria coronaria en el modelo de 20 segmentos de MIBI-SPECT.

La Figura 11 muestra la selección del territorio miocárdico para la inyección de pCK-HGF-X7. pCK-HGF-X7 se administra mediante inyecciones intramiocárdicas en ambos lados de la arteria coronaria en el territorio miocárdico que tiene una disminución de la perfusión mediante evaluación de MIBI-SPECT.

5 La Figura 12 muestra el efecto de pCK-HGF-X7 en la perfusión miocárdica bajo MIBI-SPECT.

La Figura 13 muestra la perfusión miocárdica (κ) evaluada mediante ecocardiograma de esfuerzo miocárdico con contraste.

La Figura 14 muestra la aceleración de la reendotelización mediante implante endoluminal liberador de plásmido HGF sobre TCO.

10 La Figura 15 muestra la aceleración de la reendotelización mediante implante endoluminal liberador de plásmido HGF sobre MBE.

Descripción detallada de la invención

15 En un primer aspecto la invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de la revascularización incompleta del miocardio en un sujeto que ha tenido un injerto de derivación de la arteria coronaria, pero ha habido una revascularización incompleta del miocardio, comprendiendo la composición dos o más isoformas de HGF o uno o más polinucleótidos que codifican las isoformas como ingredientes activos, en donde dichas dos o más isoformas de HGF se seleccionan del grupo que consiste en HGF completo (flHGF), variante por delección de HGF (dHGF), NK1, NK2 y NK4.

20 En un segundo aspecto, la invención proporciona el uso de una composición que comprende dos o más isoformas de HGF o uno o más polinucleótidos que codifican las isoformas para la fabricación de un medicamento para tratar la revascularización incompleta del miocardio en un sujeto que ha tenido un injerto de derivación de la arteria coronaria pero ha habido una revascularización incompleta del miocardio, en donde dichas dos o más isoformas se seleccionan del grupo que consiste en HGF completo (flHGF), variante por delección de HGF (dHGF), NK1, NK2 y NK4.

25 En una realización, la composición de la invención descrita en la presente memoria comprende tres o más isoformas de HGF, p. ej., cuatro o más isoformas de HGF. En otra realización, la composición comprende dos o más isoformas de HGF seleccionadas del grupo que consiste en flHGF, dHGF, NK1, y NK2. En otra realización más, la composición comprende dos o más isoformas de HGF seleccionadas del grupo que consiste en flHGF, dHGF, y NK1. En una realización adicional, las dos o más isoformas de HGF comprenden flHGF y dHGF. En una realización adicional, las dos o más isoformas de HGF consisten en flHGF y dHGF. En otra realización, las dos o más isoformas de HGF comprenden flHGF, dHGF, y NK1. En otra realización, las dos o más isoformas de HGF se administran en forma de polinucleótidos que codifican las isoformas.

35 En otra realización, la administración de dos o más isoformas de HGF, p. ej., a un sujeto que necesita tratamiento de reestenosis, suprime la proliferación de células musculares lisas vasculares en el vaso sanguíneo. Adicionalmente se describe en la presente memoria el descubrimiento de que la administración de dos o más isoformas de HGF a un sujeto que padece una afección cardíaca tal como EAC es eficaz para aumentar la perfusión del tejido cardíaco isquémico y por lo tanto tratar o prevenir una afección cardíaca. Adicionalmente se describe en la presente memoria el descubrimiento de que la administración de dos isoformas de HGF promueve la endotelización de un vaso sanguíneo, p. ej., para atenuar la reestenosis a través de una rápida reendotelización de un vaso sanguíneo. Por consiguiente, se describen adicionalmente en la presente memoria métodos de tratamiento o prevención de una afección cardíaca, p. ej., EAC o reestenosis arterial coronaria, mediante la administración de dos o más isoformas de HGF. Adicionalmente se describen en la presente memoria métodos para promover el crecimiento de células endoteliales en un vaso sanguíneo, p. ej., donde el vaso sanguíneo está dañado.

45 Adicionalmente se describe en la presente memoria el uso de una composición que comprende dos o más isoformas de HGF o uno o más polinucleótidos que codifican las isoformas para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una afección cardíaca en un sujeto.

Adicionalmente se describe en la presente memoria el uso de una composición que comprende dos o más isoformas de HGF o uno o más polinucleótidos que codifican las isoformas para la fabricación de un medicamento para promover el crecimiento de las células endoteliales en un vaso sanguíneo.

50 Adicionalmente se describen en la presente memoria métodos para el aumento de la perfusión de tejido cardíaco isquémico o aumento de la densidad vascular del miocardio en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una composición que comprende dos o más isoformas de HGF.

Adicionalmente se describen en la presente memoria métodos de tratamiento o prevención de una afección cardíaca en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una composición que comprende dos o más isoformas de HGF.

Adicionalmente se describen en la presente memoria métodos para potenciar la reparación endotelial o proporcionar tratamiento en el sitio de una lesión vascular o un vaso dañado en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una composición que comprende dos o más isoformas de HGF.

5 Adicionalmente se describe en la presente memoria un método para promover el crecimiento de células endoteliales en un vaso sanguíneo, que comprende administrar al vaso sanguíneo una composición que comprende dos o más isoformas de HGF, en donde se promueve el crecimiento de las células endoteliales en el vaso sanguíneo.

En estos casos, la afección cardíaca que se va a tratar o prevenir es cualquier afección relacionada con la disminución del flujo sanguíneo en el corazón, la aorta, o las arterias coronarias o el tejido isquémico en el corazón. Los ejemplos de las afecciones cardíacas incluyen, sin limitación, oclusión de la arteria coronaria (p. ej., resultante de, o asociada con el depósito de lípidos/colesterol, el reclutamiento de macrófagos/células inflamatorias, la ruptura de la placa, la trombosis, el depósito de plaquetas, o la proliferación de la neointima); síndromes isquémicos (p. ej., resultantes de o asociados con infarto de miocardio, angina estable, angina inestable, reestenosis de la arteria coronaria o la lesión por reperfusión); cardiomiopatía (p. ej., resultante de, o asociada con un síndrome isquémico, una cardiotoxina, una infección, hipertensión, una enfermedad metabólica (tal como uremia, beriberi, o enfermedad de almacenamiento de glucógeno), radiación, una enfermedad neuromuscular, una enfermedad infiltrativa (tal como sarcoidosis, hemocromatosis, amiloidosis, enfermedad de Fabry, o síndrome de Hurler), trauma, o una causa idiopática); arritmia o disritmia (p. ej., resultantes de o asociadas con un síndrome isquémico, una cardiotoxina, adriamicina, una infección, hipertensión, una enfermedad metabólica, radiación, una enfermedad neuromuscular, una enfermedad infiltrativa, trauma, o una causa idiopática); infección (p. ej., causada por un agente patógeno tal como una bacteria, un virus, un hongo, o un parásito); y una afección inflamatoria (p. ej., asociada con miocarditis, pericarditis, endocarditis, rechazo cardíaco inmune, o una afección inflamatoria resultante de una de una enfermedad idiopática, una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad del tejido conectivo).

En estos casos, se pueden utilizar los métodos para tratar o prevenir la aterosclerosis (p. ej., en la aorta o las arterias coronarias), para prevenir las complicaciones asociadas con la aterosclerosis (p. ej., angina de pecho, infarto de miocardio, arritmias, insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal, cirrosis hepática, enfermedad de Legg-Calvé-Perthes, ictus isquémico, oclusión arterial periférica, aneurisma, embolia), o para reducir los síntomas y signos precoces de aterosclerosis (p. ej., la incapacidad de flujo sanguíneo al tejido afectado para aumentar con la demanda, como en la angina, el esfuerzo o la claudicación intermitente).

En estos casos, se pueden utilizar los métodos para tratar o prevenir afecciones cardíacas resultantes de la intervención quirúrgica vascular incluyendo, sin limitación, angioplastia (p. ej., angioplastia coronaria transluminal percutánea, angioplastia transluminal percutánea de la carótida, angioplastia coronaria con implantación de implante endoluminal), colocación de implantes endoluminales, aterectomía, o injerto (p. ej., injerto de derivación coronaria). En ciertos casos, la afección cardíaca es la reestenosis de la arteria coronaria.

En estos casos, se administran las dos o más isoformas de HGF a un sujeto que tiene una enfermedad de la arteria coronaria. En ciertos casos, el sujeto tiene un bloqueo parcial o completo de una o más arterias coronarias. En ciertos casos, el sujeto ha tenido, tiene, o está en riesgo de infarto de miocardio. En un caso adicional, se ha determinado que el sujeto tiene o se sospecha que tiene tejido cardíaco isquémico, p. ej., basándose en un angiograma, electrocardiograma, ecocardiograma, u otro procedimiento. En ciertos casos, el sujeto es un candidato para un injerto de derivación de la arteria coronaria (CABG, por sus siglas en inglés). En ciertos casos, el sujeto tiene una o más arterias coronarias que están parcialmente o completamente bloqueadas, pero no son adecuadas para CABG. En ciertos casos, el sujeto ha tenido un CABG pero ha habido una revascularización incompleta del miocardio.

En estos casos, se administran las dos o más isoformas de HGF a un vaso sanguíneo para promover el crecimiento celular endotelial. En ciertos casos, el vaso sanguíneo se oscurece o se lesiona. En ciertos casos, un vaso sanguíneo oscurecido puede incluir una arteria o vena en el que el lumen del vaso sanguíneo se ha estrechado y el flujo sanguíneo a través del vaso ha disminuido. En ciertos casos, la administración de dos o más isoformas de HGF promueve la re-endotelización del vaso sanguíneo, p. ej. después de una lesión en la pared del vaso sanguíneo, p. ej., durante un procedimiento de angioplastia. En ciertos casos, se puede promover y/o acelerar la re-endotelización, p. ej., una mayor tasa de crecimiento de células endoteliales en comparación con el crecimiento de células endoteliales en ausencia de dos o más isoformas de HGF.

El término "tratar", "tratando" o "tratamiento" de una afección, p. ej., una afección cardíaca o un vaso sanguíneo oscurecido o lesionado, según se utiliza en la presente memoria, se refiere a la administración a un sujeto de un factor en una cantidad suficiente para dar como resultado la mejora de uno o más síntomas de la afección, o prevenir el avance de la afección, o causar la regresión de la afección, p. ej., debido a la promoción de la angiogénesis o el crecimiento de las células endoteliales. Por ejemplo, con respecto a la mejora de un síntoma de una afección cardíaca, el tratamiento da como resultado una disminución medible del síntoma de al menos 5%, preferiblemente al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 100%. Los efectos fisiológicos relacionados con el tratamiento de una afección cardíaca que pueden ser detectados y medidos para determinar el

tratamiento incluyen, sin limitación, un aumento en la eficacia cardíaca (tal como se mide por al menos un índice clínico de la función cardíaca, tal como el gasto cardíaco, las presiones arterial pulmonar y venosa central, o la fracción de eyección ventricular), el flujo de sangre en el miocardio transmural en reposo o bajo condiciones de esfuerzo, la regeneración del tejido miocárdico, la formación, la maduración y/o el crecimiento de los vasos sanguíneos colaterales (p. ej., neoangiogénesis local, aumento en la densidad capilar, arteriogénesis, linfangiogénesis, vasculogénesis), cardiomiogénesis (p. ej., células estriadas, lisas o mioepiteliales), vascularización del tejido miocárdico, función contráctil del corazón, fracción de eyección ventricular izquierda, o septo interventricular; o una disminución de la fibrosis miocárdica, engrosamiento de la íntima (proliferación/hiperplasia de la neoíntima), proliferación de las células endoteliales o de la musculatura lisa, dolor en el pecho, o falta de aire. Los términos "prevenir", "previniendo" y "prevención", según se utilizan en la presente memoria, se refieren a una disminución en la aparición de uno o más síntomas de una afección (p. ej., alteración de la función cardíaca o disminución del flujo sanguíneo debido a un vaso sanguíneo oscurecido o lesionado) en un animal. La prevención puede ser completa, p. ej., ausencia total de síntomas en un sujeto. La prevención también puede ser parcial, de tal manera que la aparición de los síntomas en un sujeto es menor que la que se habría producido sin la presente invención. En una realización, las isoformas de HGF o polinucleótidos que codifican las isoformas de HGF se administran a la vasculatura o al corazón de un sujeto, p. ej., un vaso sanguíneo lesionado, una arteria coronaria parcial o totalmente bloqueada, tejido miocárdico, espacio pericárdico, o seno coronario isquémicos.

Las isoformas de HGF o los polinucleótidos que codifican las isoformas de HGF se pueden suministrar en el sitio deseado utilizando cualquier medio conocido en la técnica. Los ejemplos de los dispositivos de suministro que se pueden utilizar incluyen, sin limitación, catéteres (p. ej., catéter de balón, catéter de infusión, catéter de aguja), agujas, inyectores sin aguja, implantes endoluminales, cánulas de infusión, mallas, arneses cardíacos, shunts, marcapasos cardíacos, desfibriladores implantables, suturas, grapas, envolturas perivasculares, láminas o membranas flexibles que se pueden ajustar sustancialmente a los contornos de la zona de una herida, dispositivos de acanalamiento, injertos y bombas. Los ejemplos específicos de los métodos de suministro de las isoformas de HGF incluyen, sin limitación, el suministro a través de un catéter con balón colocado en una vena que drena al seno coronario (p. ej., la vena cardíaca grande, la vena cardíaca media, la vena posterior del ventrículo izquierdo, o la vena interventricular anterior o cualquiera de sus ramas laterales); el suministro a través de un catéter conducido al lumen de una o más arterias coronarias (p. ej., la arteria coronaria derecha o izquierda) en la que las isoformas de HGF recubren un balón que se infla en el lugar o se inyecta desde la punta del catéter; el suministro a través de una aguja durante una cirugía a corazón abierto (p. ej., en la aurícula izquierda o derecha o el ventrículo izquierdo o derecho); el suministro al espacio pericárdico utilizando una entrada interna a través de la aurícula izquierda, el ventrículo derecho o el ventrículo izquierdo o utilizando una entrada externa a través de un procedimiento a tórax abierto, cirugía mínimamente invasiva, o entrada percutánea realizada por inyección, cateterismo, creación de canales de perfusión creados por láser, canulización, utilización de una pistola de partículas, o utilización de una bomba; el suministro mediante perfusión anterógrada a partir de un catéter colocado en un conducto de liberación de sangre al tejido o perfusión retrógrada desde un catéter colocado en un conducto que recibe sangre desde el tejido; o el suministro a través de un dispositivo intraluminal o una prótesis intravascular para mantener la permeabilidad vascular (p. ej., implante endoluminal, injerto, implante endoluminal-injerto, filtro de la vena cava). En una realización, el dispositivo es biodegradable de modo que no necesita ser retirado después de que ya no sea necesario. En ciertas realizaciones, las 2 isoformas de HGF son suministradas utilizando un implante endoluminal. En una realización adicional, el implante endoluminal se selecciona del grupo que consiste en un implante endoluminal de acero inoxidable no basado en polímero, un implante endoluminal de acero inoxidable con una base de polímero, un implante endoluminal de cobalto-cromo no basado en polímero, y un implante endoluminal de cobalto-cromo con una base de polímero.

En una realización, los polinucleótidos que codifican las isoformas de HGF se suministran en forma de células que comprenden los polinucleótidos y que expresan los polipéptidos de HGF. Las células pueden ser células autólogas o no autólogas (p. ej., alogénicas o xenogénicas). Se puede utilizar cualquier célula que sea viable después del trasplante, incluyendo, p. ej., fibroblastos, cardiomiocitos, células endoteliales, o células madre (p. ej., células madre embrionarias, células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales). Las células que comprenden los polinucleótidos se pueden introducir en forma de una preparación de suspensión líquida inyectable, p. ej., para la inyección en el sitio del miocardio dañado o intravenosamente. Las células se pueden introducir en una zona de infarto para reducir el grado de formación de cicatrices y para aumentar la función ventricular. Cuando los polinucleótidos se van a introducir en células *ex vivo*, las células se pueden obtener de un sujeto mediante cualquier mecanismo conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, biopsias, raspados y extracción quirúrgica de tejido. Las células aisladas se pueden cultivar durante una cantidad de tiempo suficiente para permitir que los polinucleótidos sean introducidos en las células, p. ej., 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36, 48 horas o más. Los métodos para el cultivo de células primarias durante períodos cortos de tiempo son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden cultivar células en placas (p. ej., en placas de micropocillos) ya sea ancladas o en suspensión. En una realización, la presencia de los polinucleótidos en las células se determina antes de introducir las células de nuevo en el sujeto. En otra realización, las células que contienen los polinucleótidos se seleccionan (p. ej., basándose en la presencia de un marcador seleccionable en los polinucleótidos) y solo aquellas células que contienen los polinucleótidos se reintroducen en el sujeto.

5 Cuando las isoformas de HGF o los polinucleótidos que codifican las isoformas de HGF son suministrados mediante inyección, la inyección puede ser una inyección intracardiaca, p. ej., intraauricular (izquierda y/o derecha) o intraventricular (izquierdo y/o derecho). La inyección también puede ser una inyección intramiocárdica. El sitio de inyección puede estar en o cerca de la región isquémica/hipóxica, en el límite del tejido normal y la región isquémica/hipóxica, o en el tejido normal. El sitio de inyección puede ser en el sitio de una o más arterias coronarias, p. ej., una arteria que está ocluida. Las inyecciones pueden ser transepicárdicas o transendocárdicas. El suministro puede consistir en una inyección o múltiples inyecciones en uno o más sitios. El suministro se puede realizar mediante inyección intrapericárdica. El suministro a un sitio vascular puede ser mediante inyección intravascular, p. ej., intravenosa o intraarterial (intracoronaria, intraaórtica). El suministro puede ser en al menos dos arterias coronarias, p. ej., al menos una arteria coronaria izquierda y una derecha, p. ej., en un sitio a al menos aproximadamente 1 cm en el lumen de una arteria coronaria. La inyección vascular puede ser, p. ej., en un sitio adyacente al tejido isquémico o enfermo, en el sitio de una lesión vascular, o en el sitio de la estenosis.

15 La administración de las isoformas de HGF se puede repetir más de una vez, p. ej., después de un intervalo de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días o más, p. ej., después de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 semanas o más. En una realización, el estado de perfusión cardiaca o la salud vascular de un sujeto se controlan después de cada administración de las isoformas de HGF, p. ej., mediante angiograma, electrocardiograma, ecocardiograma, u otro procedimiento, y las administraciones adicionales se proporcionan según sea necesario. En una realización de la invención, las dos o más isoformas de HGF se administran a un sujeto que está experimentando actualmente un evento isquémico. En otra realización, las dos o más isoformas de HGF se administran tan pronto como sea posible después de que se haya producido un evento isquémico, p. ej., en el plazo de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18, 24, 36, 48 o las 72 horas del evento isquémico.

25 Las dos o más isoformas de HGF se administran a una dosis terapéuticamente eficaz, p. ej., a una dosis que conduce a una mejora medible de la afección cardiaca y/o de los vasos de un sujeto, p. ej., un aumento de la perfusión del tejido cardíaco isquémico, un aumento de la densidad capilar en el tejido cardíaco isquémico, una disminución de la fibrosis en el tejido cardíaco isquémico, una disminución del grado de lesión vascular, un aumento de la endotelización, etc. La dosis eficaz variará de sujeto a sujeto, dependiendo del grado de la afección y/o la necesidad de endotelización, la ruta de administración elegida, la edad, el sexo y el peso corporal del sujeto individual, el estado de salud del sujeto, y la gravedad de los síntomas del sujeto, y se puede administrar en una sola dosis o en dosis divididas. Por lo tanto, la dosis diaria no debe interpretarse como una limitación del alcance de la invención de ninguna manera. Por ejemplo, cuando los dos o más isoformas de HGF se administran en forma de proteínas, una dosis terapéuticamente eficaz puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 μ g a aproximadamente 100 mg, p. ej., aproximadamente 10 μ g a aproximadamente 10 mg de cada proteína. Cuando las dos o más isoformas de HGF se administran en forma de polinucleótidos, una dosis terapéuticamente eficaz puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 μ g a aproximadamente 10 mg, p. ej., de aproximadamente 5 μ g a aproximadamente 5 mg, p. ej., de aproximadamente 10 μ g a aproximadamente 2 mg, de 100 μ g a aproximadamente 1 mg. Cuando la administración de las isoformas de HGF se repite más de una vez, la dosis administrada puede ser la misma o diferente cada vez.

En una realización, se administran al sujeto agentes o procedimientos terapéuticos adicionales (p. ej., angioplastia) que se sabe que son eficaces para el tratamiento de una afección cardiaca y/o vascular.

40 Los ejemplos de los agentes terapéuticos incluyen, sin limitación, promotores de la angiogénesis (p. ej., factor de crecimiento endotelial vascular, agentes de liberación o generación de óxido nítrico, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento derivado de plaquetas, interleuquina-6, proteína quimiotáctica de monocitos 1, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, factor de crecimiento transformante- β), agentes anti-trombóticos (p. ej., aspirina, heparina, PPACK, enoxaprina, hirudina), anticoagulantes, antibióticos, agentes antiplaquetarios, agentes trombolíticos (p. ej., activador tisular del plasminógeno), antiproliferativos, antiinflamatorios, agentes que inhiben la hiperplasia, agentes que inhiben la reestenosis, inhibidores de células de la musculatura lisa, factores de crecimiento, inhibidores del factor de crecimiento, inhibidores de la adherencia celular, agentes quimioterapéuticos, y combinaciones de los mismos.

50 Las siguientes definiciones se proporcionan y deben ser útiles para comprender el alcance y la práctica de la presente invención.

El término "aislado" designa un material biológico (células, ácido nucleico o proteína) que se ha retirado de su entorno original (el entorno en el que está presente de forma natural). Por ejemplo, un polinucleótido presente en el estado natural en una planta o un animal no está aislado, sin embargo el mismo polinucleótido separado de los ácidos nucleicos adyacentes en los que está presente de forma natural, se considera "aislado".

55 "Ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico", "oligonucleótido" y "polinucleótido" se utilizan indistintamente y se refieren a la forma polimérica del éster de fosfato de ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina o citidina; "moléculas de ARN") o desoxirribonucleósidos (desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina, o desoxicitidina; "moléculas de ADN"), o cualquiera de sus análogos fosfoéster, tales como fosforotioatos y tioésteres, ya sea en forma de hebra sencilla o una hélice de doble hebra. Son posibles hélices de ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN de doble hebra. El término molécula de ácido nucleico y, en particular, molécula de ADN o ARN, se refiere solo a la

estructura primaria y secundaria de la molécula, y no la limita a ninguna forma terciaria concreta. Por lo tanto, este término incluye ADN de doble hebra encontrado, entre otras, en moléculas de ADN lineales o circulares (p. ej., fragmentos de restricción), plásmidos, ADN superenrollado y cromosomas. Al discutir la estructura de determinadas moléculas de ADN de doble hebra, las secuencias pueden describirse en la presente memoria de acuerdo con la convención normal de proporcionar solo la secuencia en la dirección 5' a 3' a lo largo de la hebra no transcrita de ADN (es decir, la hebra que tiene una secuencia homóloga al ARNm). Una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que ha sufrido una manipulación biológica molecular. El ADN incluye, pero no se limita a, ADNc, ADN genómico, ADN plasmídico, ADN sintético, y ADN semi-sintético.

El término "fragmento", según se aplica a las secuencias de polinucleótidos, se refiere a una secuencia de nucleótidos de longitud reducida con respecto al ácido nucleico de referencia y que comprende, sobre la parte común, una secuencia de nucleótidos idéntica a la del ácido nucleico de referencia. Tal fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la invención puede ser, cuando sea apropiado, incluido en un polinucleótido más grande del cual es un constituyente. Tales fragmentos comprenden, o alternativamente consisten en, oligonucleótidos que oscilan en longitud de al menos 6, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 39, 40, 42, 45, 48, 50, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 70, 75, 78, 80, 90, 100, 105, 120, 135, 150, 200, 300, 500, 720, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, o más nucleótidos consecutivos de un ácido nucleico de acuerdo con la invención.

Un "gen" se refiere a un polinucleótido que comprende nucleótidos que codifican una molécula funcional, incluyendo moléculas funcionales producidas mediante la transcripción solamente (p. ej., una especie de ARN bioactivo) o mediante transcripción y traducción (p. ej., un polipéptido). El término "gen" incluye ácidos nucleicos de ADNc y ADN genómico. "Gen" también se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa un ARN, proteína o polipéptido específicos, incluyendo secuencias reguladoras que preceden (secuencias 5' no codificantes) y que siguen (secuencias 3' no codificantes) a la secuencia codificante. "Gen nativo" se refiere a un gen como se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. "Gen quimérico" se refiere a cualquier gen que no es un gen nativo, que comprende secuencias reguladoras y/o codificantes que no se encuentran juntas en la naturaleza. Por consiguiente, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que derivan de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificantes derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente a la encontrada en la naturaleza. Un gen quimérico puede comprender secuencias codificantes derivadas de diferentes fuentes y/o secuencias reguladoras derivadas de diferentes fuentes. "Gen endógeno" se refiere a un gen nativo en su localización natural en el genoma de un organismo. Un gen "foráneo" o gen "heterólogo" se refiere a un gen que no se encuentra normalmente en el organismo anfitrión, pero que se introduce en el organismo anfitrión mediante transferencia génica. Los genes foráneos pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo, o genes quiméricos. Un "transgén" es un gen que ha sido introducido en la célula mediante un procedimiento de transferencia génica.

"ADN heterólogo" se refiere a un ADN no se encuentra de forma natural en la célula, o en un sitio cromosómico de la célula. El ADN heterólogo puede incluir un gen foráneo para la célula.

El término "genoma" incluye ADN o ARN cromosómico, así como mitocondrial, de cloroplastos y viral. Una molécula de ácido nucleico es "hibridable" con otra molécula de ácido nucleico, tal como un ADNc, ADN genómico o ARN, cuando una forma de hebra sencilla de la molécula de ácido nucleico se puede recocer con la otra molécula de ácido nucleico en las condiciones apropiadas de temperatura y fuerza iónica de la disolución. Las condiciones de hibridación y lavado son bien conocidas e ilustradas por Sambrook et al. en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989), concretamente el capítulo 11 y en la Tabla 11.1 de allí. Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan la "rigurosidad" de la hibridación. Las condiciones de rigurosidad pueden ajustarse para el escrutinio de fragmentos moderadamente similares, tales como secuencias homólogas de organismos lejanamente relacionados, hasta fragmentos altamente similares, tales como genes que duplican enzimas funcionales de organismos estrechamente relacionados. Para el escrutinio preliminar de ácidos nucleicos homólogos, se puede utilizar condiciones de hibridación de baja rigurosidad, que corresponden a una temperatura de fusión (T_m) de 55°, p. ej., 5X SSC, SDS al 0,1%, leche al 0,25%, y sin formamida; o formamida al 30%, 5X SSC, SDS al 0,5%. Las condiciones de hibridación de rigurosidad moderada corresponden a una T_m superior, p. ej., formamida al 40%, con 5X o 6X SSC. Las condiciones de hibridación de alta rigurosidad corresponden a la T_m más alta, p. ej., formamida al 50%, 5X o 6X SSC. La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, aunque dependiendo de la rigurosidad de la hibridación, son posibles emparejamientos erróneos entre bases. El término "complementario" se utiliza para describir la relación entre las bases de nucleótidos que son capaces de hibridar entre sí. Por ejemplo, con respecto al ADN, la adenosina es complementaria a la timina y la citosina es complementaria a la guanina.

Las condiciones de hibridación pueden comprender una etapa de hibridación a una T_m de 55°C, y la utilización de las condiciones expuestas anteriormente. En otros casos, la T_m es de 60°C, 63°C, o 65°C.

Los lavados post-hibridación también determinan las condiciones de rigurosidad. Un conjunto de condiciones utiliza una serie de lavados que comienzan con 6X SSC, SDS al 0,5% a temperatura ambiente durante 15 minutos (min), luego se repite con 2X SSC, SDS al 0,5% a 45°C durante 30 min, y después se repite dos veces con 0,2X SSC, SDS al 0,5% a 50°C durante 30 min. Un conjunto preferido de condiciones restrictivas utiliza temperaturas más altas en las que los lavados son idénticos a los anteriores excepto porque la temperatura de los dos lavados finales de 30

min en 0,2X SSC, SDS al 0,5% se incrementa a 60°C. Otro conjunto preferido de condiciones altamente rigurosas utiliza dos lavados finales en 0,1X SSC, SDS al 0,1% a 65°C. La rigurosidad apropiada para la hibridación de ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementación, variables bien conocidas en la técnica. Cuanto mayor sea el grado de similitud u homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor será el valor de T_m para los híbridos de ácidos nucleicos que tienen esas secuencias. La estabilidad relativa (correspondiente a la mayor T_m) de las hibridaciones de ácidos nucleicos disminuye en el siguiente orden: ARN:ARN, ADN:ARN, ADN:ADN. Para los híbridos de más de 100 nucleótidos de longitud, se han obtenido ecuaciones para calcular la T_m (véase Sambrook et al., supra, 9.50-0.51). Para la hibridación con ácidos nucleicos más cortos, es decir, oligonucleótidos, la posición de los emparejamientos erróneos se vuelve más importante, y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (véase Sambrook et al., supra, 11.7 a 11.8).

Las condiciones de hibridación pueden comprender una etapa de hibridación a una concentración de sal de menos de 500 mM y al menos 37°C, y una etapa de lavado en 2X SSPE a una temperatura de al menos 63°C. Las condiciones de hibridación también pueden comprender una concentración de sal menor de 200 mM y al menos 37°C para la etapa de hibridación. Las condiciones de hibridación pueden comprender adicionalmente 2X SSPE y 63°C para las etapas tanto de hibridación como de lavado.

La longitud de un ácido nucleico hibridable puede ser de al menos aproximadamente 10 nucleótidos. Preferiblemente, una longitud mínima para un ácido nucleico hibridable es de al menos aproximadamente 15 nucleótidos; p. ej., al menos aproximadamente 20 nucleótidos; p. ej., al menos 30 nucleótidos. Además, el experto en la técnica reconocerá que temperatura y la concentración de sal de la disolución de lavado se pueden ajustar según sea necesario de acuerdo con factores tales como la longitud de la sonda.

El término "sonda" se refiere a una molécula de ácido nucleico de hebra sencilla que puede emparejar bases con un ácido nucleico de diana de hebra sencilla complementario para formar una molécula de doble hebra.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico corto que es hibridable con una molécula de ADN genómico, una molécula de ADNc, un ADN plasmídico o una molécula de ARNm. Los oligonucleótidos se pueden marcar, p. ej., con nucleótidos marcados con P³² o nucleótidos a los que se ha conjugado covalentemente una marca, tal como biotina. Se puede utilizar un oligonucleótido marcado como sonda para detectar la presencia de un ácido nucleico. Los oligonucleótidos (uno o ambos de los cuales pueden estar marcados) se pueden utilizar como cebadores de PCR, o bien para clonar todo o un fragmento de un ácido nucleico, para secuenciar ADN, o para detectar la presencia de un ácido nucleico. También se puede utilizar un oligonucleótido para formar una triple hélice con una molécula de ADN. Generalmente, los oligonucleótidos se preparan sintéticamente, preferiblemente en un sintetizador de ácido nucleico. Por consiguiente, los oligonucleótidos pueden prepararse con enlaces análogos a fosfoéster de origen no natural, tales como enlaces tioéster, etc.

Un "cebador" se refiere a un oligonucleótido que hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana para crear una región de ácido nucleico de doble hebra que puede servir como un punto de inicio para la síntesis de ADN en condiciones adecuadas. Tales cebadores se pueden utilizar en una reacción en cadena de la polimerasa o para secuenciar ADN.

La "reacción en cadena de la polimerasa" se abrevia como PCR y se refiere a un método *in vitro* para amplificar enzimáticamente secuencias específicas de ácido nucleico. La PCR implica una serie repetitiva de ciclos de temperatura con cada ciclo que comprende tres fases: desnaturalización del ácido nucleico molde para separar las hebras de la molécula diana, recocido de un cebador oligonucleotídico de la PCR de cadena sencilla con el ácido nucleico molde, y extensión del cebador o los cebadores recocidos mediante ADN polimerasa. La PCR proporciona un medio para detectar la presencia de la molécula diana y, bajo condiciones cuantitativas o semi-cuantitativas, para determinar la cantidad relativa de la molécula diana en la reserva de ácidos nucleicos de partida.

La "reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa" se abrevia como RT-PCR y se refiere a un método *in vitro* para producir enzimáticamente una o varias moléculas de ADNc diana a partir de una o varias moléculas de ARN, seguido de amplificación enzimática de una o varias secuencias de ácido nucleico específicas dentro de la molécula o moléculas de ADNc diana descritas anteriormente. La RT-PCR también proporciona un medio para detectar la presencia de la molécula diana y, bajo condiciones cuantitativas o semi-cuantitativas, para determinar la cantidad relativa de esa molécula diana en la reserva de ácidos nucleicos de partida.

Una "secuencia codificante" de ADN se refiere a una secuencia de doble hebra que codifica un polipéptido y se puede transcribir y traducir a un polipéptido en una célula *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras adecuadas. "Secuencias reguladoras adecuadas" se refiere a secuencias de nucleótidos localizadas aguas arriba (secuencias 5' no codificantes), dentro, o aguas abajo (secuencias 3' no codificantes) de una secuencia codificante, y que influyen en la transcripción, el procesamiento o la estabilidad del ARN, o la traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias líder de traducción, intrones, secuencias de reconocimiento de poliadenilación, sitios de procesamiento del ARN, sitios de unión efectores y estructuras de tallo-bucle. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de inicio en el extremo 5' (amino) y un codón de parada de la traducción en el extremo 3' (carboxilo). Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, secuencias procarióticas, ADNc a partir de ARNm,

secuencias de ADN genómico, e incluso secuencias de ADN sintético. Si la secuencia codificante está destinada a la expresión en una célula eucariótica, una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción normalmente estarán ubicadas 3' con respecto a la secuencia codificante.

5 "Marco de lectura abierto" se abrevia como ORF y se refiere a una longitud de secuencia de ácido nucleico, ya sea ADN, ADNc o ARN, que comprende una señal de inicio de la traducción o codón de iniciación, tal como ATG o AUG, y un codón de terminación y puede ser potencialmente traducida a una secuencia de polipéptido.

10 El término "aguas abajo" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se encuentra 3' con respecto a una secuencia de nucleótidos de referencia. En particular, las secuencias de nucleótidos aguas abajo se refieren en general a secuencias que están a continuación del punto de partida de la transcripción. Por ejemplo, el codón de iniciación de la traducción de un gen se encuentra aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción.

15 El término "aguas arriba" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se encuentra 5' con respecto a una secuencia de nucleótidos de referencia. En particular, las secuencias de nucleótidos aguas arriba se refieren en general a secuencias que se encuentran en el lado 5' de una secuencia codificante o punto de partida de la transcripción. Por ejemplo, la mayoría de los promotores se encuentran aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción.

20 "Recombinación homóloga" se refiere a la inserción de una secuencia de ADN foráneo en otra molécula de ADN, p. ej., inserción de un vector en un cromosoma. Preferiblemente, el vector se dirige a un sitio cromosómico específico para la recombinación homóloga. Para la recombinación homóloga específica, el vector contendrá regiones suficientemente largas de homología con secuencias del cromosoma para permitir la unión complementaria y la incorporación del vector al cromosoma. Regiones más largas de homología, y mayores grados de similitud de secuencia, pueden aumentar la eficiencia de la recombinación homóloga.

25 Un "vector" se refiere a cualquier vehículo para la clonación y/o la transferencia de un ácido nucleico en una célula anfitriona. Un vector puede ser un replicón al que puede estar unido otro segmento de ADN con el fin de provocar la replicación del segmento unido. Un "replicón" se refiere a cualquier elemento genético (p. ej., plásmido, fago, cósmido, cromosoma, virus) que funciona como una unidad autónoma de replicación de ADN in vivo, es decir, susceptible de replicación bajo su propio control. El término "vector" incluye vehículos tanto virales como no virales para introducir el ácido nucleico en una célula in vitro, ex vivo o in vivo. Se puede utilizar un gran número de vectores conocidos en la técnica para manipular ácidos nucleicos, incorporar elementos de respuesta y promotores a genes, etc. Los vectores posibles incluyen, p. ej., plásmidos o virus modificados incluyendo, por ejemplo adenovirus, retrovirus, virus adeno-asociados, herpesvirus, o plásmidos tales como derivados de los plásmidos pBR322 o pUC, o el vector Bluescript. Por ejemplo, la inserción de los fragmentos de ADN correspondientes a elementos de respuesta y promotores en un vector adecuado se puede lograr ligando los fragmentos de ADN apropiados en un vector seleccionado que tenga extremos cohesivos complementarios. Alternativamente, los extremos de las moléculas de ADN pueden modificarse enzimáticamente o se puede producir cualquier sitio ligando secuencias de nucleótidos (conectores) en los extremos del ADN. Tales vectores pueden ser modificados genéticamente para que contengan genes marcadores seleccionables que permitan la selección de células que han incorporado el marcador en el genoma celular. Tales marcadores permiten la identificación y/o selección de células anfitrionas que incorporan y expresan las proteínas codificadas por el marcador.

40 Los vectores virales se han utilizado en una amplia variedad de aplicaciones de suministro de genes en las células, así como sujetos animales vivos. Los vectores virales que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, vectores de adenovirus, retrovirus, virus vaccinia, poxvirus, virus adenoasociados, virus herpes simplex, lentivirus, baculovirus, virus Sendai, virus del sarampión, virus de simio 40 y el virus de Epstein-Barr. Los vectores no virales incluyen plásmidos, lipoplejos (complejos de liposomas catiónicos-ADN), poliplejos (complejos de polímeros catiónicos-ADN), y complejos de proteínas-ADN. Además de un ácido nucleico, un vector también puede comprender una o más regiones reguladoras y/o marcadores seleccionables útiles para seleccionar, medir y supervisar los resultados de transferencia de ácidos nucleicos (transferencia a qué tejidos, duración de la expresión, etc.).

50 El término "plásmido" se refiere a un elemento extracromosómica que porta a menudo un gen que no es parte del metabolismo central de la célula, y por lo general en forma de moléculas de ADN de doble hebra circulares. Tales elementos pueden ser secuencias de replicación autónoma, secuencias de integración en el genoma, secuencias de fagos o nucleótidos, lineal, circular o superenrollado, de un ADN o ARN de hebra sencilla o doble, derivadas de cualquier fuente, en donde un número de secuencias de nucleótidos han sido unido o recombinado en una construcción única que es capaz de introducir un fragmento promotor y la secuencia de ADN para un producto génico seleccionado junto con la secuencia no traducida 3' apropiada en una célula.

55 Un "vector de clonación" se refiere a un "replicón", que es una longitud unitaria de un ácido nucleico, preferiblemente ADN, que se replica de forma secuencial y que comprende un origen de replicación, tal como un plásmido, fago o cósmido, al cual se puede unir otro segmento de ácido nucleico con el fin de provocar la replicación del segmento unido. Los vectores de clonación pueden ser susceptibles de replicación en un tipo celular y de expresión en otro ("vector lanzadera"). Los vectores de clonación pueden comprender una o más secuencias que se pueden utilizar

para la selección de células que comprenden el vector y/o uno o más sitios múltiples de clonación para la inserción de secuencias de interés.

El término "vector de expresión" se refiere a un vector, plásmido o vehículo diseñado para permitir la expresión de una secuencia de ácido nucleico insertada después de la transformación en el anfitrión. El gen clonado, es decir, la secuencia de ácido nucleico insertada, se coloca generalmente bajo el control de elementos de control tales como un promotor, un promotor mínimo, un intensificador, o similares. Las regiones de control de la iniciación o promotores, que son útiles para dirigir la expresión de un ácido nucleico en la célula anfitriona deseada son numerosos y conocidos para los expertos en la técnica. Se puede utilizar prácticamente cualquier promotor capaz de dirigir la expresión de estos genes en un vector de expresión, incluyendo, pero no limitado a, promotores virales, promotores bacterianos, promotores de animales, promotores de mamífero, promotores sintéticos, promotores constitutivos, promotores específicos de tejido, promotores relacionados con patogénesis o enfermedades, promotores específicos del desarrollo, promotores inducibles, promotores regulados por la luz; incluyendo, pero no limitados a, la región promotora temprana SV40 (SV40), el promotor contenido en el largo de repetición terminal 3' (LTR) del virus del sarcoma de Rous (RSV), E1A o promotor tardío principal (MLP) de adenovirus (Ad), el promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (HCMV), el promotor timidina quinasa (TK) del virus herpes simplex (HSV), el promotor IE1 de baculovirus, el promotor del factor de elongación 1 alfa (EF1), el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK), el promotor de la ubiquitina C (Ubc), el promotor de la albúmina, las secuencias reguladoras del promotor de metalotioneína-L de ratón y regiones de control transcripcional, los promotores ubicuos (HPRT, vimentina, β -actina, tubulina y similares), los promotores de los filamentos intermedios (desmina, neurofilamentos, queratina, GFAP, y similares), los promotores de genes terapéuticos (de MDR, CFTR o factor de tipo VIII, y similares), promotores relacionados con la patogénesis o enfermedades, y promotores que exhiben especificidad de tejido y han sido utilizados en animales transgénicos, tales como la región de control del gen de la elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas; la región de control del gen de la insulina activa en células beta pancreáticas, la región de control del gen de la inmunoglobulina activa en células linfoides, la región de control del virus del tumor mamario d ratón activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos; las regiones de control del gen de la albúmina, Apo A1 y Apo A2 activas en el hígado, la región de control del gen de la alfa-fetoproteína activa en el hígado, la región de control del gen de la alfa 1-antitripsina activa en el hígado, la región de control del gen de la beta-globina, activa en células mieloides, la región de control del gen de la proteína básica de mielina activa en células oligodendrocíticas en el cerebro, la región de control del gen de cadena ligera 2 de miosina activa en el músculo esquelético, y la región de control del gen de la hormona de liberación gonadotrópica activa en el hipotálamo, el promotor de la piruvato quinasa, el promotor de la villina, el promotor de la proteína intestinal de unión de ácidos grasos, el promotor de la β -actina de las células de la musculatura lisa, y similares. Además, estas secuencias de expresión se pueden modificar mediante la adición de secuencias intensificadora o reguladoras y similares.

Los vectores de expresión construidos anteriormente se administran a continuación a un sujeto en forma de una composición farmacéutica. Se pueden administrar dos o más isoformas de HGF por separado, ya sea sucesivamente o al mismo tiempo, es decir, administrar simultáneamente; se pueden administrar o administrar simultáneamente plásmidos separados para las dos o más isoformas de HGF o se puede administrar un único plásmido de expresión que contiene genes para dos o más isoformas de HGF y susceptible de expresar los genes para las dos o más isoformas de HGF. Por ejemplo, las dos isoformas fHGF y dHGF se pueden administrar utilizando dos plásmidos separados. Alternativamente, los dos plásmidos separados que contienen genes para fHGF y dHGF se pueden utilizar para la administración simultánea. Finalmente, se puede administrar un único plásmido de expresión que contiene genes tanto para fHGF como para dHGF. En ciertos aspectos, el fHGF y el dHGF sobre un único plásmido de expresión son codificadas por el mismo polinucleótido o por polinucleótidos separados. Existen varios enfoques para incluir más de un polinucleótido capaz de expresar una isoforma de HGF en un único plásmido. Estos incluyen, p. ej., el uso de secuencias del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), promotores duales/cassetes de expresión, y proteínas de fusión. Las dos o más isoformas expresadas a partir del mismo plásmido o en dos plásmidos separados, como se discutió anteriormente, se seleccionan del grupo que consiste en fHGF, dHGF, NK1, y NK2, o se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2-5 y 11-12. Las dos o más isoformas también pueden incluir isoformas de HGF adicionales conocidas por los expertos normales en la técnica.

Los vectores se pueden introducir en las células anfitrionas deseadas mediante métodos conocidos en la técnica, p. ej., inyección, transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, lipofección, uso de una pistola génica o un transportador de vectores de ADN (véanse, p. ej., Wu et al., *J. Biol. Chem.* 267:963 (1992); Wu et al., *J. Biol. Chem.* 263:14621 (1988); y Hartmut et al., Solicitud de Patente Canadiense Núm. 2.012.311).

Un polinucleótido también se puede introducir *in vivo* mediante lipofección. Durante la última década, ha habido un uso creciente de liposomas para la encapsulación y transfección de ácidos nucleicos *in vitro*. Los lípidos catiónicos sintéticos diseñados para limitar las dificultades y riesgos encontrados con la transfección mediada por liposomas se pueden utilizar para preparar liposomas para la transfección *in vivo* de un gen (Feigner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:7413 (1987); Mackey et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8027 (1988), y Ulmer et al., *Science* 259:1745 (1993)). El uso de lípidos catiónicos puede promover la encapsulación de ácidos nucleicos cargados negativamente, y también puede promover la fusión con membranas celulares cargadas negativamente (Felgner et al., *Science* 337:387 (1989)). Los compuestos y composiciones lipídicos particularmente útiles para la transferencia de ácidos

nucleicos se describen en los documentos WO 95/18863, WO 96/17823 y US 5.459.127. El uso de lipofección para introducir genes exógenos en órganos específicos *in vivo* tiene ciertas ventajas prácticas. El direccionamiento molecular de liposomas a células específicas representa un área de beneficio. Está claro que dirigir la transfección a tipos celulares concretos sería particularmente preferido en un tejido con heterogeneidad celular, tal como el páncreas, el hígado, el riñón y el cerebro. Los lípidos pueden acoplarse químicamente a otras moléculas para el propósito del direccionamiento (Mackey et al. 1988, supra). Los péptidos dirigidos, p. ej., hormonas o neurotransmisores, y proteínas tales como anticuerpos, o moléculas no peptídicas, podrían acoplarse a liposomas químicamente.

Otras moléculas también son útiles para facilitar la transfección de un ácido nucleico *in vivo*, tal como un oligopéptido catiónico (p. ej., documento WO95/21931), péptidos derivados de proteínas de unión a ADN (p. ej., documento WO96/25508), o un polímero catiónico (p. ej., documento WO95/21931). También es posible introducir un vector *in vivo* en forma de un plásmido de ADN desnudo (véanse las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.693.622, 5.589.466 y 5.580.859). También se pueden utilizar enfoques de suministro de ADN mediado por receptores (Curiel et al., *Hum Ther Gen* 3:147 (1992), y Wu et al., *J. Biol Chem* 262: 4429 (1987)).

El término "transfección" se refiere a la captación de ARN o ADN exógeno o heterólogo por una célula. Una célula ha sido "transfectada" por ARN o ADN exógeno o heterólogo cuando tal ARN o ADN se ha introducido dentro de la célula. Una célula ha sido "transformada" por ARN o ADN exógeno o heterólogo cuando el ARN o ADN transfectado efectúa un cambio fenotípico. El ARN o ADN transformante se puede integrar (unir covalentemente) en el ADN cromosómico que constituye el genoma de la célula.

"Transformación" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico a un organismo anfitrión, dando como resultado una herencia genéticamente estable. Los organismos anfitriones que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados son referidos como organismos "transgénicos" o "recombinantes" o "transformados".

Además, el vector recombinante que comprende un polinucleótido puede incluir uno o más orígenes de replicación en las células anfitrionas en las cuales se pretende su ampliación o su expresión, marcadores o marcadores seleccionables.

El término "marcador seleccionable" se refiere a un factor de identificación, habitualmente un gen de resistencia a antibióticos o agentes químicos, que es susceptible de ser seleccionado basándose en el efecto del gen marcador, es decir, resistencia a un antibiótico, resistencia a un herbicida, marcadores colorimétricos, enzimas, marcadores fluorescentes, y similares, en donde el efecto se utiliza para seguir la herencia de un ácido nucleico de interés y/o para identificar una célula u organismo que ha heredado el ácido nucleico de interés. Los ejemplos de los genes marcadores seleccionables conocidos y utilizados en la técnica incluyen: genes que proporcionan resistencia a la ampicilina, estreptomycin, gentamicina, kanamicina, higromicina, herbicida bialafos, sulfonamida, y similares; y genes que se utilizan como marcadores fenotípicos, es decir, genes reguladores de antocianina, gen de isopentanol transferasa, y similares.

El término "gen informador" se refiere a un ácido nucleico que codifica un factor de identificación que es susceptible de ser identificado basándose en el efecto del gen informador, en donde el efecto se utiliza para seguir la herencia de un ácido nucleico de interés, para identificar una célula u organismo que ha heredado el ácido nucleico de interés, y/o para medir la inducción de la expresión o la transcripción del gen. Los ejemplos de genes informadores conocidos y utilizados en la técnica incluyen: luciferasa (Luc), proteína fluorescente verde (GFP), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), β -galactosidasa (LacZ), β -glucuronidasa (Gus), y similares. Los genes marcadores seleccionables también pueden considerarse genes informadores.

"Promotor" y "secuencia promotora" se utilizan indistintamente y se refieren a una secuencia de ADN capaz de controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. En general, una secuencia codificante se localiza 3' con respecto a una secuencia promotora. Los promotores pueden derivar en su totalidad de un gen nativo, o estar compuestos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de ADN sintéticos. Los expertos en la técnica entienden que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos de células, o en diferentes etapas de desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales o fisiológicas. Los promotores que hacen que un gen se exprese en la mayoría de tipos de células la mayoría de las veces son referidos comúnmente como "promotores constitutivos". Los promotores que hacen que un gen sea expresado en un tipo celular específico se denominan comúnmente "promotores específicos de células" o "promotores específicos de tejido". Los promotores que hacen que un gen se exprese en una etapa específica del desarrollo o diferenciación celular se denominan comúnmente "promotores específicos del desarrollo" o "promotores específicos de la diferenciación celular". Los promotores que son inducidos y hacen que un gen sea expresado después de la exposición o tratamiento de la célula con un agente, molécula biológica, agente químico, ligando, luz, o similares que inducen el promotor se denominan comúnmente "promotores inducibles" o "promotores regulables". Se reconoce adicionalmente que puesto que en la mayoría de los casos los límites exactos de las secuencias reguladoras no han sido completamente definidos, los fragmentos de ADN de diferentes longitudes pueden tener una actividad promotora idéntica. La secuencia promotora está típicamente limitada en su extremo 3' por el sitio de iniciación de la transcripción y se extiende aguas arriba (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles

detectables por encima del fondo. Dentro de la secuencia promotora se encontrará un sitio de iniciación de la transcripción (definido convenientemente por ejemplo, mediante mapeo con nucleasa S1), así como dominios de unión a proteínas (secuencias consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa.

5 Una secuencia codificante está "bajo el control" de secuencias de control transcripcionales y traduccionales en una célula cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia codificante a ARNm, que a continuación es sometido a empalme en trans del ARN (si la secuencia codificante contiene intrones) y traducido a la proteína codificada por la secuencia codificante.

10 "Secuencias de control de la transcripción y la traducción" se refieren a secuencias reguladoras de ADN, tales como promotores, intensificadores, terminadores, y similares, que proporcionan la expresión de una secuencia codificante en una célula anfitriona. En las células eucarióticas, las señales de poliadenilación son secuencias de control. El término "elemento de respuesta" se refiere a uno o más elementos de ADN que actúan en cis que confieren capacidad de respuesta a un promotor mediada a través de la interacción con los dominios de unión al ADN de un factor de transcripción. Este elemento de ADN puede ser palindrómico (perfecto o imperfecto) en su secuencia o compuesto de motivos de secuencias o hemisitios separados por un número variable de nucleótidos. Los hemisitios pueden ser similares o idénticos y estar dispuestos como repeticiones directas o invertidas o como un único hemisitio o múltiplos de hemisitios adyacentes en tándem. El elemento de respuesta puede comprender un promotor mínimo aislado de diferentes organismos, dependiendo de la naturaleza de la célula u organismo al que se incorporará el elemento de respuesta. El dominio de unión a ADN del factor de transcripción se une, en presencia o ausencia de un ligando, a la secuencia de ADN de un elemento de respuesta para iniciar o suprimir la transcripción de uno o varios genes aguas abajo bajo la regulación de este elemento de respuesta.

20 El término "conectado operablemente" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un único fragmento de ácido nucleico de modo que la función de uno se ve afectada por el otro. Por ejemplo, un promotor está conectado operablemente a una secuencia codificante cuando es capaz de afectar a la expresión de esa secuencia codificante (es decir, que la secuencia codificante está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes se pueden conectar operablemente a secuencias reguladoras en orientación efectora o antisentido.

25 El término "expresión" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a la transcripción y acumulación estable de ARN efector (ARNm) o antisentido derivado de un ácido nucleico o polinucleótido. La expresión también puede referirse a la traducción del ARNm a una proteína o polipéptido.

30 Los términos "casete", "casete de expresión" y "casete de expresión génica" se refieren a un segmento de ADN que se puede insertar en un ácido nucleico o polinucleótido en sitios de restricción específicos o mediante combinación homóloga. El segmento de ADN comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés, y la casete y los sitios de restricción están diseñados para asegurar la inserción de la casete en el marco de lectura apropiado para la transcripción y la traducción. "Casete de transformación" se refiere a un vector específico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés y que tiene elementos además del polinucleótido que facilitan la transformación de una célula anfitriona concreta. Las casetes, casetes de expresión, casetes de expresión génica y casetes de transformación también pueden comprender elementos que permiten una mayor expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés en una célula anfitriona. Estos elementos pueden incluir, pero no están limitados a: un promotor, un promotor mínimo, un intensificador, un elemento de respuesta, una secuencia terminadora, una secuencia de poliadenilación, y similares.

40 El término "interruptor génico" se refiere a la combinación de un elemento de respuesta asociado a un promotor, y un sistema basado en factores de transcripción dependiente de ligando que, en presencia de uno o más ligandos, modula la expresión de un gen en el que se incorporan el elemento de respuesta y el promotor.

45 Los términos "modular" y "modula" significan inducir, reducir o inhibir la expresión del ácido nucleico o gen, lo que da como resultado las respectivas inducción, reducción o inhibición de la producción de proteína o polipéptido.

Los intensificadores que se pueden utilizar en las realizaciones de la invención incluyen, pero no se limitan a: un intensificador de SV40, un intensificador de citomegalovirus (CMV), un intensificador del factor de elongación 1 (EF1), intensificadores de levadura, intensificadores de genes virales, y similares.

50 Las regiones de control de la terminación, es decir, secuencias terminadoras o de poliadenilación, pueden también derivar de diversos genes nativos para los anfitriones preferidos. Opcionalmente, puede ser innecesario un sitio de terminación, sin embargo, es más preferido si está incluido. En una realización de la invención, la región de control de terminación puede estar compuesta o puede derivar de una secuencia sintética, señal de poliadenilación sintética, una señal de poliadenilación tardía de SV40, una señal de poliadenilación de SV40, una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH), secuencias terminadoras virales, o similares.

55 Los términos "secuencias 3' no codificantes" o "región 3' no traducida (UTR)" se refieren a secuencias de ADN localizadas aguas abajo (3') de una secuencia codificante y puede comprender secuencias de reconocimiento de poliadenilación [poli (A)] y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar al procesamiento

del ARNm o la expresión génica. La señal de poliadenilación se caracteriza normalmente por afectar a la adición de tramos de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de ARNm.

"Región reguladora" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que regula la expresión de una segunda secuencia de ácido nucleico. Una región reguladora puede incluir secuencias que son naturalmente responsables de expresar un ácido nucleico concreto (una región homóloga) o puede incluir secuencias de un origen diferente que son responsables de expresar proteínas diferentes o incluso proteínas sintéticas (una región heteróloga). En particular, las secuencias pueden ser secuencias de genes procarióticos, eucarióticos o virales o secuencias derivadas que estimulan o reprimen la transcripción de un gen de una manera específica o no específica y de una manera inducible o no inducible. Las regiones reguladoras incluyen orígenes de replicación, sitios de empalme de ARN, promotores, intensificadores, secuencias de terminación de la transcripción, y secuencias señal que dirigen el polipéptido a las rutas secretoras de la célula diana.

Una región reguladora de una "fuente heteróloga" se refiere a una región reguladora que no está asociada de forma natural con el ácido nucleico expresado. Se incluyen entre las regiones reguladoras heterólogas las regiones reguladoras de una especie diferente, las regiones reguladoras de un gen diferente, las secuencias reguladoras híbridas y las secuencias reguladoras que no existen en la naturaleza, sino que están diseñadas por un experto normal en la técnica.

"Transcrito de ARN" se refiere al producto resultante de la transcripción catalizada por ARN polimerasa de una secuencia de ADN. Cuando el transcrito de ARN es una copia complementaria perfecta de la secuencia de ADN, es referido como transcrito primario o puede ser una secuencia de ARN derivada de un procesamiento post-transcripcional del transcrito primario y se denomina ARN maduro. "ARN mensajero (ARNm)" se refiere al ARN que está sin intrones y que puede ser traducido a proteína por la célula. "ADNc" se refiere a un ADN de doble hebra que es complementario a y deriva de ARNm. "ARN efector" se refiere a un transcrito de ARN que incluye el ARNm y por lo tanto puede ser traducido a proteína por la célula. "ARN antisentido" se refiere a un transcrito de ARN que es complementario a todo o parte de un transcrito primario diana o ARNm y que bloquea la expresión de un gen diana. La complementariedad de un ARN antisentido puede ser con cualquier parte del transcrito del gen específico, es decir, en la secuencia 5' no codificante, la secuencia 3' no codificante, o la secuencia codificante. "ARN funcional" se refiere a ARN antisentido, ARN de ribozima, u otro ARN que aún no se traduce y tiene un efecto sobre procesos celulares.

"Polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente y se refieren a un compuesto polimérico que comprende residuos de aminoácidos unidos covalentemente.

Un "polipéptido aislado", "péptido aislado" o "proteína aislada" se refieren a un polipéptido o proteína que están sustancialmente libres de aquellos compuestos que normalmente están asociados con los mismos en su estado natural (p. ej., otras proteínas o polipéptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos). No se pretende que "aislado" excluya las mezclas artificiales o sintéticas con otros compuestos, o la presencia de impurezas que no interfieren en la actividad biológica, y que pueden estar presentes, p. ej., debido a una purificación incompleta, adición de estabilizadores o una combinación en una preparación farmacéuticamente aceptable.

Se puede realizar una mutación mediante cualquier mecanismo de mutagénesis conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, mutagénesis dirigida al sitio *in vitro* (Hutchinson et al., *J. Biol Chem* 253: 6551(1978); Zoller et al., *DNA* 3: 479 (1984); Oliphant et al., *Gene* 44:177 (1986); Hutchinson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:710 (1986)), uso de conectores Tab® (Pharmacia), digestión endonucleasa de restricción/delección y sustitución de fragmentos, mutagénesis mediada por PCR/dirigida por oligonucleótidos, y similares. Se prefieren las técnicas basadas en PCR para la mutagénesis dirigida al sitio (véase Higuchi, 1989, "Using PCR to Engineer DNA", en PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. Erlich, ed., Stockton Press, capítulo 6, págs. 61-70).

Una "variante" de un polipéptido o proteína se refiere a cualquier análogo, fragmento, derivado o mutante que deriva de un polipéptido o proteína y que conserva al menos una propiedad biológica del polipéptido o proteína. Pueden existir diferentes variantes del polipéptido o proteína en la naturaleza. Estas variantes pueden ser variaciones alélicas caracterizadas por diferencias en las secuencias de nucleótidos del gen estructural que codifica la proteína, o pueden implicar corte y empalme diferencial o modificación post-traducciona. El experto en la técnica puede producir variantes que tienen una o múltiples sustituciones, supresiones, adiciones o reemplazos de aminoácidos. Estas variantes pueden incluir, entre otras: (a) variantes en las que uno o más residuos de aminoácidos son sustituidos por aminoácidos conservativos o no conservativos, (b) variantes en las que se añaden uno o más aminoácidos al polipéptido o proteína, (c) variantes en las que uno o más de los aminoácidos incluyen un grupo sustituyente, y (d) variantes en las que el polipéptido o la proteína están fusionados con otro polipéptido tal como albúmina de suero. Los mecanismos para la obtención de estas variantes, incluyendo los mecanismos genéticos (supresiones, delecciones, mutaciones, etc.), químicos y enzimáticos, son conocidos por los expertos que tienen un conocimiento práctico normal en la técnica.

El término "homología" se refiere al porcentaje de identidad entre dos polinucleótidos o dos radicales polipeptídicos. La correspondencia entre la secuencia de un radical y otro se puede determinar mediante mecanismos conocidos en

la técnica. Por ejemplo, la homología se puede determinar mediante una comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas de polipéptido mediante el alineamiento de la información de secuencia y la utilización de programas informáticos fácilmente asequibles. Alternativamente, la homología se puede determinar mediante hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido de digestión con una o varias nucleasas específicas de hebra sencilla y determinación del tamaño de los fragmentos digeridos.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "homólogo", en todas sus formas gramaticales y variaciones de deletreo se refiere a la relación entre proteínas que poseen un "origen evolutivo común", incluyendo proteínas de superfamilias (p. ej., la superfamilia de las inmunoglobulinas) y proteínas homólogas de diferentes especies (p. ej., cadena ligera de miosina, etc.) (Reeck et al., *Cell* 50:667 (1987)). Tales proteínas (y sus genes codificantes) tienen homología de secuencia, como se refleja por su alto grado de similitud de secuencia. Sin embargo, en el uso común y en la presente solicitud, el término "homólogo", cuando se modifica con un adverbio tal como "altamente", puede referirse a la similitud de secuencia y no a un origen evolutivo común.

Por consiguiente, el término "similitud de secuencia" en todas sus formas gramaticales se refiere al grado de identidad o correspondencia entre secuencias de ácido nucleico o aminoácidos de proteínas que pueden compartir o no un origen evolutivo común (véase Reeck et al., *Cell* 50: 667(1987)). Dos secuencias de ADN pueden ser "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando al menos aproximadamente 50% (p. ej., al menos aproximadamente 75%, 90%, o 95%) de los nucleótidos coinciden sobre la longitud definida de las secuencias de ADN. Las secuencias que son sustancialmente homólogas pueden identificarse comparando las secuencias utilizando el soporte lógico convencional disponible en los bancos de datos de secuencias, o en un experimento de hibridación de Southern, p. ej., en las condiciones rigurosas definidas para ese sistema concreto. La definición de las condiciones de hibridación apropiadas está dentro de la experiencia de la técnica (véase, p. ej., Sambrook et al., 1989, supra).

Según se utiliza en la presente memoria, "sustancialmente similar" se refiere a fragmentos de ácido nucleico en los que los cambios en una o más bases nucleotídicas dan como resultado la sustitución de uno o más aminoácidos, pero no afectan a las propiedades funcionales de la proteína codificada por la secuencia de ADN. "Sustancialmente similar" también se refiere a fragmentos de ácido nucleico en donde los cambios en una o más bases nucleotídicas no afectan a la capacidad del fragmento de ácido nucleico para mediar la alteración de la expresión génica mediante la tecnología antisentido o de co-supresión. "Sustancialmente similar" también se refiere a modificaciones de los fragmentos de ácido nucleico de la presente invención tales como la delección o inserción de una o más bases nucleotídicas que no afectan sustancialmente a las propiedades funcionales del transcrito resultante. Cada una de las modificaciones propuestas se encuentra dentro de la experiencia rutinaria en la técnica, como es la determinación de la retención de la actividad biológica de los productos codificados.

Por otra parte, el experto en la técnica reconoce que las secuencias sustancialmente similares también se definen por su capacidad para hibridarse, en condiciones rigurosas (0,1X SSC, SDS al 0,1%, 65°C y lavado con 2X SSC, SDS al 0,1% seguido por 0,1XSSC, SDS al 0,1%), con las secuencias ilustradas en la presente memoria. Los fragmentos de ácido nucleico sustancialmente similares de la presente invención son aquellos fragmentos de ácidos nucleicos cuyas secuencias de ADN son idéntica en al menos aproximadamente 70%, 80%, 90% o 95% a la secuencia de ADN de los fragmentos de ácido nucleico referidos en la presente memoria.

Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando más de aproximadamente 40% de los aminoácidos son idénticos, o más de 60% son similares (funcionalmente idénticos). Preferiblemente, las secuencias similares u homólogas se identifican mediante alineamiento utilizando, por ejemplo, el Programa PileUp GCG (Genetics Computer Group, Manual del programa para el paquete GCG, Versión 7, Madison, Wisconsin).

El término "correspondiente a" se utiliza en la presente memoria para referirse a secuencias similares u homólogas, si la posición exacta es idéntica o diferente de la molécula para la que se mide la similitud u homología. Un alineamiento de secuencias de ácido nucleico o aminoácidos puede incluir espacios. Por lo tanto, el término "correspondiente a" se refiere a la similitud de secuencia, y no a la numeración de los residuos de aminoácidos o bases nucleotídicas.

Una "porción sustancial" de una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos comprende suficiente secuencia de aminoácidos de un polipéptido o secuencia de nucleótidos de un gen para identificar supuestamente ese polipéptido o gen, o bien mediante evaluación manual de la secuencia por un experto en la técnica, o bien mediante comparación e identificación de secuencias computarizada-automatizada utilizando algoritmos tales como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., *J. Mol Biol* 215: 403(1993)); disponible en ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). En general, es necesaria una secuencia de diez o más aminoácidos contiguos o treinta o más nucleótidos con el fin de identificar supuestamente una secuencia de polipéptidos o ácidos nucleicos como homóloga a una proteína o un gen conocidos. Por otra parte, con respecto a las secuencias de nucleótidos, se pueden utilizar sondas de oligonucleótidos específicas de genes que comprenden 20-30 nucleótidos contiguos en métodos de identificación de genes dependientes de la secuencia (p. ej., hibridación de Southern) y aislamiento (p. ej., hibridación in situ de colonias bacterianas o placas de bacteriófagos). Además, se pueden utilizar

oligonucleótidos cortos de 12-15 bases como cebadores de amplificación en la PCR con el fin de obtener un fragmento de ácido nucleico concreto que comprenda los cebadores. Por consiguiente, una "porción sustancial" de una secuencia de nucleótidos comprende suficiente secuencia para identificar y/o aislar específicamente un fragmento de ácido nucleico que comprende la secuencia.

5 El término "porcentaje de identidad", tal como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, determinada comparando las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre secuencias de polipéptidos o polinucleótidos, según sea el caso, determinada por la coincidencia entre hebras de tales secuencias. La "Identidad" y la "similitud" se pueden calcular fácilmente mediante métodos conocidos, incluyendo, pero no limitados a los descritos en:
 10 Computational Molecular Biology (Lesk, A.M., ed.) Oxford University Press, Nueva York (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projets (Smith, D.W., ed.) Academic Press, Nueva York (1993); Computes Analysis of Sequence Data, Parte I (Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds.) Humana Press, Nueva Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., ed.) Academic Press (1987); y Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. y Devereux, J., eds.) Stockton Press, Nueva York (1991). Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para proporcionar la mejor emparejamiento entre las secuencias sometidas a ensayo. Los métodos para determinar la identidad y similitud están codificados en programas de ordenador disponibles públicamente. Los alineamientos de secuencia y los cálculos de porcentaje de identidad se pueden llevar a cabo utilizando un soporte lógico de análisis de secuencia, tal como el programa Megalign del paquete de computación bioinformático Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI). Se pueden llevar a cabo múltiples alineamientos de las secuencias utilizando el método de alineamiento Clustal (Higgins et al., CABIOS. 5:151 (1989)) con los parámetros por defecto (PENALIZACIÓN POR HUECO = 10, PENALIZACIÓN POR LONGITUD DEL HUECO = 10). Se pueden seleccionar los parámetros por defecto para los alineamientos por pares utilizando el método Clustal: KTUPLE 1, PENALIZACIÓN POR HUECO = 3, VENTANA = 5 y DIAGONALES SALVADAS = 5. El término "soporte lógico de análisis de secuencia" se refiere a cualquier algoritmo informático o programa de soporte lógico que sea útil para el
 25 análisis de secuencias de nucleótidos o aminoácidos. El "Soporte lógico de análisis de secuencia" puede estar disponible en el mercado o desarrollarse de manera independiente. El soporte lógico de análisis de secuencia típico incluye, pero no está limitado al, paquete de programas GCG (Wisconsin Package versión 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI), BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990)), y DNASTAR (DNASTAR, Inc. 1228 S. Park St. Madison, WI 53715 Estados Unidos). Dentro del contexto de esta descripción se entenderá que cuando se utiliza el soporte lógico de análisis de secuencia para el análisis, los resultados del análisis se basará en los "valores por defecto" del programa de referencia, a menos que se especifique lo contrario. Según se utiliza en la presente memoria "valores por defecto" significará cualquier conjunto de valores o parámetros que originalmente se carga con el soporte lógico cuando se inicializa por primera vez.

35 "Sintetizado químicamente", en relación con una secuencia de ADN, significa que los nucleótidos componentes se ensamblaron *in vitro*. La síntesis química manual de ADN se puede llevar a cabo usando procedimientos bien establecidos, o la síntesis química automatizada se puede llevar a cabo utilizando una de las diversas máquinas disponibles en el mercado. En consecuencia, los genes se pueden adaptar para la expresión génica óptima basándose en la optimización de la secuencia de nucleótidos para reflejar el sesgo codónico de la célula anfitriona. El experto en la técnica aprecia la probabilidad de expresión génica satisfactoria si el uso de codones está sesgado hacia aquellos codones favorecidos por el anfitrión. La determinación de los codones preferidos se puede basar en un estudio de genes derivados de la célula anfitriona, donde está disponible la información de la secuencia.

45 El término "gen exógeno" se refiere a un gen foráneo para el sujeto, es decir, un gen que se introduce en el sujeto a través de un proceso de transformación, una versión no mutada de un gen mutado endógeno o una versión mutada de un gen no mutado endógeno. El método de transformación no es crítico y puede ser cualquier método adecuado para el sujeto conocido por el experto en la técnica. Los genes exógenos pueden ser genes naturales o sintéticos que se introducen en el sujeto en forma de ADN o ARN que puede funcionar a través de un ADN intermedio, tal como por medio de la transcriptasa inversa. Tales genes se pueden introducir en células diana, introducir directamente en el sujeto, o introducir indirectamente por medio de transferencia de células transformadas en el sujeto.

50 El término "sujeto" se refiere a un animal intacto, preferiblemente un vertebrado, lo más preferiblemente un mamífero.

El término "isoforma de HGF" se refiere a cualquier polipéptido de HGF que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos 80% (p. ej., idéntica en al menos 90% o 95%) a una secuencia de aminoácidos de HGF que se produce naturalmente en un animal, incluyendo todas las variantes alélicas. En una realización, el término se refiere a isoformas que se sabe que tienen actividad de proliferación celular. Las isoformas de HGF incluyen, sin limitación, flHGF, dHGF, NK1, NK2, y NK4. El término "flHGF" se refiere a la proteína HGF completa de un animal, p. ej., un mamífero, p. ej., los aminoácidos 1 a 728 de HGF humano.

60 El término "dHGF" se refiere a la variante por delección de la proteína HGF producida por corte y empalme alternativo del gen de HGF en un animal, p. ej., un mamífero, p. ej., HGF humano que consiste de 723 aminoácidos con delección de cinco aminoácidos en el primer dominio kringle de la cadena alfa (F, L, P, S y S) de la secuencia de HGF completa.

El término "NK1" se refiere a una isoforma de HGF de un animal, p. ej., un mamífero, p. ej., un ser humano, que consiste en los dominios de bucle en horquilla N-terminal y kring1.

El término "NK2" se refiere a una isoforma de HGF de un animal, p. ej., un mamífero, p. ej., un ser humano, que consiste en los dominios de bucle en horquilla N-terminal, kring1, y kring2.

- 5 El término "NK4" se refiere a una isoforma de HGF de un animal, p. ej., un mamífero, p. ej., un ser humano, que consiste en los dominios de bucle en horquilla N-terminal, kring1, kring2, kring3, y kring4.

La composición de la presente invención comprende dos o más isoformas de HGF seleccionadas entre fIHGF, dHGF, NK1, NK2 y NK4. En una realización, las dos o más isoformas de HGF son isoformas de un HGF de mamífero, p. ej., HGF humano. La secuencia de aminoácidos de HGF de diversas especies es bien conocido en la técnica y se puede encontrar en bases de datos de secuencias, tales como GenBank (secuencia de aminoácidos de HGF humano que tiene el número de acceso Baa14348). En una realización, una de las isoformas de HGF es fIHGF humano (SEQ ID NO: 2). En otra realización, una de las isoformas de HGF es dHGF humano (SEQ ID NO: 3). En otra realización, una de las isoformas de HGF es NK1 humano (SEQ ID NO: 4). En otra realización, una de las isoformas de HGF es NK2 humano (SEQ ID NO: 5). En otra realización, una de las isoformas de HGF es NK4 humano (SEQ ID NO: 6). En una realización adicional, las dos o más isoformas de HGF comprenden fIHGF y dHGF. En una realización diferente, las dos o más isoformas de HGF consisten en fIHGF y dHGF.

En una realización, las isoformas de HGF son variantes de isoformas de HGF de tipo salvaje humanas. Por ejemplo, las isoformas pueden ser variantes de la secuencia de fIHGF, dHGF, NK1, NK2, o NK4 humanos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80% con la secuencia de fIHGF (SEQ ID NO: 2), dHGF (SEQ ID NO: 3), NK1 (SEQ ID NO: 4), NK2 (SEQ ID NO: 5), o NK4 (SEQ ID NO: 6) humanos de tipo salvaje, p. ej., una identidad de secuencia de al menos 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99%. La variante puede comprender adiciones, deleciones, sustituciones, o una combinación de las mismas de la secuencia de aminoácidos de una isoforma de HGF humano de tipo salvaje. Las adiciones o sustituciones también incluyen el uso de aminoácidos de origen no natural y se pueden producir en cualquier número internamente, en el extremo N y/o en el extremo C.

Preferiblemente, cualquier sustitución es una sustitución de aminoácidos conservativa. Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el residuo de aminoácido es remplazado por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales alcalinas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej., glicina, asparragina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). La identidad de secuencia se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre esa región de comparación, determinando el número de posiciones en las que existen residuos de aminoácido idénticos en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la región de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. En un aspecto, el porcentaje de identidad se calcula como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la más pequeña de las dos secuencias que se alinean con un residuo de aminoácido idéntico en la secuencia que está siendo comparada, cuando se pueden introducir cuatro huecos en una longitud de 100 aminoácidos para maximizar el alineamiento (Dayhoff, en Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 5, pág. 124, National Biochemical Research Foundation, Washington, DC (1972)). Una determinación de la identidad se realiza típicamente mediante un programa informático de homología conocido en la técnica. Un programa ilustrativo es el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, WI) utilizando las configuraciones por defecto, que utiliza el algoritmo de Smith y Waterman (*Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981)).

En una realización, la variante de una isoforma de HGF conserva sustancialmente la totalidad de una o más de las actividades biológicas de la proteína de la isoforma de HGF de tipo salvaje. El término "sustancialmente toda la actividad biológica del HGF de tipo salvaje", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a una variante de una isoforma de HGF que conserva al menos 70% de una cualquiera o más de las actividades biológicas de la isoforma de HGF (p. ej., la capacidad para estimular la angiogénesis o promover la proliferación celular). En algunas realizaciones, se conserva al menos 75, 80, 85, 90, o 95% de una o más de las actividades biológicas de la isoforma de HGF. La actividad de HGF se puede determinar mediante análisis *in vitro* e *in vivo* rutinarios bien conocidos en la técnica (p. ej., análisis de Matrigel Plug y neovascularización corneal *in vivo*, análisis de membrana corioalantoidea (CAM) de pollo *in vivo/in vitro*, análisis celulares (proliferación, migración, formación de tubo) y organotípicos (anillo aórtico) *in vitro*).

La estructura y la función del HGF se han estudiado extensamente y un experto en la técnica es consciente de los aminoácidos de la secuencia de HGF que son importantes para conservar sustancialmente la totalidad de la actividad biológica de la proteína y que preferiblemente no cambian o solo cambian conservativamente en cualquier variante de la secuencia de HGF. Véanse, p. ej., Hartmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11574 (1992);

Lokker et al., *EMBO J.* 11:2503 (1992), Zhou et al., *Structure* 6:109 (1998), Ultsch et al., *Structure* 6: 1383 (1998), Shimizu et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189:1329 (1992), Yoshiyama et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175:660 (1991). Por ejemplo, parece que son necesarios los dominios de bucle en horquilla N-terminal y kring1 para la actividad de proliferación celular. Otros aminoácidos que no son críticos para la actividad biológica se pueden suprimir y/o sustituir más libremente. Un experto en la técnica puede preparar variantes de isoformas de HGF utilizando mecanismo de mutagénesis rutinarios, tales como los descritos en las referencias citadas anteriormente, e identificar variantes que conservan sustancialmente la totalidad de la actividad biológica de la isoforma de HGF.

En una realización de la invención, las dos o más isoformas de HGF están presentes en la composición en forma de uno o más polinucleótidos que codifican las isoformas. En una realización, los uno o más polinucleótidos codifican isoformas de HGF de mamífero, p. ej., HGF humano. Las secuencias de polinucleótidos del gen de HGF de diversas especies son bien conocidas en la técnica y se pueden encontrar en bases de datos de secuencias tales como GenBank (la secuencia de polinucleótidos del gen de HGF humano que tiene el número de acceso NM000601). En una realización, un polinucleótido codifica fHGF. En otra realización, un polinucleótido codifica dHGF. En otra realización, un polinucleótido codifica NK1. En otra realización, un polinucleótido codifica NK2. En otra realización, un polinucleótido codifica NK4. En una realización adicional, uno o más polinucleótidos codifican tanto fHGF como dHGF. En una realización adicional, los uno o más polinucleótidos codifican fHGF, dHGF, y NK1.

En una realización, los uno o más polinucleótidos que codifican las dos o más isoformas de HGF comprenden una secuencia del gen de HGF humano de tipo salvaje. En otra realización, los polinucleótidos comprenden una variante de secuencia del gen de HGF de tipo salvaje, pero todavía codifican la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje de la isoforma de HGF debido a la degeneración de codones. En una realización adicional, los uno o más polinucleótidos codifican variantes de secuencia de la proteína de la isoforma de HGF como se ha descrito anteriormente. En una realización, las variantes de secuencia de polinucleótidos de la secuencia del gen de la isoforma de HGF humano tienen una identidad de secuencia de al menos 80% con la secuencia de gen de la isoforma de HGF humano de tipo salvaje, p. ej., una identidad de al menos 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99%.

En una realización de la invención, las dos o más isoformas de HGF son codificadas por un gen de HGF híbrido que expresa simultáneamente dos o más de las isoformas, p. ej., fHGF y dHGF. El gen de HGF híbrido, descrito en el documento US 2005/0079581 A1 comprende ADNc correspondiente a los exones 1 a 18 de HGF, y un intrón inherente o foráneo insertado entre los exones 4 y 5 del ADNc, en donde el gen híbrido está desprovisto de otros intrones entre los exones distintos del intrón entre los exones 4 y 5. El intrón comprende un fragmento del intrón inherente o una secuencia recombinante.

Una realización del gen de HGF híbrido que comprende el intrón inherente tiene 7113 pb de longitud y tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7. El gen de HGF híbrido expresa simultáneamente tanto fHGF como dHGF, y tiene una eficacia expresión más alta que el ADNc de fHGF.

La degeneración de codones permite que el gen de HGF híbrido sea modificado o cambiado en la región codificante y/o no codificante sin alterar la secuencia de aminoácidos de la proteína y la expresión del gen. En consecuencia, los polinucleótidos que son sustancialmente idénticos al gen de HGF híbrido del SEQ ID NO: 7, y los fragmentos de los mismos se encuentran dentro del alcance de la invención. "Sustancialmente idéntico" significa que la identidad de la secuencia es no menor de 80%, p. ej., no menor del 90%, p. ej., no menor de 95%.

Un gen de HGF híbrido puede comprender un fragmento de intrón inherente que tiene opcionalmente una pequeña secuencia recombinante insertada en el mismo entre los exones 4 y 5 del ADNc de HGF. En la presente memoria, tal gen de HGF híbrido que comprende un fragmento de intrón inherente se denomina "HGF-X". Los ejemplos incluyen HGF-X6, HGF-X7 y HGF-X8 que tienen la secuencia de nucleótidos de los SEQ ID NO: 8 a 10, respectivamente.

Las dos o más isoformas de HGF que se van a administrar pueden estar codificadas por polinucleótidos separados o por un único polinucleótido. Los polinucleótidos pueden estar conectados operablemente a una o más secuencias reguladoras, p. ej., promotores o intensificadores, que controlan la expresión de las isoformas de HGF. El promotor puede ser un promotor constitutivo (p. ej., el promotor de citomegalovirus humano) o un promotor inducible. Las secuencias reguladoras pueden ser parte de un interruptor génico que regula la expresión de las isoformas de HGF mediante la adición o eliminación de un ligando específico. Los ejemplos de los factores de transcripción dependientes de ligando que se pueden utilizar en los interruptores génicos de la invención incluyen, sin limitación, miembros de la superfamilia de receptores nucleares activados por sus respectivos ligandos (p. ej., glucocorticoides, estrógenos, progestina, retinoides, ecdisona, y análogos y miméticos de los mismos) y rTTA activado por tetraciclina. En una realización adicional, el promotor es un promotor específico de cardiomiocitos, (p. ej., proteína de repetición de anquirina cardiaca, MYBPC3). Cuando las dos o más isoformas de HGF son codificadas por polinucleótidos separados, cada polinucleótido puede estar conectado operablemente a sus propias secuencias reguladoras. En otra realización, los dos o más polinucleótidos pueden estar bajo el control de una única secuencia reguladora como parte de una casete en tándem, opcionalmente con secuencias insertadas entre los dos o más polinucleótidos, p. ej., un sitio interno de unión al ribosoma, para promover la expresión de todas las isoformas.

En una realización de la invención, los uno o más polinucleótidos que codifican las dos o más isoformas de HGF son parte de un vector, p. ej., un vector de expresión. El vector puede ser, p. ej., un vector plasmídico (p. ej., un vector pCK como describen Lee et al., en *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272:230 (2000); el documento WO 2000/040737) o un vector viral con ARN o ADN de hebra sencilla o doble. Tales vectores pueden introducirse en las células mediante técnicas bien conocidas para introducir ADN y ARN en las células. Los vectores virales pueden ser de replicación competente o de replicación defectuosa. En este último caso, la propagación viral generalmente se producirá solo en células anfitrionas de complementación. Según se utiliza en la presente memoria, los términos "célula anfitriona" o "anfitrión" se utilizan para significar una célula de uso en la presente invención que está albergando uno o más polinucleótidos de la invención.

D este modo, como mínimo, los vectores deben incluir los polinucleótidos de uso en la invención. Otros componentes del vector pueden incluir, pero no se limitan a, marcadores seleccionables, dominios de modificación de cromatina, promotores adicionales que dirigen la expresión de otros polipéptidos que también pueden estar presentes en el vector (p. ej., un polipéptido letal), sitios de integración genómicos, sitios de recombinación, y pivotes de inserción molecular. Los vectores pueden comprender cualquier número de estos elementos adicionales, ya sea dentro o no dentro de los polinucleótidos, de manera que el vector se pueda adaptar a los objetivos específicos de los métodos terapéuticos deseados.

Los vectores que se introducen en las células pueden comprender adicionalmente un "gen marcador seleccionable", que, cuando se expresa, indica que el vector ha sido introducido en la célula anfitriona. De esta manera, el gen selector puede ser un marcador positivo para la presencia del vector. Si bien no es crítica para la presente invención, la presencia de un gen marcador seleccionable permite al profesional seleccionar una población de células vivas, cuando el constructo vector ha sido introducido en las células. Por lo tanto, se pueden seleccionar las células en las que se ha introducido con éxito el vector. Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "seleccionar" o variaciones del mismo, cuando se utiliza junto con células, signifique métodos bien conocidos, convencionales para la selección de células con una composición genética o fenotipo específicos. Los métodos típicos incluyen, pero no se limitan a, el cultivo de células en presencia de antibióticos, tales como G418, puromicina y ampicilina. Otros ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen, pero no se limitan a, genes que confieren resistencia a metotrexato, higromicina, o ácido micofenólico. Las células que comprenden un constructo vector que comprende uno o varios genes de resistencia a antibióticos serían capaces en ese caso de tolerar el antibiótico en el cultivo. Del mismo modo, las células que no comprenden un constructo vector que comprende uno o varios genes de resistencia a antibióticos no serían capaces de tolerar el antibiótico en el cultivo.

Según se utiliza en la presente memoria, un "dominio de modificación de cromatina" (CMD) se refiere a secuencias de nucleótidos que interactúan con una variedad de proteínas asociadas con el mantenimiento y/o la alteración de la estructura de la cromatina, tales como, pero no limitadas a, aisladores de ADN. Véase Ciavatta et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:9958 (2006). Los ejemplos de los CMD incluyen, pero no se limitan a, el aislador de β -globulina de pollo y el sitio hipersensible 4 de pollo (cHS4). El uso de diferentes secuencias de CMD entre uno o más programas de genes (es decir, un promotor, una secuencia codificante, y una región reguladora 3'), p. ej., puede facilitar el uso de las secuencias de ADN de CMD diferenciales como "minibrazos de homología" combinadas con diversos microorganismos o tecnologías de recombinación *in vitro* para "intercambiar" programas de genes entre vectores lanzadera multigénicos y monogénicos existentes. Otros ejemplos de dominios de modificación de la cromatina son conocidos en la técnica o se pueden identificar fácilmente.

Los vectores concretos para uso con la presente invención son vectores de expresión que codifican proteínas o polinucleótidos. Generalmente, tales vectores comprenden regiones de control que actúan en cis eficaces para la expresión en un anfitrión conectadas operativamente al polinucleótido que se va a expresar. Los factores que actúan en trans apropiados son suministrados por el anfitrión, suministrados por un vector de complementación o suministrados por el propio vector tras la introducción en el anfitrión.

Se puede utilizar una gran variedad de vectores de expresión para expresar proteínas o polinucleótidos. Tales vectores incluyen vectores cromosómicos, episómicos y derivados de virus, p. ej., vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de episomas de levadura, de elementos cromosómicos de levadura, de virus tales como virus adeno-asociados, lentivirus, baculovirus, papovavirus, SV40, virus vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus de pseudorrabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como los derivados de elementos genéticos de plásmidos y bacteriófagos, tales como cósmidos y fagémidos. Todos se pueden utilizar para la expresión de acuerdo con este aspecto de la presente invención. Generalmente, se puede utilizar cualquier vector adecuado para mantener, propagar o expresar polinucleótidos o proteínas en un anfitrión para su expresión a este respecto.

La secuencia de polinucleótidos del vector de expresión está conectada operativamente a una o varias secuencias de control de la expresión apropiadas, incluyendo, p. ej., un promotor para dirigir la transcripción del ARNm. Los promotores adicionales representativos incluyen, pero no se limitan a, promotores constitutivos y promotores específicos de tejidos o inducibles. Los ejemplos de los promotores eucarióticos constitutivos incluyen, pero no se limitan a, el promotor del gen de la metalotioneína I de ratón (Hamer et al, *J. Mol. Appl. Gen.* 1:273 (1982)); el promotor TK del virus Herpes (McKnight, *Cell* 31:355 (1982)); el promotor temprano de SV40 (Benoist et al., *Nature* 290:304 (1981)); y el promotor del virus vaccinia. Los ejemplos adicionales de los promotores que se pueden utilizar

para dirigir la expresión de una proteína o polinucleótido incluyen, pero no están limitados a, promotores específicos de tejidos y otros promotores endógenos para proteínas específicas, tales como el promotor de albúmina (hepatocitos), un promotor de la proinsulina (células beta pancreáticas) y similares. En general, los constructos de expresión contendrán sitios para la transcripción, iniciación y terminación y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La porción codificante de los transcritos maduros expresados por los constructos puede incluir un AUG de inicio de la traducción al principio y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) situado apropiadamente al final del polipéptido que se va a traducir.

Además, los constructos pueden contener regiones de control que regulan, así como engendran la expresión. En general, tales regiones operarán controlando la transcripción, tales como sitios de unión al represor e intensificadores, entre otros.

Los ejemplos de vectores eucarióticos incluyen, pero no se limitan a, pW-LNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG asequibles de Stratagene; pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL asequibles de Amersham Pharmacia Biotech; y pCMVDsRed2-express, pIRES2-DsRed2, pDsRed2-Mito, y pCMV-EGFP asequibles de Clontech. Muchos otros vectores son bien conocidos y están disponibles en el mercado.

La selección de los vectores y promotores adecuados para la expresión en una célula anfitriona es un procedimiento bien conocido, y los mecanismos requeridos para la construcción del vector y la introducción en el anfitrión, así como su expresión en el anfitrión están dentro del conocimiento práctico rutinario de la técnica.

La introducción de los polinucleótidos en las células puede ser una transfección transitoria o una transfección estable del vector. La transfección transitoria de los vectores a la célula anfitriona se puede efectuar mediante inyección directa, transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección, u otros métodos. Tales métodos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology* (1986); Keown et al., *Meth. Enzymol.* 185:527 (1990); Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

En una realización, la composición de la invención se formula para inyectable.

La composición farmacéutica de la invención puede comprender adicionalmente vehículos farmacéuticamente aceptables. Se puede utilizar cualquiera de los procedimientos convencionales en el campo farmacéutico para preparar formulaciones orales tales como comprimidos, cápsulas, píldoras, gránulos, suspensiones y disoluciones; formulaciones inyectables, tales como disoluciones, suspensiones o polvos secos que se pueden mezclar con agua destilada antes de la inyección; formulaciones aplicables localmente, tales como pomadas, cremas y lociones; y otras formulaciones.

Los portadores utilizados generalmente en el campo farmacéutico se pueden emplear en la composición de la presente invención. Por ejemplo, las formulaciones administradas oralmente pueden incluir aglutinantes, emulsionantes, agentes disgregantes, excipientes, agentes solubilizantes, agentes dispersantes, agentes estabilizantes, agentes suspensores, agentes colorantes o especias. Las formulaciones inyectables pueden comprender conservantes, agentes analgésicos, agentes solubilizantes o agentes estabilizantes. Las preparaciones para la administración local pueden contener bases, excipientes, lubricantes o conservantes. Cualquiera de las formulaciones adecuadas conocidas en la técnica (*Remington's Pharmaceutical Science* (18ª edición), Mack Publishing Company, Eaton PA) se puede utilizar en la presente invención.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar clínicamente en forma de diferentes formulaciones orales y parenterales. Una formulación adecuada se puede preparar utilizando tales excipientes como aditivos, potenciadores, aglutinantes, agentes humectantes, agentes disgregantes y tensioactivos, o diluyentes. Las formulaciones sólidas para administración oral incluyen píldoras, comprimidos, polvo para espolvorear, gránulos y cápsulas. Esas formulaciones sólidas se pueden preparar mezclando uno o más excipientes, p. ej., almidón, carbonato de calcio, sacarosa, lactosa y gelatina con derivados lignano de dibencilbutil lactona. Asimismo, se pueden incluir en la formulación lubricantes tales como estearato de magnesio y talco. Las formulaciones líquidas para administración oral incluyen suspensión, disolución, emulsión y jarabe. Esas formulaciones pueden contener agentes humectantes, edulcorantes, aromatizantes y conservantes, además de diluyentes simples generales, tales como agua y parafina líquida. Las formulaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones, emulsiones acuosas esterilizadas, tratamientos alternativos liofilizados y supositorios. Los excipientes y agentes suspensores insolubles en agua comprenden grasas vegetales tales como propilenglicol, polietilenglicol y aceite de oliva, y ésteres inyectables, tales como oleato de etilo. Se pueden utilizar Witepsol[®], Macrogol[®], Tween[®] 61, grasas de cacao, grasas de laurina y glicerogelatinas como bases de supositorios.

Los siguientes ejemplos se proporcionan con fines meramente ilustrativos, y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Construcción de plásmidos

El vector pCK puede dirigir la expresión génica a partir del promotor de citomegalovirus humano (HCMV), y se ha descrito previamente (Lee et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272:230 (2000); documento WO 2000/040737).

5 Se construyó pCK-VEGF165 insertando ADNc de VEGF 165 en el vector pCK, y se ha descrito previamente (Lee et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272:230 (2000); documento WO 2000/040737).

pCK-cHGF contiene el ADNc que codifica HGF 728 bajo el control de un promotor de HCMV, y se ha descrito previamente (documento US 2005/0079581).

pCK-dHGF contiene el ADNc que codifica HGF 723 bajo el control de un promotor de HCMV, y se ha descrito previamente (documento PCT/KR03/00548).

10 pCK-HGF-X7 contiene un ADNc de HGF híbrido (SEQ ID NO: 9), que fue diseñado para expresar 2 isoformas de HGF simultáneamente insertado en el vector pCK, y ha sido descrito previamente (documento US 2005/0079581).

Ejemplo 2: Efecto del HGF sobre la migración y la proliferación celular

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de HGF sobre la migración y la proliferación celular *in vitro*.

1. Materiales y Métodos

15 (1) Preparación de la proteína HGF

Se transfectó pCK-HGF-X7 a células 293T utilizando FuGENE6™ (Roche Diagnostics, Alemania). Como controles, se usaron pCK, pCK-cHGF y pCK-dHGF. Dos días después de la transfección, se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo que contenían la proteína HGF y la cantidad de HGF se midió mediante ELISA de HGF humano (R & D Systems, MN, Estados Unidos), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

20 (2) Análisis de migración celular

Se evaluó el efecto de HGF sobre la migración de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC, Agiolab Co., Ltd., AL01-0122S), mioblastos esqueléticos de ratón (C2C12, ATCC Núm. CRL-1772) y cardiomioblastos de (H9C2, ATCC Núm. CRL-1446) en un análisis de cámara de Boyden modificado. Los insertos de la cámara de cultivo celular de tipo 24 Transwell (Corning, NY, Estados Unidos) que tenía filtros de policarbonato poroso (tamaño de poro 8 µm) se recubrieron con gelatina al 1% en PBS. Se añadieron HUVEC (n = 15) suspendidas en medio M199 con un suplemento de 1% de FBS, y células C2C12 (n = 10) o H9C2 (n = 10) suspendidas en medio DMEM con un suplemento de 3% de FBS, respectivamente, a los insertos a 1 x 10⁴ células por pocillo. Las sustancias de ensayo (sobrenadantes de las células 293T transfectadas con pCK, pCK-cHGF, pCK-dHGF o pCK-HGF-X7) se diluyeron a una concentración final de HGF de 50 ng/ml en M199 o DMEM con un suplemento de 1% o 3% de FBS respectivamente, y se colocaron 600 µl de las sustancias de ensayo diluidas en la cámara inferior. Se permitió que las células migraran durante 3 horas a 37°C en una incubadora con CO₂, a continuación, los insertos se elevaron, se enjuagaron con PBS, se fijaron con formaldehído al 4% durante 10 min, y se tiñeron con cristal violeta al 0,2%. La migración celular se cuantificó contando las células situadas en el lado opuesto de los insertos. Las células se contaron a partir de 5 campos de alta potencia (x 200) en cada inserto. La imagen se analizó utilizando Image-Pro® plus (Media Cybernetics, Estados Unidos).

25
30
35

(3) Análisis de proliferación celular

Se evaluó el efecto de HGF sobre la proliferación de las células HUVEC usando un análisis de incorporación de timidina [³H]. Las células HUVEC (n = 10) suspendidas en medio M199 con un suplemento de 1% de FBS se cultivaron en placa sobre una placa de 96 pocillos a 5 x 10³ células por pocillo. Se añadieron a las células 10 ng de proteína HGF (sobrenadantes de las células 293T transfectadas con pCK, pCK-cHGF, pCK-dHGF o pCK-HGF-X7). Las células se dejaron proliferar durante 48 horas a 37°C en una incubadora con CO₂. Después de eso, se añadió 1 µCi de timidina [³H] a cada pocillo y las células se incubaron durante otras 16 horas a 37°C. Las células se cosecharon y se midió la incorporación de timidina [³H] utilizando un contador de centelleo líquido (Wallac, Turku, Finlandia).

40

45 2. Resultados y Discusión

Para explorar los efectos biológicos de las dos isoformas de la proteína HGF, se examinó su efecto sobre la migración y la proliferación celular. Estos análisis se realizaron utilizando sobrenadantes de las células 293T transfectadas con cada vector de expresión como se ha descrito en Materiales y Métodos. En todos los experimentos, se utilizó la cantidad idéntica de proteína HGF.

50 Como se muestra en las Figuras 1, 2 y 3, la presencia de dos isoformas de HGF producidas a partir de pCK-HGF-X7 indujo más eficazmente la migración de células HUVEC, C2C12 y H9C2, respectivamente, en comparación con cuando solo estuvo presente una isoforma. La presencia de dos isoformas de HGF también promovió la proliferación

eficaz de células HUVEC (Figura 4). El sobrenadante producido a partir de células transfectadas con pCK-HGF-X7 indujo más eficazmente la proliferación de células HUVEC que el sobrenadante producido a partir de células transfectadas con pCK-dHGF. Estos resultados muestran que los efectos combinados de dos isoformas de HGF produjeron actividades de migración y proliferación más potentes en las células endoteliales, y actividades de migración más potentes en mioblastos esqueléticos y cardíacos.

La migración de las células endoteliales vasculares está fuertemente asociada con la angiogénesis, y la migración de las células precursoras del músculo de miocardio y esquelético es una etapa crucial en el desarrollo muscular y la regeneración muscular post-lesional. Por lo tanto, estos resultados muestran que la administración de ambas isoformas de HGF puede proporcionar una manera más eficaz para inducir la neovascularización y la regeneración de los tejidos isquémicos. La migración y proliferación de células endoteliales vasculares son también el proceso natural asociado con la formación de la pared del vaso. Por lo tanto, estos resultados también muestran que la administración de ambas isoformas de HGF puede promover la re-endotelización de las paredes de los vasos sanguíneos.

Ejemplo 3: Evaluación de la eficacia de HGF en modelo de enfermedad de corazón isquémico de rata

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto cardio-protector de la inyección intramiocárdica de HGF en un modelo de enfermedad de corazón isquémico de rata. El procedimiento experimental se proporciona en la Figura 5.

1. Materiales y Métodos

(1) Animales

Se proporcionaron agua y alimento ad libitum a 38 ratas Sprague-Dawley (macho, 12 semanas de edad, 350 a 400 g, SLC) a su llegada, y se dispusieron 7 días de descanso antes de ser sometidas a la cirugía.

(2) Modelo de infarto de miocardio

Para el análisis de la eficacia farmacológica de HGF en el presente estudio, se empleó un modelo de enfermedad de corazón isquémico de rata, uno de los modelos patológicos más ampliamente utilizados para EAC. Las ratas se anestesiaron con una inyección intramuscular de xilazina (5 mg/kg) seguido de cetamina (50 mg/kg). Después de la esterilización con alcohol del 95% y yodo, el tórax se cubrió con un paño quirúrgico estéril y solo se expuso el área de la incisión, proporcionando de ese modo una condiciones completamente estériles para la cirugía. La intubación endotraqueal se realizó por vía orotraqueal. Durante la operación, se mantuvo ventilación con presión positiva. Los electrocardiogramas y la saturación de oxígeno verificaron continuamente. Se realizó toracotomía mediana. Después de abrir el pericardio, seguido de la exploración de la pared arterial del ventrículo izquierdo, se ligó el tercio proximal de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (DAI) utilizando suturas de polipropileno 6-0 reforzadas con un pequeño trozo de Nelaton (5Fr). Se confirmó la elevación del segmento ST en el electrocardiograma verificado. Después de la ligadura de DAI durante 60 minutos, se reperfundió el miocardio isquémico de rata. Las heridas del pericardio y de la toracotomía se cerraron. Un único tubo torácico conectado a una succión de la pared mediana se retiró después de que regresara suficiente respiración espontánea y se retiró el tubo endotraqueal. A continuación, la incisión se verificó para comprobar la presencia de hemorragia. Después de controlar en sangrado, se suturaron el músculo en el que se había realizado la incisión, la fascia y la piel. Después de la cirugía, se administró por vía intramuscular gentamicina (3 mg/kg/día) durante 3 días para prevenir la infección. Se realizó un ecocardiograma transtorácico 28 días después de la cirugía para confirmar la inducción de infarto de miocardio en ratas.

(3) Diseño del estudio de evaluación de la eficacia

Se sometió a ensayo la eficacia de HGF inyectando directamente los plásmidos que contenían el gen de HGF en el músculo cardíaco isquémico y observando el efecto cardioprotector fisiológicamente y anatómicamente. Los plásmidos que contenían el gen de HGF se administraron inmediatamente después de la inducción de la isquemia (Día 0). A cada animal se le inyectó intramiocárdicamente una dosis total de 250 µg de pCK-cHGF (n = 12) o pCK-HGF-X7 (n = 10). Para los controles negativos y positivos, se inyectó la misma cantidad de vector pCK que carecía de la secuencia codificante de HGF (n = 7), y pCK-VEGF165 (n = 9). Las mejoras de la función fisiológica del corazón se evaluaron mediante ecocardiografía transtorácica en los Días 1, 14, 28 y 56 después de la inyección de ADN. Los niveles de angiogénesis y anti-fibrosis se midieron después de la autopsia.

(4) Análisis cardiofisiológico

El Día 1, se midieron la fracción de eyección ventricular izquierda y el septo interventricular sistólico mediante ecocardiografía transtorácica. Los valores obtenidos el Día 1 se establecen como valores de referencia. Los Días 14, 28 y 56, se realizó de nuevo una ecocardiografía. Los valores obtenidos en los Días 1, 14, 28 y 56 se compararon entre los grupos con pCK, pCK-HGF-X7, pCK-cHGF y pCK-VEGF165. Además, se tomaron cortes de tejido de los corazones isquémicos para analizar los cambios en la densidad capilar y la fibrosis en el ventrículo izquierdo.

(5) Análisis de la densidad capilar

El Día 56, se obtuvieron tejidos miocárdicos de corazón isquémico y se fijaron en disolución de formalina al 10% durante 2 días, a continuación se incluyeron en parafina. Se prepararon unas pocas secciones seriadas a partir de cada espécimen. En las secciones de tejido, se identificaron las células endoteliales de los capilares mediante tinción con el anticuerpo CD31. La densidad capilar se analizó cuantitativamente con un microscopio con un aumento de 400x y se presentó como el número de capilares por $0,15 \text{ mm}^2$ (Image-Pro® plus, Versión 4.1, Media Cybernetics, Bethesda, Maryland, Estados Unidos). A continuación se comparó el valor entre los grupos de tratamiento.

(6) Análisis anti-fibrosis

El Día 56, se obtuvieron tejidos de miocardio del corazón isquémico y se fijaron en disolución de formalina al 10% durante 2 días y a continuación se incluyeron en parafina. Se prepararon unas pocas secciones seriadas a partir de cada espécimen y se tiñeron con Trichrom para evaluar el contenido de colágeno. Área fibrótica del ventrículo izquierdo se analizó cuantitativamente bajo un microscopio a un aumento de 8x. A continuación se comparó el valor entre los grupos de tratamiento.

(7) Estadística

Los resultados se presentaron como la media \pm ETM y se analizaron utilizando SPSS (Versión 10.0, SPSS. Inc., Chicago, IL, Estados Unidos). El análisis estadístico de todos los datos se realizó utilizando un ANOVA de una vía y la posterior prueba de LSD o la prueba de Tukey para determinar la significación de las diferencias en las comparaciones múltiples. Los valores de P inferiores a 0,05 se consideraron significativos.

2. Resultados

(1) Inducción de infarto de miocardio del ventrículo izquierdo en ratas

Se realizó un ecocardiograma transtorácico 28 días después de la inducción del infarto de miocardio para confirmar el modelo de enfermedad animal. Se observó que la función fisiológica del ventrículo izquierdo disminuyó significativamente después de la inducción quirúrgica de isquemia miocárdica. Asimismo, se observó fibrosis miocárdica en la pared anterolateral del ventrículo izquierdo.

(2) Efecto de HGF sobre la función del ventrículo izquierdo

Se compararon los cambios en la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) después de la inyección de ADN entre los grupos de tratamiento. Los Días 1 y 14, no hubo diferencia estadísticamente significativa en la FEVI entre los grupos. Sin embargo, a los 28 días después del tratamiento con ADN intra-miocárdico, el valor de FEVI fue estadísticamente significativamente mayor en el grupo de tratamiento con pCK-HGF-X7 ($40,77 \pm 2,92\%$) en comparación con el grupo de pCK ($31,24 \pm 3,58\%$, $p = 0,028$) o el grupo de pCK-cHGF ($33,99 \pm 2,26\%$, $p = 0,069$). El valor de FEVI en el grupo de pCK-VEGF165 ($39,63 \pm 2,44\%$) parecía ser mayor que el grupo de pCK ($p = 0,056$) o el grupo de pCK-cHGF ($p = 0,138$), pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. Se observó un patrón similar el día 56 después del tratamiento (Figura 6).

También se compararon los cambios en el septo inter-ventricular sistólico (SIV) tras el tratamiento de ADN. El IVS sistólico se incrementó significativamente solo en el grupo tratado con pCK-HGF-X7; el día 56, el SIV del grupo tratado con pCK-HGF-X7 fue considerablemente mayor que el de los grupos tratados con pCK ($p = 0,061$), pCK-VEGF165 ($p = 0,012$) o pCK-cHGF ($p = 0,011$) (Figura 7).

(3) Efecto de HGF sobre la densidad capilar

El Día 56, la densidad capilar de los tejidos del miocardio de la zona límite isquémica fue de $300,00 \pm 14,71$ por $0,15 \text{ mm}^2$ para el grupo de tratamiento con pCK-HGF-X7. Esta densidad capilar fue significativamente mayor que $227,54 \pm 6,16$ por $0,15 \text{ mm}^2$ del grupo de pCK ($p < 0,001$), $247,38 \pm 7,52$ por $0,15 \text{ mm}^2$ del grupo de pCK-VEGF165 ($p = 0,001$) o $231,35 \pm 5,55$ por $0,15 \text{ mm}^2$ del grupo de pCK-cHGF ($p < 0,001$) (Figura 8).

(4) Efecto de HGF sobre la fibrosis miocárdica

El Día 56, el grado de fibrosis en el ventrículo izquierdo fue de $18,88 \pm 1,81\%$ para el grupo de tratamiento con pCK-HGF-X7. Este porcentaje de fibrosis fue significativamente menor que $30,20 \pm 2,35\%$ del grupo de pCK ($p = 0,009$). El grado de fibrosis en el grupo de pCK-VEGF165 ($20,96 \pm 2,25\%$) también fue menor que el del grupo de pCK ($p = 0,049$), aunque la diferencia fue estadísticamente menos significativa en comparación con el grupo de pCK-HGF-X7. Pero el grado de fibrosis en el grupo de pCK-cHGF ($25,02 \pm 2,49\%$) no fue considerablemente menor que el del grupo de tratamiento con pCK ($p = 0,411$) (Figura 9).

3. Discusión

Se evaluó el potencial terapéutico de HGF en el modelo de enfermedad de corazón isquémico de rata, que es un modelo animal bien conocido para EAC. El día 0, se generó isquemia cardíaca mediante el procedimiento quirúrgico y se inyectaron un total de 250 µg de plásmidos que contenían el gen de HGF o ADN de control en el miocardio isquémico. Los efectos de HGF se evaluaron mediante análisis ecocardiográfico y/o histológico. La función del corazón isquémico mejoró significativamente en el grupo de tratamiento con pCK-HGF-X7. El grupo de pCK-cHGF no mostró ninguna mejoría significativa en la función del corazón, a pesar de que pCK-cHGF expresa una isoforma de la proteína HGF.

Ejemplo 4: Evaluación de la eficacia de pCK-HGF-X7 en pruebas clínicas en seres humanos

La eficacia de pCK-HGF-X7 se evaluó en una prueba clínica en seres humanos. A dos sujetos sometidos a injerto de derivación de arteria coronaria (CABG) se les inyectaron 0,5 mg de pCK-HGF-X7.

1. Métodos

(1) Sujetos

Los sujetos fueron incluidos en la prueba cuando se cumplían los siguientes criterios; 1) edad de 19 a 75 años, 2) con un defecto de perfusión reversible (más de 7 por ciento de diferencia entre la perfusión en reposo y bajo esfuerzo) mediante evaluación de MIBI-SPECT, 3) que se había estimado que seguían teniendo un área revascularización incompleta después de CABG o que se había estimado que tenían un territorio de perfusión miocárdica que no era adecuado para CABG.

Los sujetos se excluyeron si tenían un historial previo o evidencia actual de 1) malignidad, 2) arritmia ventricular no controlada, 3) insuficiencia cardíaca avanzada o evidencia de disfunción ventricular izquierda por encima de Killip de clase II y con una fracción de eyección ventricular izquierda <25% mediante ecocardiografía 2D transtorácica, 4) enfermedad infecciosa grave, 5) trastorno de la sangre no controlado, 6) enfermedad cardíaca valvular y necesidad cirugía de citorreducción del ventrículo izquierdo, 6) retinopatía proliferativa, 7) ictus, 8) hipertensión esencial no controlada mediante evaluación de la JNC II, 9) enfermedad severa de hígado y riñón, o 10) CABG previa.

El protocolo fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional del Hospital Universitario Nacional Seúl, así como por la Administración de Alimentos y Fármacos de Corea.

(2) Estudio de perfusión miocárdica MIBI-SPECT

Se realizó ⁹⁹Tc-MIBI SPECT sincronizada (Vertex EPIC, ADAC Labs, CA., Estados Unidos) en reposo y después de esfuerzo farmacológico con adenosina en todos los pacientes antes del tratamiento pCK-HGF-X7 y 3 y 6 meses después del tratamiento con pCK-HGF-X7. Las imágenes de SPECT se construyeron mediante electrocardiografía sincronizada, y se analizaron con un modelo de 20 segmentos semicuantitativo utilizando un programa de autocuantificación (AutoQUANT, ADAC Labs, CA., Estados Unidos).

El siete por ciento de la diferencia entre las puntuaciones de perfusión en reposo y esfuerzo bajo perfusión SPECT es la línea inferior del defecto de perfusión reversible en la isquemia miocárdica. Por lo tanto, $\geq 7\%$ de la diferencia entre la perfusión en reposo y esfuerzo indica que un miocardio tiene defecto de perfusión reversible y $< 7\%$ de diferencia indica que el miocardio tiene la perfusión normal.

Las puntuaciones de la perfusión en reposo y esfuerzo se obtuvieron del número de segmento 10 y 16 de la imagen SPECT de ojo de buey, y la diferencia de las puntuaciones se evaluó el periodo de escrutinio, 3 y 6 meses después de la inyección de pCK-HGF-X7 (Figura 10).

(3) Inyección intramiocárdica de pCK-HGF-X7 bajo CABG

El injerto de derivación de la arteria de la arteria coronaria descendente anterior izquierda y la arteria coronaria circunfleja se completó mediante esternotomía mediana convencional. Se administraron 0,5 mg de pCK-HGF-X7 (0,125 mg/0,25 mL/inyección; 4 sitios/paciente) mediante inyección intramiocárdica en ambos lados de la arteria descendente posterior, que no era adecuada para CABG cuando se evaluó mediante MIBI-SPECT, a pesar de tener disminución de la perfusión. Los números de segmento a los que se administró pCK-HGF-X7 fueron 10 y 16 de la imagen de ojo de buey obtenida a partir de MIBI-SPECT (Figura 11).

2. Resultados y Discusión

(1) Efecto de pCK-HGF-X7 en la perfusión miocárdica bajo MIBI-SPECT

Se comparó la diferencia entre las puntuaciones de perfusión en reposo y esfuerzo bajo SPECT antes y después de la inyección de pCK-HGF-X7. En el primer sujeto, la diferencia media entre las puntuaciones de perfusión en reposo y esfuerzo antes de la inyección de pCK-HGF-X7 fue de 16%. A los 3 y 6 meses de la inyección de pCK-HGF-X7, la diferencia media entre las puntuaciones de perfusión en reposo y esfuerzo en la zona de inyección (número de

segmento 10 y 16) fue de 3,5% y 0,5%, lo que fue significativamente diferente del valor de referencia. En el segundo sujeto, la diferencia media entre las puntuaciones de perfusión en reposo y esfuerzo antes de la inyección de pCK-HGF-X7 fue de 9%. A los 3 y 6 meses de la inyección pCK-HGF-X7, la diferencia media entre las puntuaciones de perfusión en reposo y esfuerzo en la zona de inyección (número de segmento 10 y 16) fue 4% y 3,5%, lo que fue significativamente diferente del valor de referencia línea (Figura 12).

En conclusión, la inyección intramiocárdica de pCK-HGF-X7 a sujetos afectados puede cambiar el estado de la perfusión miocárdica de un defecto reversible a la normalidad. Estos resultados indican que la administración de pCK-HGF-X7 puede mejorar significativamente la perfusión miocárdica.

Ejemplo 5: Evaluación de la eficacia de pCK-HGF-X7 en modelo de isquemia ameroide porcina

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto cardioprotector de la inyección endocárdica percutánea de pCK-HGF-X7 utilizando un catéter bajo la dirección del sistema de imagen cardíaca en un modelo de isquemia ameroide porcina.

1. Materiales y Métodos

(1) Animal

Se proporcionaron alimento y agua ad libitum a cerdos domésticos Yorkshire castrados (n = 9, macho, 20 a 40 Kg) a su llegada, y se dispusieron 7 días de descanso antes de ser sometidos a cirugía.

(2) Modelo de isquemia ameroide porcina

El modelo porcino de isquemia miocárdica crónica a través de constricción ameroide es un modelo preclínico bien establecido, clínicamente relevante y aceptado de isquemia miocárdica crónica en el ensayo de nuevas terapias angiogénicas. Este modelo simula la anatomía coronaria humana, así como la extensión de la formación de vasos en respuesta a la isquemia en seres humanos. Además, este modelo porcino está bien establecido en el ensayo de dispositivos médicos cardiovasculares, debido a las similitudes en el tamaño y la anatomía con el sistema cardiovascular humano.

Los cerdos se sometieron a una implantación quirúrgica de un constrictor ameroide a la circunfleja izquierda proximal para crear isquemia crónica. Los cerdos se sedaron mediante una inyección intramuscular de Telazol® 4-6 mg/kg y Sulfato de Atropina de 0,02 a 0,05 mg/kg. A continuación se administró Isoflurano a través de mascarilla para inducir la anestesia general para intervenciones quirúrgicas. Los cerdos se intubaron y se prepararon adecuadamente para la cirugía. Los cerdos se colocaron en decúbito lateral derecho. Un goteo intravenoso de Plasmalyte y lidocaína mantuvo la hidratación durante toda la operación y controló cualquier arritmia. Se aplicó disolución de Scrub para preparar de forma estéril el lugar de la cirugía, el tórax se cubrió con cobertores de tela estériles y el animal completo se cubrió con un cobertor corporal. Se administró bromuro de pancuronio por vía intravenosa para la relajación muscular después del establecimiento de un plano profundo de anestesia. Se realizó una incisión de 20 cm en el tórax izquierdo en el quinto espacio intercostal. Las costillas se replegaron seguido de los pulmones, y se envolvieron en gasas empapadas con disolución salina. El pericardio se abrió inmediatamente distal al nervio frénico mediante una incisión horizontal y el corazón se suspendió en una cuna pericárdica. La arteria coronaria circunfleja (LCX) se disecó una distancia de aproximadamente 0,5 cm proximal a la primera rama marginal y se colocó alrededor de la misma un constrictor ameroide del tamaño apropiado para la arteria. Todos los materiales colaterales que podrían afectar al lecho de la CxI se ligaron de forma permanente. Se administró bolo de lidocaína cuando fue necesario para el control de las arritmias. El pericardio no se cerró rutinariamente mediante sutura, sino que se utilizó como una ayuda para asegurar el ameroide en su lugar en la arteria. Se utilizó sutura gut crómica (PDS II) en un patrón continuo para cerrar las capas musculares. Se utilizó sutura trenzada Dexon™ por vía subcutánea. Se utilizaron grapas quirúrgicas para cerrar la piel. A continuación todos los cerdos recibieron enrofloxacina (5,0 mg/kg/día) por vía intramuscular durante 3 días para prevenir la infección.

(3) Diseño del estudio de evaluación de la eficacia

Cuatro semanas después de la implantación del ameroide, los cerdos fueron asignados al azar para recibir 1 mg de pCK-HGF-X7 [grupo de dosis baja: 1 mg/2 ml (n = 3)], 4 mg de pCK-HGF-X7 [grupo de dosis alta: 4 mg/8 ml (n = 3)] o artículo de control que consiste en los mismos tampones de excipiente utilizado con pCK-HGF-X7 [grupo de control de vehículo: 8 ml (n = 3)]. Los artículos se administraron utilizando un catéter de suministro NOGA® MyoStar (Biosense Webster, Estados Unidos) en ruta transendocárdica. Cada animal recibió ocho inyecciones (grupo de dosis baja: 0,125 mg/0,25 ml/sitio de inyección) o dieciséis (grupo de dosis alta: 0,25 mg/0,5 ml/sitio de inyección) de pCK-HGF-X7 o artículo de control (grupo de control de vehículo: 0,5 ml/sitio de inyección) en la zona limítrofe del miocardio viable y el isquémico en la pared lateral y posterior. Con el fin de evaluar el resultado funcional del tratamiento con pCK-HGF-X7, se determinó la perfusión miocárdica (κ) en el pico de esfuerzo antes y después del tratamiento con ADN medido mediante ecocardiografía de esfuerzo de contraste miocárdico.

55

2. Resultados

Se compararon los cambios en la perfusión miocárdica en el pico de esfuerzo antes y después de la inyección de ADN del plásmido entre los grupos de tratamiento. En el grupo de control de vehículo, el Día 30 mostró una tendencia a la disminución de la perfusión en comparación con la del Día 0. Sin embargo, dos grupos de pCK-HGF-X7 el Día 30 mostraron una tendencia a la conservación de perfusiones en comparación con la del día 0 (Figura 13). Estos resultados sugirieron que la transferencia transendocárdica de pCK-HGF-X7 podría proteger contra la disminución de la perfusión miocárdica inducida por la isquemia miocárdica.

Estos resultados muestran que el HGF puede ser suministrado utilizando un catéter. El catéter de inyección transendocárdica percutánea se ha usado para la inyección endocárdica de diversos fármacos, p. ej., células madre, adenovirus y ADN desnudo bajo la dirección del sistema de navegación cardíaco electromecánico en pruebas clínicas. Estos resultados indican que el ADN del plásmido pCK-HGF-X7 se puede administrar de forma segura en el miocardio con una disminución de la perfusión en forma de una inyección transendocárdica percutánea utilizando un catéter bajo dirección electromecánica. De este modo, se pueden utilizar sistemas de inyección de catéter para transferir pCK-HGF-X7 al corazón en pacientes que tienen tejido cardíaco isquémico, tal como, angina de pecho estable o inestable o infarto de miocardio agudo o crónico.

Ejemplo 6: Suministro de células que expresan HGF

Se puede suministrar HGF en forma de células que comprenden pCK-HGF-X7. Las células madre mesenquimales se recogen de un sujeto. La fuente de las células madre mesenquimales puede ser producto aspirado de médula o sangre periférica movilizada. Las células madre mesenquimales recogidas se cultivan y se transfectan con pCK-HGF-X7 utilizando liposomas. A continuación las células se recogen, se lavan con solución salina, se vuelven a suspender en solución de infusión, y se infunden en el sujeto. Las células madre mesenquimales transfectadas con pCK-HGF-X7 se pueden administrar al tejido cardíaco isquémico e infartado i) en forma de una inyección intramiocárdica usando una jeringa, o ii) en forma de una inyección transendocárdica percutánea utilizando un catéter bajo la dirección electromecánica.

Ejemplo 7: Implante endoluminal liberador de pCK-HGF-X7

Este ejemplo demuestra la producción de implantes endoluminales liberadores de plásmido.

A. Producción de implante endoluminal de acero inoxidable liberador de plásmido

1. Materiales y Métodos

(1) Implante endoluminal de acero inoxidable

Los implantes endoluminales de acero inoxidable (SS Stent, Liberté[®], 3,0 mm x 20 mm) se adquirieron de Boston Scientific (Estados Unidos). (2) Producción de implante endoluminal de SS liberador de pCK-HGF-X7

a. Producción de implante endoluminal de SS liberador de pCK-HGF-X7 no basado en polímero

Para lavar la superficie de los puntales "struts" del implante endoluminal de SS, los implantes endoluminales se sometieron a sonicación tres veces en etanol durante 3 minutos (Vibra-Cell[™], Sonics & Materials INC., Suiza) y se secaron durante 30 minutos a 37°C. A continuación, los implantes endoluminales se sumergieron una vez en 5 mg/ml de pCK-HGF-X7 durante 5 minutos y se secaron durante 30 minutos a 37°C.

b. Producción de implante endoluminal de SS, liberador de pCK-HGF-X7 con una base de polímero

Para elaborar implantes endoluminales SS con una base de polímero, los implantes endoluminales se sumergieron una vez en 5 mg/ml de polímero de fosforilcolina (PC) (CM5208, Vertellus Specilities INC., Reino Unido) en etanol. A continuación, los implantes endoluminales SS con una base de polímero PC se sumergieron una vez en 5 mg/ml de pCK-HGF-X7 durante 5 minutos y se secaron durante 20 minutos a 37°C.

(3) Cuantificación de pCK-HGF-X7 liberado del implante endoluminal de SS

Con el fin de analizar la cantidad de pCK-HGF-X7 que había sido cargado en los implantes endoluminales SS, se seleccionó el volumen grande de disolución retirado y reemplazado (0,8 ml de 1 ml) para cuantificar la liberación de pCK-HGF-X7 de una manera rápida y eficaz. Los implantes endoluminales SS recubiertos con pCK-HGF-X7 se sumergieron individualmente en criotubos que contenían 1 ml de disolución salina normal. Los tubos que contenían los implantes endoluminales se colocaron sobre una mezcladora de rodillos (HIP-RMF40, Hyunil LAB-MATE, Corea) durante 60 minutos en condiciones de 40 rotaciones por minuto. Los productos eluidos de pCK-HGF-X7 se recogieron en el plazo de 1, 5, 10, 20 y 40 minutos. En cada momento puntual, se retiraron 0,8 ml de la disolución para el análisis UV y se añadieron de nuevo 0,8 ml de disolución salina normal de nueva aportación al criotubo para mantener el volumen total de la disolución. A continuación, el criotubo se colocó en la mezcladora de rodillos para continuar el experimento. La concentración de los productos eluidos de pCK-HGF-X7 retirados obtenidos a partir de cada momento puntual se midió a 260 nm utilizando Ultraspec 3000 (Amersham Pharmacia Biotech., Suecia). Como

control negativo, también se sometió a ensayo el implante endoluminal de SS sin pCK-HGF-X7 utilizando el método de cuantificación anterior.

2. Resultados

5 Los resultados se proporcionan en las Tablas 1 y 2. Casi 78 µg de pCK-HGF-X7 se liberaron del implante endoluminal de SS no basado en polímero a un (1) minuto y se liberaron 115 µg del mismo a los 40 minutos. Asimismo, se liberaron casi 43 µg de pCK-HGF-X7 del implante endoluminal de SS con una base de polímero a los 60 minutos. Estos resultados indican que el plásmido puede aplicarse como recubrimiento sobre implantes endoluminales SS tanto no basados en polímero como con una base de polímero, y que el plásmido aplicado como recubrimiento se puede liberar del implante endoluminal de SS. Por lo tanto, se concluyó que el implante endoluminal de SS liberador de plásmido se había producido satisfactoriamente.

Tabla 1: Cuantificación de pCK-HGF-X7 liberado del implante endoluminal de SS no basado en polímero

Tiempo de Extracción (Min)	pCK-HGF-X7 cumulativo extraído			
	Control Negativo		Implante endoluminal de SS no basado en polímero	
	µg de pCK-HGF-X7	Recuperación Relativa (%)	µg de pCK-HGF-X7	Recuperación Relativa (%)
1	0,53 ± 0,14	0	77,98 ± 29,29	67,88
5	0,87 ± 0,03	0	108,97 ± 13,20	94,86
10	1,41 ± 0,18	0	112,48 ± 14,23	97,92
20	1,55 ± 0,11	0	114,15 ± 13,76	99,38
40	1,83 ± 0,24	0	114,87 ± 13,84	100,00

Tabla 2: Cuantificación de pCK-HGF-X7 liberado implante endoluminal de SS con una base de polímero

Tiempo de Extracción (Min)	pCK-HGF-X7 cumulativo extraído			
	Control Negativo		Implante endoluminal de SS con una base de polímero	
	µg de pCK-HGF-X7	Recuperación Relativa (%)	µg de pCK-HGF-X7	Recuperación Relativa (%)
10	1,85 ± 0,07	0	39,74 ± 9,27	84,45
20	1,37 ± 0,03	0	41,64 ± 9,14	88,49
30	1,35 ± 0,00	0	43,35 ± 9,12	92,12
40	1,41 ± 0,07	0	44,55 ± 9,03	94,69
50	1,00 ± 0,08	0	45,82 ± 8,89	97,37
60	0,96 ± 0,05	0	47,05 ± 9,02	100,00

15 B. Producción de implante endoluminal de cobalto-cromo liberador de plásmido

1. Materiales y Métodos

(1) Implante endoluminal de Cobalto-Cromo

Los implantes endoluminales de Cobalto-Cromo (implante endoluminal Co-Cr, ARTHOSPico, 2,75 mm x 12 mm) fueron adquiridos de AMG International (Alemania).

20

(2) Producción de implante endoluminal de Co-Cr liberador de pCK-HGF-X7

a. Producción de implante endoluminal de Co-Cr liberador de pCK-HGF-X7 no basado en polímero,

5 Para lavar la superficie de los puntales del implante endoluminal de SS, los implantes endoluminales se sometieron a sonicación tres veces en etanol durante 3 minutos y se secaron durante 30 minutos a 37°C. A continuación, los implantes endoluminales se sumergieron una vez en 5 mg/ml de pCK-HGF-X7 durante 5 minutos y se secaron durante 30 minutos a 37°C.

b. Producción de implante endoluminal de Co-Cr liberador de pCK-HGF-X7 con una base de polímero.

10 Para elaborar los implantes endoluminales de Co-Cr con una base de polímero los implantes endoluminales se sumergieron una vez en 5 mg/ml de polímero de fosforilcolina (PC) (CM5208, Vertellus Specilities INC., Reino Unido) en etanol. A continuación, los implantes endoluminales de Co-Cr con una base de polímeros de PC se sumergieron tres veces en 5 mg/ml de pCK-HGF-X7 durante 5 minutos y se secaron durante 10 minutos a 37°C.

(3) Cuantificación de pCK-HGF-X7 liberado del implante endoluminal de Co-Cr

15 Con el fin de analizar la cantidad de pCK-HGF-X7 que se había cargado en los implantes endoluminales de Co-Cr, se seleccionó el volumen grande de disolución retirado y repuesto (0,8 ml de 1 ml) para cuantificar la elución de pCK-HGF-X7 de una manera rápida y eficaz.

20 Los implantes endoluminales de Co-Cr recubiertos con pCK-HGF-X7 se añadieron individualmente a criotubos que contenían 1 ml de solución salina normal. Los tubos se colocaron sobre una mezcladora de rodillos (HIP-RMF40, Hyunil LAB-MATE, Corea) durante 60 minutos en condiciones de 40 rotaciones por minuto. Los productos liberados de pCK-HGF-X7 se recogieron a los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos. En cada momento puntual, se retiraron 0,8 ml de la disolución para el análisis UV y se añadieron de nuevo 0,8 ml de solución salina normal de nueva aportación al criotubo para mantener el volumen total de la disolución. A continuación, el criotubo se colocó en la mezcladora de rodillos para continuar el experimento. La concentración de los productos liberados de pCK-HGF-X7 retirados obtenidos de cada momento puntual se midieron a 260 nm utilizando Ultraspec 3000. Como control negativo, también se sometió a ensayo el implante endoluminal de Co-Cr sin pCK-HGF-X7 utilizando el método de cuantificación anterior.

2. Resultados y Discusión

30 Los resultados se muestran en las Tablas 3 y 4. Casi 60 µg y 85 µg de pCK-HGF-X7 se liberaron en un (1) minuto y 20 minutos del implante endoluminal de Co-Cr no basado en polímero, respectivamente. Asimismo, se liberaron casi 43 µg de pCK-HGF-X7 del implante endoluminal de Co-Cr con una base de polímero a los 60 minutos. Estos resultados indican que el plásmido puede ser aplicado como recubrimiento sobre implantes endoluminales de Co-Cr tanto no basados en polímero como con una base de polímero, y que el plásmido aplicado como recubrimiento se puede liberar del implante endoluminal de Co-Cr aunque la cantidad de plásmido liberado del implante endoluminal de Co-Cr es menor que la del implante endoluminal de SS. Por lo tanto, se concluyó que el implante endoluminal de Co-Cr liberador de plásmido se había producido satisfactoriamente.

35 Tabla 3: Cuantificación de pCK-HGF-X7 liberado del implante endoluminal de Co-Cr no basado en polímero

Tiempo de Extracción (Min)	pCK-HGF-X7 cumulativo extraído			
	Control Negativo		Implante endoluminal de Co-Cr no basado en polímero	
	µg de pCK-HGF-X7	Recuperación Relativa (%)	µg de pCK-HGF-X7	Recuperación Relativa (%)
1	0,53 ± 0,14	0	60,20 ± 11,18	70,48
5	0,87 ± 0,03	0	80,52 ± 4,13	94,28
10	1,41 ± 0,18	0	83,52 ± 4,10	97,79
20	1,55 ± 0,11	0	84,77 ± 3,99	99,25
40	1,83 ± 0,24	0	85,41 ± 4,11	100,00

Tabla 4: Cuantificación de pCK-HGF-X7 liberado implante endoluminal de Co-Cr con una base de polímero

Tiempo de Extracción (Min)	pCK-HGF-X7 cumulativo extraído
	Implante endoluminal de Co-Cr con una base de polímero
	µg de pCK-HGF-X7
60	21,9 ± 0,00

Ejemplo 8: Evaluación de la eficacia del implante endoluminal liberador de HGF-X7 en un modelo de denudación con balón en conejo

- 5 El objetivo de este estudio fue evaluar la aceleración de la reendotelización por implante endoluminal liberador de HGF-X7 en un modelo de denudación con balón en conejo.

1. Materiales y Métodos

(1) Animales

- 10 Se proporcionaron comida y agua ad libitum a diez conejos blancos New Zealand (macho, 3,5 a 4,0 Kg, Doo-Yeol Biotech, Corea) a su llegada, y se establecieron 7 días de descanso antes de ser sometidos a la implantación del implante endoluminal.

(2) Modelo de denudación con balón en conejo e implantación del implante endoluminal

- 15 Los conejos se anestesiaron con una inyección intramuscular de xilazina (5 mg/kg) seguido de cetamina (50 mg/kg). Después de la esterilización con alcohol del 95% y yodo, el cuello se cubrió con un paño quirúrgico estéril y solo se expuso la zona de incisión, proporcionando de ese modo una condiciones completamente estériles para la cirugía. Tras la exposición quirúrgica de la arteria carótida externa, se hizo avanzar en la arteria carótida externa una vaina de introductor 5F (Cordis, EE.UU.). Se hizo avanzar un microcatéter 2.8F hacia la porción proximal de la arteria iliaca externa después de la inserción de un cable de guía 1.4F (Terumo, Japón) en la arteria femoral utilizando métodos de fluoroscopia convencionales. Se administraron 1000 U de heparina y 0,1 mg de nitroglicerina.

- 20 La denudación con balón de la arteria iliaca externa se realizó como sigue: Se insertó un catéter de balón de 2,5 x 8 mm (GoodMan, Japón) en la arteria iliaca externa a través del cable guía seguido de la eliminación del microcatéter del conejo. Después de la inflación del catéter de balón (10 atm), se denudó el endotelio de la arteria iliaca externa a una distancia de aproximadamente 1,0 cm mediante extracción sucesiva 10 veces. El catéter de balón para la denudación iliaca se retiró del conejo y un nuevo catéter de balón montado con un implante endoluminal de SS liberador de pCK-HGF-X7-SS (PES) o un implante endoluminal de metal desnudo (BMS) se hizo avanzar en la arteria iliaca externa que se había denudado. La implantación del implante endoluminal se realizó durante 15 segundos a 12 atm de inflación del balón. El PES (n = 10) y el BMS (n = 10) se implantaron bilateralmente.

(3) Análisis de tomografía de coherencia óptica (TCO)

- 30 Para el análisis de tomografía de coherencia óptica (TCO), se hizo avanzar el catéter de balón de oclusión Helios (LightLab, EE.UU.) en la porción proximal de la arteria iliaca externa a través del cable de guía, que a continuación se retiró del conejo. Después se colocó el cable de imagen de TCO (LightLab, EE.UU.) a una distancia de 1,5 cm del borde distal del implante endoluminal implantado. Las imágenes de la TCO se adquirieron utilizando 10 ml de lavado con disolución salina normal. Después de la eliminación de todos los dispositivos de conejo, la arteria carótida externa se ligó con sutura de seda 3-0. A continuación, la incisión se comprobó para determinar la presencia de hemorragia. Después de controlar el sangrado, se suturaron el músculo en el que se había realizado la incisión, la fascia y la piel. Se administró por vía intramuscular gentamicina (3 mg/kg/día) durante tres días para prevenir la infección. Asimismo, se administraron cada día 32,5 mg de clopidogrel (Sanofi-Aventis, Francia) y 25 mg de aspirina (Bayer, Alemania).

(4) Microscopia de barrido electrónico (MBE)

- 40 Los Días 14 y 28 después de la implantación del implante endoluminal, los animales se sacrificaron y los vasos se recogieron y se fijaron con una disolución de glutaraldehído al 2,5% durante 2 horas. Los vasos fijados se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y la post-fijación se realizó con una disolución de OsO₄ al 1%. Los vasos postfijados se lavaron tres veces con PBS y los procedimientos de deshidratación se realizaron sucesivamente con alcohol etílico del 60 al 95%. Finalmente, se realizó el recubrimiento con oro sobre los vasos deshidratados.

45

(5) Estadísticas

Los resultados se presentaron como la media \pm ETM y se analizaron utilizando SPSS (versión 10.0, SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando la prueba t de Student. Un valor de P inferior a 0,05 se consideró significativo.

5 2. Resultados y Discusión

Para evaluar si el implante endoluminal liberador de pCK-HGF-X7 podría acelerar el proceso de reendotelización, se examinaron los cambios de dimensión de la íntima y la naturaleza de las células que cubrían el implante endoluminal mediante TCO y MBE, respectivamente. Las imágenes de la TCO se obtuvieron los Días 0, 14, y 28 después de la implantación del implante endoluminal.

10 Se obtuvieron nueve imágenes en sección transversal de cada implante endoluminal. Los datos de referencia y de seguimiento de la TCO se muestran en la Figura 14. Los resultados después de la intervención fueron similares en ambos grupos (Figura 14A; Día 0). Sin embargo, el área de la sección transversal de la dimensión de la íntima (ID-CSA, mm^2) del grupo PES el día 14 después de la implantación del implante endoluminal se amplió significativamente en comparación con la del grupo BMS (Figura 14B; PES vs BMS, $0,23 \pm 0,05 \text{ mm}^2$ vs $0,48 \pm 0,09$
15 mm^2 , $p = 0,03$). El Día 28 después de la implantación del implante endoluminal, las ID-CSA entre los dos grupos fueron similares (Figura 14B; PES vs BMS, $0,91 \pm 0,08 \text{ mm}^2$ vs $0,98 \pm 0,09 \text{ mm}^2$, $p = 0,76$).

Estos resultados muestran que el implante endoluminal liberador de pCK-HGF-X7 potenció el crecimiento de las células sobre la superficie del implante endoluminal en comparación con un implante endoluminal de metal desnudo.

20 A continuación, se determinó el tipo de células que proliferaron sobre el implante endoluminal mediante análisis de MBE. El MBE se realizó los Días 14 y 28. La Figura 15 muestra que las células endoteliales (véase la flecha de color negro) cubrían uniformemente la superficie del implante endoluminal en el grupo de PES mientras se observó una neointima mixta compuesta de células musculares lisas (véase la flecha de color blanco) y células endoteliales en el grupo de BMS.

25 Estos resultados demuestran que el implante endoluminal liberador de pCK-HGF-X7 puede acelerar la reendotelización y por lo tanto ser una herramienta útil para el tratamiento de un vaso sanguíneo oscurecido.

Los resultados anteriores demuestran que la presencia de las 2 isoformas de HGF (HGF y dHGF) puede inducir más eficazmente el crecimiento y la migración de las células endoteliales *in vitro* que la de HGF o dHGF solas y que la transferencia de secuencias de nucleótidos que expresan las 2 isoformas de HGF (HGF y dHGF) *in vivo* puede acelerar el proceso reendotelización de un vaso sanguíneo. Estos resultados indican que las 2 isoformas de HGF
30 pueden atenuar la reestenosis más eficazmente a través de una rápida actividad de reendotelización que una sola isoforma de HGF.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110>	Viromed Co., Ltd.	
5	<120>	Tratamiento y prevención de afecciones cardiacas usando dos o más isoformas del factor de crecimiento de hepatocitos	
	<130>	463.106370	
	<140>	PCT/KR2009/000406	
10	<141>	28-01-2009	
	<150>	US 61/023,756	<151> 25-01-2008
	<160>	12	
15	<170>	PatentIn 3.3	
	<210>	1	
	<211>	2187	
	<212>	ADN	
20	<213>	Factor de crecimiento de hepatocitos	
	<400>	1	
	atgtgggtga	ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcatctcttc	60
	ctgctcccca	tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat	120
	gaattcaaaa	aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa	180
	accaaaaaag	tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaggactt	240
	ccattcactt	gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc	300
	ttcaatagca	tgcaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa	360
	aacaagact	acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctaca gggaacagta	420
	tctatcacta	agagtggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac	480
	agctttttgc	cttcgagcta tcggggtaa gacctacagg aaaactactg tcgaaatcct	540
	cgaggggaag	aagggggacc ctggtgtttc acaagcaatc cagaggtacg ctacgaagtc	600
	tgtgacattc	ctcagtgttc agaagttaa tgcattgacct gcaatgggga gagttatcga	660
	ggtctcatgg	atcatacaga atcaggcaag atttgtcagc gctgggatca tcagacacca	720
	caccggcaca	aattcttgcc tgaaagatat cccgacaagg gctttgatga taattattgc	780
	cgcaatcccg	atggccagcc gaggccatgg tgctatactc ttgacctca caccgctgg	840
	gagtactgtg	caattaaaac atgcgctgac aatactatga atgacctga tgttcctttg	900
	gaaacaactg	aatgcatcca aggtcaagga gaaggctaca ggggactgt caataccatt	960
	tggaatggaa	ttccatgtca gcgttgggat tctcagtatc ctacagagca tgacatgact	1020
	cctgaaaatt	tcaagtgcaa ggacctacga gaaaattact gccgaaatcc agatgggtct	1080
	gaatcacctt	ggtgttttac cactgatcca aacatccgag ttggctactg ctcccaaatt	1140
	ccaaactgtg	atatgtcaca tggacaagat tgttatcgtg ggaatggcaa aaattatatg	1200
	ggcaacttat	cccaaacaag atctggacta acatgttcaa tgtgggacaa gaacatggaa	1260
	gacttacatc	gtcatatctt ctgggaacca gatgcaagta agctgaatga gaattactgc	1320

ES 2 537 971 T3

cgaaatccag atgatgatgc tcatggaccc tgggtgctaca cgggaaatcc actcattcct 1380
 tgggattatt gccctatttc tcgttgtaa ggtgatacca cacctacaat agtcaattta 1440
 gaccatcccg taatatcttg tgccaaaacg aaacaattgc gagttgtaa tgggattcca 1500
 acacgaacaa acataggatg gatggtagt ttgagataca gaaataaaca tatctgcgga 1560
 ggatcattga taaaggagag ttgggttctt actgcacgac agtgtttccc ttctcgagac 1620
 ttgaaagatt atgaagcttg gcttgaatt catgatgtcc acggaagagg agatgagaaa 1680
 tgcaaacagg ttctcaatgt ttcccagctg gtatatggcc ctgaaggatc agatctggtt 1740
 ttaatgaagc ttgccaggcc tgctgtcctg gatgattttg ttagtacgat tgatttacct 1800
 aattatggat gcacaattcc tgaaaagacc agttgcagtg tttatggctg gggctacact 1860
 ggattgatca actatgatgg cctattacga gtggcacatc tctatataat gggaaatgag 1920
 aatgcagcc agcatcatcg agggaaggtg actctgaatg agtctgaaat atgtgctggg 1980
 gctgaaaaga ttggatcagg accatgtgag ggggattatg gtggcccact tgtttgtgag 2040
 caacataaaa tgagaatggt tcttggtgtc attgttctctg gtcgtggatg tgccattcca 2100
 aatcgtcctg gtatttttgt ccgagtagca tattatgcaa aatggatata caaaattatt 2160
 ttaacatata aggtaccaca gtcatag 2187

<210> 2
 <211> 728
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu
 1 5 10 15

Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln
 20 25 30

Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr
 35 40 45

Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val
 50 55 60

Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
 65 70 75 80

Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys
 85 90 95

Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe
 100 105 110

Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys

ES 2 537 971 T3

115 120 125
 Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys
 130 135 140
 Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
 145 150 155 160
 Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr
 165 170 175
 Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser
 180 185 190
 Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu
 195 200 205
 Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp
 210 215 220
 His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro
 225 230 235 240
 His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp
 245 250 255
 Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr
 260 265 270
 Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys
 275 280 285
 Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu
 290 295 300
 Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile
 305 310 315
 Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu
 325 330 335
 His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn
 340 345 350
 Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr
 355 360 365
 Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp
 370 375 380
 Met Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met

ES 2 537 971 T3

385 390 395 400

Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp
 405 410 415

Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala
 420 425 430

Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His
 435 440 445

Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys
 450 455 460

Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu
 465 470 475 480

Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val
 485 490 495

Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg
 500 505 510

Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp
 515 520 525

Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr
 530 535 540

Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys
 545 550 555 560

Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly
 565 570 575

Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp
 580 585 590

Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu
 595 600 605

Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn
 610 615 620

Tyr Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu
 625 630 635 640

Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu
 645 650 655

Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp

ES 2 537 971 T3

660 665 670
 Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu
 675 680 685
 Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly
 690 695 700
 Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile
 705 710 715 720
 Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser
 725
 <210> 3
 <211> 723
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu
 1 5 10 15
 Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln
 20 25 30
 Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr
 35 40 45
 Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val
 50 55 60
 Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
 65 70 75
 Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys
 85 90 95
 Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe
 100 105 110
 Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys
 115 120 125
 Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys
 130 135 140
 Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
 145 150 155 160
 Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Arg
 165 170 175

ES 2 537 971 T3

Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg
 180 185 190
 Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr
 195 200 205
 Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly
 210 215 220
 Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe
 225 230 235 240
 Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys Arg
 245 250 255
 Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His
 260 265 270
 Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met
 275 280 285
 Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln
 290 295 300
 Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro
 305 310 315 320
 Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr Pro
 325 330 335
 Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro
 340 345 350
 Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg
 355 360 365
 Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln
 370 375 380
 Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln
 385 390 395 400
 Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu Asp
 405 410 415
 Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu
 420 425 430
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr
 435 440 445

ES 2 537 971 T3

Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys
 450 455 460

Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu Asp His Pro Val Ile
 465 470 475 480

Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro Thr
 485 490 495

Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His
 500 505 510

Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg
 515 520 525

Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly
 530 535 540

Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu
 545 550 555 560

Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu
 565 570 575

Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile
 580 585 590

Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser
 595 600 605

Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu
 610 615 620

Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His
 625 630 635 640

His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly Ala
 645 650 655

Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu
 660 665 670

Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val Ile Val Pro
 675 680 685

Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val
 690 695 700

Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile Leu Thr Tyr Lys Val
 705 710 715 720

Pro Gln Ser

<210> 4
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu
 1 5 10 15

Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln
 20 25 30

Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr
 35 40 45

Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val
 50 55 60

Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
 65 70 75 80

Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys
 85 90 95

Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe
 100 105 110

Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys
 115 120 125

Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys
 130 135 140

Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
 145 150 155 160

Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr
 165 170 175

Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser
 180 185 190

Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser
 195 200 205

<210> 5
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 537 971 T3

<400> 5

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu
1 5 10 15

Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln
20 25 30

Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr
35 40 45

Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val
50 55 60

Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
65 70 75 80

Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys
85 90 95

Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe
100 105 110

Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys
115 120 125

Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys
130 135 140

Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
145 150 155 160

Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr
165 170 175

Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser
180 185 190

Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu
195 200 205

Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp
210 215 220

His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro
225 230 235 240

His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp
245 250 255

Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr

ES 2 537 971 T3

260 265 270

Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys
 275 280 285

Glu Thr
 290

<210> 6
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu
 1 5 10 15

Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln
 20 25 30

Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr
 35 40 45

Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val
 50 55 60

Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
 65 70 75 80

Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys
 85 90 95

Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe
 100 105 110

Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys
 115 120 125

Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys
 130 135 140

Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
 145 150 155 160

Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr
 165 170 175

Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser
 180 185 190

Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu
 195 200 205

ES 2 537 971 T3

Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp
 210 215 220

His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro
 225 230 235 240

His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp
 245 250 255

Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr
 260 265 270

Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys
 275 280 285

Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu
 290 295 300

Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile
 305 310 315 320

Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu
 325 330 335

His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn
 340 345 350

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr
 355 360 365

Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp
 370 375 380

Met Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met
 385 390 395 400

Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp
 405 410 415

Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala
 420 425 430

Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His
 435 440 445

Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys
 450 455 460

Pro Ile Ser Arg Cys Glu
 465 470

- <210> 7
- <211> 7113
- <212> ADN
- <213> Factor hibrido de crecimiento de hepatocitos

5

ES 2 537 971 T3

<400> 7
atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcctctcctc 60
ctgctcccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120
gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaatag atccagcact gaagataaaa 180
acaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt 240
ccattcactt gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc 300
ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa 360
aacaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctacaa gggacagta 420
tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac 480
aggtaagaac agtatgaaga aaagagatga agcctctgtc ttttttacct gttacagtc 540
tcatattagt ccttcagaat aattctacaa tcctaaaata acttagccaa cttgctgaat 600
tgtattacgg caaggtttat atgaattcat gactgatatt tagcaaatga ttaattaata 660
tgtaataaaa atgtagccaa aacaatatct taccttaatg cctcaatttg tagatctcgg 720
tattttgtgaa ataataacgt aaacttcggt taaaaggatt cttcttctctg tctttgagaa 780
agtacggcac tgtgcagggg gagaggttga ttgtgaaaaa tcagaggtag atgagaatct 840
tactgagggc tgagggttct ttaaccttgg tggatctcaa cattgggttc acattaaat 900
cacctgctgc aagcccttga cgaactttac ttagaagatg acaacacaga acaattaat 960
cagaatctct ggggagaata gggcaccagt attttttgag ctcccaccat gattccaaag 1020
tgcagccaaa tttgagaacc actgctaaaa gctcaagctt cagattgacc agcttttcca 1080
tctcacctat cgcctaaaga ccaaatggga taaatgtgtt cattacgaca gatgggtact 1140
atltaaagat gagtaaacac aatatactta ggctcgtcag actgagagtt ttaatcatca 1200
ctgaggaaaa acatagatat ctaatactga ctggagtatt agtcaaggct tatttcacac 1260
acaattttat cagaaaccaa agtagtttaa aacagctctc cccttattag taatgcattg 1320
gagggtttac tttaccatgt accttgcgtg gcaactgtacc ttgttaatct catttacttg 1380
taatgagaac cacacagcgg gtagttttat tggttctatt ttacctacat gacaaaactg 1440
aagcataaaa acacttagta agttttcagt gtcatgcaca actaggaagt gacatggcca 1500
gaatataagc ccagtcacca tcactctata acctgcgctt ttaacaactt cagggcatga 1560
cacatttggc cggtcagtag aacctatgct gtgatttgggt tttgcagtggt tggatgatgac 1620
tgccttgttg aatccacttt ttattctatt ccattttggg gacacaattc tgcaagatga 1680
ttcttcatta ggaaacagag atgagttatt gaccaacaca gaaagaaaaa gagtttgttg 1740
ctccacactg ggattaaacc tatgatcttg gcctaattaa cactagctag taagtgtcca 1800
agctgatcat ctctacaaca tttcaataac agaaaacaac aattttcaaa attagttact 1860

tacaattatg tagaaatgcc tctaaaacac agtattttcc ttātattaca aaaacaaaa	1920
ttataattgg ttttgcctc ttttgagagt ttgcatggg ttactccctg catagtgaag	1980
aaaacatttt atttaagtag atggatctaa gtttttcacg aacaaaggaa tgacatttga	2040
aatcaatcct accctagtcc aggagaatgc attagattaa cctagtagag gtcttatttc	2100
accctgagtt ttctatgatc gtgattctct gctggaggag taattgtgaa atagatctct	2160
ctgggaactg gcttcctagt ccaatcagct cttttacca tgaacacttc cttgtgatat	2220
agatgtttat ggccgagagg atccagtata ttaataaaaat cctttttgt attcaatgag	2280
ggaaacacat aattttcatc aatttagcagc ttattggaat atctgcatga tggtttaaca	2340
cttttaagtg ttgactaaag attaatTTta cagaaaatag aaaaagaaat atgtttctgt	2400
ctggaggaat gatttattgt tgaccctaa attgaaatat tttactagtg gcttaatgga	2460
aagatgatga aagatgatga aattaatgta gaagcttaac tagaaaatca ggtgacctga	2520
tatctacatc tgtatccttc attggccacc cagcattcat taatgaatca gatgatggaa	2580
tagatcaagt ttcttaggaa cacagtgaat attaaaagaa aacaaagggg gcctagcacc	2640
tagaagacct agtttatatt tcaaagtata tttggatgta acccaatttt aaacatttcc	2700
tcacttgtct ctcttaaagc cttgccaca gcaaggacag agaaccaaaa atagtgtata	2760
tatgaataaa tgcttattac agaatctgct gactggcaca tgctttgtgt gtaatgggtt	2820
ctcataaaca ctgttgaat gaacacacat aagtgaagaa gcatggctag gcttcatccc	2880
ttggtcaaat atggggtgct aaagaaaagc aggggaaata cattgggaca ctaacaaaaa	2940
aaaacagtta atttaggtaa aagataaaat acaccacaga atgaagaaaa gagatgacct	3000
agactgctct ttaaccttca tgccttagag aggtttttga tatgaattgc attcagaatt	3060
gtggaaagga gcccatcttt tctcttcatt ttgattttat taactccaat gggggaattt	3120
tattcgtgtt ttggccatat ctacttttga tttctacatt attctctctt ctttctacc	3180
tgtatttgc ctaataaatt gttgacttat taattcacta cttcctcaca gctttttttt	3240
ggcttiacaa atccactgga aaggatatg ggtgtatcac tttgtgtatt tcggtgtgca	3300
tgtgtagagg ggacaaaaat cctctctcaa actataaata ttgagtattt gtgtattgaa	3360
catttgcctat aactactagg tttcttaa atctttaata tataaatga tatagaaaaa	3420
gggaaattat agttcgtatt attcatctaa gtgaagagat taaaaccag ggagtaaata	3480
aattgtctaa ggactaaggt tgtatactat ttaggtgata gatatggggc aaccgatgg	3540
gttttatgat taacaaataa acttctcacc actctaccat atcaactttt ccataaaaga	3600
gagctatagt attctttgct taataaaatt tgattagtgc atgacttctt gaaaacatat	3660
aaagcaaaag tcacatttga ttctatcaga aaagtgaagta agccatggcc caaacaaaag	3720
atgcattaaa atattctgga atgatggagc taaaagtaag aaaaatgact ttttaaaaaa	3780
gttactggtt aggaattgtg aaattatgct gaatttttagt tgcattataa tttttgtcag	3840
tcatacggtc tgacaacctg tcttatttct atttcccat atgaggaatg ctagttaagt	3900

atggatatta actattacta cttagatgca ttgaagttgc ataatatgga taatacttca 3960
ctggttcctt gaaaatgttt agttagtaat aagtctctta cactatattgt tttgtccaat 4020
aatttatatt ttctgaagac ttaactctag aatacactca tgtcaaaatg aaagaatttc 4080
attgcaaaat attgcttggt acatgacgca tacctgtatt tgttttgtgt cacacatga 4140
aaaatgatgg tttattagaa gtttcattgg gtaggaaaca catttgaatg gtatttacta 4200
agatactaaa atccttggac ttcactctaa ttttagtgcc atttagaact caaggctca 4260
gtaaaagtag aaataaagcc tgtaacaaa acacaagctg aatattaaaa atgtaactgg 4320
atcttcaaaag aaatgtttac tgggtattacc tgtagatgta tattctttat tatgatcttt 4380
tgtgtaaagt ctggcagaca aatgcaatat ctaattgttg agtccaatat cacaagcagt 4440
acaaaagtat aaaaaagact tggcctttc taatgtgta aaatacttta tgctggaat 4500
aacactaaga gtagggcact agaaatttta agtgaagata atgtgttga gttactgcac 4560
tcaatggctt actattataa accaaaactg ggatcactaa gctccagtca gtcaaaatga 4620
tcaaaattat tgaagagaat aagcaattct gttctttatt aggacacagt agatacagac 4680
tacaagtgg agtgtgctta ataagaggta gcatttgta agtgtcaatt actctattat 4740
cccttggagc ttctcaaaat aaccatataa ggtgtaagat gttaaagggt atggttacac 4800
tcagtgcaca ggtaagctaa taggctgaga gaagctaaat tacttactgg ggtctcacag 4860
taagaaagtg agctgaagtt tcagcccaga ttttaactgga ttctgggctc tttattcatg 4920
ttacttcatg aatctgtttc tcaattgtgc agaaaaaagg gggctattta taagaaaagc 4980
aataacaaa caagtaatga tctcaataa gtaatgcaag aatagtgag atttcaaaat 5040
cagtggcagc gatttctcag ttctgtccta agtggccttg ctcaatcacc tgctatcttt 5100
tagtggagct ttgaaattat gtttcagaca acttcgattc agttctagaa tgtttgactc 5160
agcaaattca caggctcatc tttctaactt gatggtgaat atggaaattc agctaaatgg 5220
atgttaataa aattcaaagc ttttaaggac agatgaaaat gacagaattt taaggtaaaa 5280
tatatgaagg aatataagat aaaggatttt tctaccttca gcaaaaacat acccactaat 5340
tagtaaaatt aataggcaaa aaaaagttgc atgctcttat actgtaatga ttatcatttt 5400
aaaactagct ttttgcttc gagctatcgg ggtaaagacc tacaggaaaa ctactgtcga 5460
aatcctcgag ggaagaagg gggaccctgg tgtttcacia gcaatccaga ggtacgctac 5520
gaagtctgtg acattctca gtgttcagaa gttgaatgca tgacctgca tggggagagt 5580
tatcgaggtc tcatggatca tacagaatca ggcaagattt gtcagcgtg ggatcatcag 5640
acaccacacc ggcacaaatt cttgcctgaa agatatcccg acaagggtt tgatgataat 5700
tattgccgca atcccgatgg ccagccgagg ccatggtgct atactcttga cctcacacc 5760
cgctgggagt actgtgcaat taaaacatgc gctgacaata ctatgaatga cactgatgtt 5820
cctttggaaa caactgaatg catccaaggt caaggagaag gctacagggg cactgtcaat 5880
accatttggg atggaattcc atgtcagcgt tgggattctc agtatcctca cgagcatgac 5940

ES 2 537 971 T3

atgactcctg aaaatttcaa gtgcaaggac ctacgagaaa atfactgccg aaatccagat 6000
 gggctctgaat caccctgggtg ttttaccact gatccaaaca tccgagttgg ctactgctcc 6060
 caaattccaa actgtgatat gtcacatgga caagattggt atcgtgggaa tggcaaaaat 6120
 tatatgggca acttatccca aacaagatct ggactaacat gttcaatgtg ggacaagaac 6180
 atggaagact tacatcgtca tatcttctgg gaaccagatg caagtaagct gaatgagaat 6240
 tactgccgaa atccagatga tgatgctcat ggaccctgggt gctacacggg aaatccactc 6300
 attccttggg attattgccc tatttctcgt tgtgaagggtg ataccacacc tacaatagtc 6360
 aatttagacc atcccgtaat atcttgtgcc aaaacgaaac aattgcgagt tgtaaattggg 6420
 attccaacac gaacaaacat aggatggatg gttagtttga gatacagaaa taaacatatac 6480
 tgcggaggat cattgataaa ggagagttgg gttcttactg cacgacagtg tttcccttct 6540
 cgagacttga aagattatga agcttggcctt ggaattcatg atgtccacgg aagaggagat 6600
 gagaaatgca aacaggttct caatgtttcc cagctgggat atggccctga aggatcagat 6660
 ctggttttaa tgaagcttgc caggcctgct gtcctggatg attttgtag tacgattgat 6720
 ttacctaat atggatgcac aattcctgaa aagaccagtt gcagtgttta tggctggggc 6780
 tacactggat tgatcaacta tgatggccta ttacgagtgg cacatctcta tataatggga 6840
 aatgagaaat gcagccagca tcatcgaggg aaggtgactc tgaatgagtc tgaatatgt 6900
 gctggggctg aaaagattgg atcaggacca tgtgaggggg attatggtgg cccacttgtt 6960
 tgtgagcaac ataaaatgag aatggttcct ggtgtcattg ttcttggctg tggatgtgcc 7020
 attccaaatc gtcttgggat ttttgtccga gtagcatatt atgcaaaatg gatacacaaa 7080
 attattttaa catataaggt accacagtca tag 7113

<210> 8
 <211> 4679
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Gen HGF-X6

<400> 8
 atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctect gcatctctc 60
 ctgctcccca tcgcatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120
 gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa 180
 accaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt 240
 ccattcactt gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc 300
 ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa 360
 aacaagact acattagaaa ctgcatcctc ggtaaaggac gcagctacaa gggaacagta 420
 tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac 480

10

ES 2 537 971 T3

aggtaagaac agtatgaaga aaagagatga agcctctgtc tt̄ttttacat gttaacagtc 540
 tcatattagt ccttcagaat aattctacaa tcctaaaata acttagccaa cttgctgaat 600
 tgtattacgg caaggtttat atgaattcat gactgatatt tagcaaatga ttaattaata 660
 t̄gtaataaa atgtagccaa aacaatatct taccttaatg cctcaatttg tagatctcgg 720
 t̄attt̄gt̄gga t̄ccct̄t̄cct̄t̄ t̄ct̄ac̄ct̄ḡta t̄tt̄gt̄c̄c̄tāa t̄aāatt̄gt̄t̄g act̄t̄attāat 780
 t̄cact̄act̄t̄c t̄c̄cac̄aḡc̄t̄t̄ t̄tt̄tt̄t̄gḡc̄t̄ t̄t̄ac̄aāat̄cc act̄gt̄ḡaāagg tat̄at̄gḡgt̄g 840
 tat̄cact̄tt̄g t̄gt̄att̄t̄c̄gg t̄gt̄ḡcat̄gt̄g taḡaḡgḡḡac aaaaat̄c̄ct̄c t̄ct̄caāact̄a 900
 t̄aāat̄att̄ḡa ḡt̄att̄t̄gt̄t̄ att̄ḡaac̄att t̄ḡct̄atāact act̄aḡgt̄tt̄c t̄t̄aāatāat̄c 960
 t̄t̄aat̄at̄ata aat̄gat̄ata ḡaaaāagḡga aatt̄at̄aḡtt c̄gt̄att̄att̄c at̄ct̄aaḡt̄ga 1020
 aḡaḡatt̄aaa acc̄caḡgḡḡag t̄aāatāaatt ḡt̄ct̄aaḡḡac t̄aaḡgt̄t̄ḡta tact̄att̄t̄tag 1080
 ḡt̄gat̄aḡata t̄gḡgḡcaacc ḡt̄at̄gḡgt̄tt tat̄gat̄taac aāatāaact̄t c̄t̄cacc̄act̄c 1140
 tacc̄at̄at̄ca act̄tt̄t̄ccat̄ aaāaḡaḡaḡc tat̄aḡtatt̄c t̄tt̄ḡct̄taa t̄aāatt̄t̄gat 1200
 taḡt̄ḡcat̄ga c̄tt̄c̄tt̄ḡaaa ac̄at̄atāaag caaāaḡt̄cac att̄t̄gatt̄ct at̄caḡaaāag 1260
 t̄ḡaḡt̄aaḡcc at̄gḡcc̄caaa caaāaḡat̄ḡc att̄aaāat̄at t̄ct̄gḡaat̄ga t̄gḡaḡct̄aaa 1320
 aḡt̄aaḡaaaa at̄ḡact̄tt̄tt̄ aaaāaaḡtt̄t̄ act̄gt̄t̄taḡga att̄gt̄ḡaaat̄ tat̄ḡct̄gaat̄ 1380
 t̄tt̄aḡtt̄ḡca t̄t̄atāat̄tt̄t̄ t̄gt̄caḡt̄cat ac̄gḡt̄ct̄ḡac aac̄ct̄gt̄ct̄t̄ att̄t̄ct̄att̄t̄ 1440
 c̄cc̄cat̄at̄ga ḡḡaat̄ḡct̄ag t̄t̄aaḡt̄at̄ḡg at̄attāact̄a t̄t̄act̄act̄ta gat̄gcatt̄ga 1500
 aḡtt̄gc̄ataa tat̄gḡataat̄ act̄t̄cact̄ḡg t̄t̄cc̄ct̄ḡaaa at̄gt̄tt̄aḡtt̄ aḡt̄aatāaḡt̄ 1560
 c̄t̄ct̄t̄ac̄act̄ att̄t̄gt̄tt̄tt̄g t̄ccāatāaatt̄ tat̄at̄tt̄tt̄ct̄ gāaḡact̄taa c̄t̄ct̄agāata 1620
 cact̄cat̄gt̄c aaaāt̄ḡaaaḡ aatt̄t̄catt̄g caaāat̄att̄g c̄tt̄gḡt̄acat̄ gac̄gc̄atacc 1680
 t̄gt̄att̄t̄gt̄t̄ t̄t̄gt̄gt̄caca ac̄at̄ḡaaaaa t̄gat̄gḡtt̄ta t̄taḡaaḡtt̄t̄ catt̄gḡgt̄ag 1740
 ḡaaac̄ac̄att̄ t̄ḡaat̄gḡtat̄ t̄t̄act̄aaḡat̄ act̄aaāat̄cc t̄t̄gḡact̄t̄ca c̄t̄ct̄aatt̄tt̄t̄ 1800
 aḡt̄gcc̄att̄t̄ aḡaact̄caaḡ ḡt̄ct̄caḡtaa aaḡtaḡaaat̄ aāaḡc̄ct̄gt̄t̄ aac̄aaāac̄ac 1860
 aaḡct̄ḡaata t̄t̄aaāaat̄gt̄ aact̄gḡatt̄t̄ t̄caāaḡaaat̄ ḡtt̄t̄act̄ḡgt̄ att̄ac̄ct̄ḡta 1920
 gat̄gt̄at̄att̄ c̄tt̄t̄att̄at̄ḡ at̄c̄tt̄tt̄gt̄g t̄aāaḡt̄ct̄gḡ caḡac̄aaāat̄ḡ caat̄at̄ct̄aa 1980
 t̄t̄gt̄t̄gaḡt̄c caat̄at̄caca aḡcaḡt̄acaa aaḡt̄ataaaa aaḡact̄t̄gḡc c̄t̄tt̄t̄ct̄aat̄ 2040
 ḡt̄gt̄t̄aaaat̄ act̄tt̄at̄ḡct̄ ḡḡt̄aatāaca c̄t̄aaḡaḡtaḡ ḡgc̄act̄aḡaa att̄tt̄taaḡt̄g 2100
 aaḡataat̄gt̄ ḡtt̄gcaḡt̄ta c̄t̄gcact̄caa t̄gḡct̄t̄act̄a t̄t̄atāaac̄ca aāact̄gḡgat̄ 2160
 cact̄aaḡct̄c caḡt̄caḡt̄ca aat̄gat̄caa aatt̄att̄ḡaa ḡagaatāaḡc aatt̄ct̄gt̄t̄c 2220
 t̄tt̄att̄taḡga cac̄aḡtaḡat̄ ac̄aḡact̄aca aaḡt̄gḡaḡt̄g t̄ḡct̄t̄aatāa gaḡgt̄aḡcat̄ 2280
 t̄t̄gt̄t̄aaḡt̄g t̄caatt̄act̄c t̄att̄at̄cc̄ct̄ t̄gḡaḡct̄t̄ct̄ caaāatāacc̄ at̄atāagḡt̄g 2340
 t̄aaḡat̄gt̄t̄a aaḡgt̄tat̄gḡ t̄t̄ac̄act̄caḡ t̄gc̄ac̄aḡgt̄a aḡct̄aat̄aḡḡ c̄t̄ḡaḡagaaḡ 2400
 c̄taāaatt̄act̄ tact̄gḡgḡt̄c t̄cac̄aḡt̄aaḡ aāaḡt̄gaḡct̄ gāaḡtt̄t̄caḡ c̄cc̄aḡatt̄ta 2460
 act̄gḡatt̄ct̄ ḡgḡct̄ct̄t̄ta t̄t̄cat̄gt̄t̄ac t̄t̄cat̄ḡaat̄c t̄gt̄tt̄ct̄caa t̄t̄gt̄gc̄aḡaa 2520

ES 2 537 971 T3

aaaagggggc tatttataag aaaagcaata aacaaacaag taatgatctc aaataagtaa 2580
 tgcaagaaat agtgagattt caaaatcagt ggcagcgatt tctcagttct gtcctaagtg 2640
 gccttgctca atcacctgct atcttttagt ggagctttga aattatgttt cagacaactt 2700
 cgattcagtt ctagaatggt tgactcagca aattcacagg ctcatctttc taacttgatg 2760
 gtgaatatgg aaattcagct aaatggatgt taataaaatt caaacgtttt aaggacagat 2820
 gaaaatgaca gaattttaag gtaaaatata tgaaggaata taagataaag gatttttcta 2880
 ccttcagcaa aaacataccc actaattagt aaaattaata ggcaaaaaaa agttgcatgc 2940
 tcttatactg taatgattat ctttttaaaa ctagcttttt gccttcgagc tatcggggta 3000
 aagacctaca ggaaaactac tgtcgaaatc ctcgagggga agaaggggga cectggtggt 3060
 tcacaagcaa tccagaggta cgctacgaag tctgtgacat tctcagtggt tcagaagttg 3120
 aatgcatgac ctgcaatggg gagagttatc gaggtctcat ggatcataca gaatcaggca 3180
 agatttgctca gcgctgggat catcagacac cacaccggca caaattcttg cctgaaagat 3240
 atcccgacaa gggctttgat gataattatt gccgcaatcc cgatggccag ccgaggccat 3300
 ggtgctatac tcttgaccct cacaccgct gggagtactg tgcaattaa acatgcgctg 3360
 acaatactat gaatgacact gatgttcctt tggaaacaac tgaatgcatc caaggtaaac 3420
 gagaaggcta caggggcact gtcaatacca tttggaatgg aattccatgt cagcgttggg 3480
 attctcagta tcttcacgag catgacatga ctctgaaaa tttcaagtgc aaggacctac 3540
 gagaaaatta ctgccgaaat ccagatgggt ctgaatcacc ctggtgtttt accactgatc 3600
 caaacatccg agttggctac tgctccaaa ttccaaactg tgatatgtca catggacaag 3660
 attgttatcg tgggaatggc aaaaattata tgggcaactt atcccaaaca agatctggac 3720
 taacatgttc aatgtgggac aagaacatgg aagacttaca tcgtcatatc ttctgggaac 3780
 cagatgcaag taagctgaat gagaattact gccgaaatcc agatgatgat gctcatggac 3840
 cctggtgcta cacgggaaat ccactcattc cttgggatta ttgccctatt tctcgttggtg 3900
 aagggtgatac cacacctaca atagtcaatt tagaccatcc cgtaatatct tgtgccaaaa 3960
 cgaaacaatt gcgagttgta aatgggattc caacacgaac aaacatagga tggatggtta 4020
 gtttgagata cagaaataaa catatctgcg gaggatcatt gataaaggag agttgggttc 4080
 tiactgcacg acagtgtttc ctttctcgag acttgaaaga ttatgaagct tggcttggaa 4140
 ttcattgatgt ccacggaaga ggagatgaga aatgcaaca ggttctcaat gtttcccagc 4200
 tggatatggt ccctgaagga tcagatctgg ttttaatgaa gcttgccagg cctgctgtcc 4260
 tggatgattt tgtagtacg attgatttac ctaattatgg atgcacaatt cctgaaaaga 4320
 ccagttgcag tgtttatggc tggggctaca ctggattgat caactatgat ggcctattac 4380
 gagtggcaca tctctatata atgggaaatg agaaatgcag ccagcatcat cgaggggaagg 4440
 tgactctgaa tgagtctgaa atatgtgctg gggctgaaaa gattggatca ggacctgtg 4500
 agggggatta tgggtggccca cttgtttgtg agcaacataa aatgagaatg gttcttgggtg 4560

tcattgttcc tggtcgtgga tgtgccattc caaatcgtcc tgg̃tattttt gtccgagtag 4620
 catattatgc aaaatggata cacaaaatta ttttaacata taaggtacca cagtcatag 4679
 <210> 9
 <211> 3679
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Gen HGF-X7

5

<400> 9
 atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcatctcctc 60
 ctgctcccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120
 gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa 180
 accaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt 240
 ccattcactt gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc 300
 ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa 360
 aacaaagact acattagaaa ctgcatcatc ggtaaaggac gcagctaca gggaacagta 420
 tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac 480
 aggtaagaac agtatgaaga aaagagatga agcctctgct ttttttacct gttaacagtc 540
 tcatattagt ctttcagaat aattctacaa tcttaaaata acttagccaa cttgctgaat 600
 tgtattacgg caaggtrtat atgaattcat gactgatatt tagcaaatga ttaattaata 660
 tgtaataaaa atgtagccaa aacaatatct taccttaatg cctcaatttg tagatctcgg 720
 tatttgtgga tcctgggtag gaaacacatt tgaatggtat ttactaagat actaaaatcc 780
 ttggacttca ctctaatttt agtgccattt agaactcaag gtctcagtaa aagtagaaat 840
 aaagcctggt aacaaaacac aagctgaata ttaaaaatgt aactggattt tcaaagaaat 900
 gtttactggt attacctgta gatgtatatt ctttattatg atcttttgtg taaagtctgg 960
 cagacaaatg caatatctaa ttgttgagtc caatatcaca agcagtaca aagtataaaa 1020
 aagacttggc cttttctaat gtgttaaaat actttatgct ggtaataaca ctaagagtag 1080
 ggcactagaa attttaagtg aagataatgt gttgcagtta ctgcaactca tggcttacta 1140
 ttataacca aaactgggat cactaagctc cagtcagtc aaatgatcaa aattattgaa 1200
 gagaataagc aattctgttc tttattagga cacagtagat acagactaca aagtggagtg 1260
 tgcttaataa gaggtagcat ttgttaagtg tcaattactc tattatccct tggagcttct 1320
 caaaataacc atataagggtg taagatgtta aaggttatgg ttacactcag tgcacaggta 1380
 agctaatagg ctgagagaag ctaaattact tactggggtc tcacagtaag aaagtgagct 1440
 gaagtttcag cccagattta actggattct gggctcttta ttcattgttac ttcattgaatc 1500
 tgtttctcaa ttgtgcagaa aaaagggggc tatttataag aaaagcaata aacaaacaag 1560
 taatgatctc aaataagtaa tgcaagaaat agtgagattt caaaatcagt ggcagcgatt 1620

ES 2 537 971 T3

tctcagttct gtcctaagtg gccttgctca atcacctgct atcttttagt ggagctttga 1680
aattatgrrt cagacaactt cgattcagtt ctagaatgrrt tgactcagca aattcacagg 1740
ctcatctrrt taacttgatg gtgaatatgg aaattcagct aaatggatgt taataaaatt 1800
caaacgrrrr aaggacagat gaaaatgaca gaattttaag gtaaaatata tgaaggaata 1860
taagataaag gatttttcta ccttcagcaa aaacataccc actaattagt aaaattaata 1920
ggcaaaaaaa agttgcatgc tcttatactg taatgattat catttttaaaa ctagctrrrr 1980
gccttcgagc tatcggggta aagacctaca ggaaaactac tgtcgaaatc ctcgagggga 2040
agaaggggga ccctgggtgtt tcacaagcaa tccagaggta cgctacgaag tctgtgcat 2100
tcctcagrrt tcagaagrrt aatgcatgac ctgcaatggg gagagrrtat gaggtctcat 2160
ggatcataca gaatcaggca agatttgtca gcgctgggat catcagacac cacaccggca 2220
caaattcttg cctgaaagat atcccagcaa gggctrrgat gataattatt gccgcaatcc 2280
cgatggccag ccgaggccat ggtgctatac tcttgaccct cacaccgct gggagtactg 2340
tgcaattaa acatgcgctg acaatactat gaatgacct gatgrrcrrt tggaaacaac 2400
tgaatgcatc caaggtcaag gagaaggcta caggggcaact gtcaatacca tttggaatgg 2460
aattccatgt cagcgttggg attctcagta tcctcagag catgacatga ctctgaaaa 2520
tttcaagtgc aaggacctac gagaaaatta ctgccgaaat ccagatgggt ctgaatcacc 2580
ctggtgrrrr accactgatc caaacatccg agttggctac tgcrrccaaa trccaaactg 2640
tgatatgtca catggacaag attgrrtatcg tgggaatggc aaaaattata tgggcaactt 2700
atcccaaaca agatctggac taacatgrrc aatgtgggac aagaacatgg aagacttaca 2760
tcgtcatatc trctgggaac cagatgcaag taagctgaat gagaattact gccgaaatcc 2820
agatgatgat gctcatggac cctgggtgcta cacgggaaat ccactcrrc cttgggatta 2880
ttgccctatt tctcgttgtg aaggtgatac cacacctaca atagtcaatt tagaccatcc 2940
cgtaatatct tgtgccaaaa cgaaacaatt gcgagrrtga aatgggrrc caacacgaac 3000
aaacatagga tggatggrra grrtgagata cagaaataaa catatctgcg gaggatcrrt 3060
gataaaggag agrrtggrrc tractgcacg acagrrrrc crrtctcgag acttgaaaga 3120
ttatgaagct tggcrrtggaa trcatgatgt ccacggaaga ggagatgaga aatgcaaaca 3180
ggrrctcaat grrrrccagc tggrrtatgg ccctgaagga tcagatctgg trrraatgaa 3240
gcttgccagg cctgctgrrc tggatgrrrr tgrrrtagtac attgrrrrc crraattatgg 3300
atgcacaatt cctgaaaaga ccagrrtgcag tgrrrtatggc tggggrrcaca crrgarrtgar 3360
caactatgat ggcrratrrc gagrrgrrcaca trctatata atgggaaatg agaaatgcag 3420
ccagcatcat cgaggggaag tgactctgaa tgagrrcrrc atatgrrcrrc gggrrcraaaa 3480
garrtggatca ggaccatgrr agggggrrra tggrrgrrcc crrgrrrrrrc agcaacataa 3540
aatgagaatg grrcrrtggrr trcrrrrrrc tggrrcrrrrc tgrrrccrrc caaatcrrcc 3600
tggrrrrrrrr grrccgagrrc catarratgrr aaaaatgrra cacaaaarra trrraacata 3660
taaggtacca cagrrcatag 3679

<210> 10
<211> 2729

ES 2 537 971 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220> Gen HGF-X8
 <223>

<400> 10
 atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcatctcctc 60
 ctgctcccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120
 gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa 180
 accaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt 240
 ccattcactt gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc 300
 ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa 360
 aacaagact acattagaaa ctgcatcadc ggtaaaggac gcagctacaa gggaacagta 420
 tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac 480
 aggtaagaac agtatgaaga aaagagatga agcctctgtc ttttttacct gttaacagtc 540
 tcatattagt ccttcagaat aattctacaa tcctaaaata acttagccaa ctgctgaat 600
 tgtattacgg caaggtttat atgaattcat gactgatatt tagcaaatga ttaattaata 660
 tgtaataaaa atgtagccaa aacaatatct taccttaatg cctcaatttg tagatctcgg 720
 tatttggga tccttatggt tcagacaact tcgattcagt tctagaatgt ttgactcagc 780
 aaattcacag gctcatcttt ctaacttgat ggtgaatatg gaaattcagc taaatggatg 840
 ttaataaaaat tcaaactgtt taaggacaga tgaaaatgac agaattttaa ggtaaaatat 900
 atgaaggaat ataagataaa ggatttttct accttcagca aaaacatacc cactaattag 960
 taaaattaat aggcaaaaaa aagttgcatg ctcttatact gtaatgatta tcattttaa 1020
 actagctttt tgccttcgag ctatcggggt aaagacctac aggaaaacta ctgtcgaaat 1080
 cctcgagggg aagaaggggg accctgggtg ttcacaagca atccagaggt acgctacgaa 1140
 gtctgtgaca ttcctcagtg ttcagaagtt gaatgcatga cctgcaatgg ggagagttat 1200
 cgaggcttca tggatcatac agaatcaggc aagatttgtc agcgtggga tcatcagaca 1260
 ccacaccggc acaaattctt gcctgaaaga tatcccgaca agggcttga tgataattat 1320
 tgccgcaatc ccgatggcca gccgagcca tgggtctata ctcttgacc tcacaccgc 1380
 tgggagtact gtgcaattaa aacatgcgct gacaatacta tgaatgacac tgatgttct 1440
 ttgaaacaa ctgaatgcat ccaaggtaa ggagaaggct acaggggcac tgtcaatacc 1500
 atttggaatg gaattccatg tcagcgttgg gattctcagt atcctcacga gcatgacatg 1560
 actcctgaaa atttcaagtg caaggacctc cgagaaaatt actgccgaaa tccagatggt 1620

ctgaatcacc ctggtgtttt accactgatc' caaacatccg agt'tggctac tgctcccaa 1680
 ttccaaactg tgatatgtca catggacaag attgttatcg tgggaatggc aaaaattata 1740
 tgggcaactt atcccaaaca agatctggac taacatgttc aatgtgggac aagaacatgg 1800
 aagacttaca tcgtcatatc ttctgggaac cagatgcaag taagctgaat gagaattact 1860
 gccgaaatcc agatgatgat gctcatggac cctggtgcta cacgggaaat ccactcattc 1920
 cttgggatta ttgccctatt tctcgttggtg aaggtgatac cacacctaca atagtcaatt 1980
 tagaccatcc cgtaatatct tgtgccaaaa cgaaacaatt gcgagttgta aatgggattc 2040
 caacacgaac aaacatagga tggatggtta gtttgagata cagaaataaa catatctgcg 2100
 gaggatcatt gataaaggag agttgggttc ttactgcacg acagtgtttc ccttctcgag 2160
 acttgaaaga ttatgaagct tggcttggaa ttcatgatgt ccacggaaga ggagatgaga 2220
 aatgcaaaca ggttctcaat gtttcccagc tggatatatgg ccctgaagga tcagatctgg 2280
 ttttaatgaa gcttgccagg cctgctgtcc tggatgattt tgttagtacg attgatttac 2340
 ctaattatgg atgcacaatt cctgaaaaga ccagttgcag tgtttatggc tggggctaca 2400
 ctggattgat caactatgat ggcctattac gagtggcaca tctctatata atgggaaatg 2460
 agaaatgcag ccagcatcat cgaggggaagg tgactctgaa tgagtctgaa atatgtgctg 2520
 gggctgaaaa gattggatca ggaccatgtg agggggatta tggtgccca cttgtttgtg 2580
 agcaacataa aatgagaatg gttcttggtg tcattgttcc tggctcgtgga tgtgccattc 2640
 caaatcgtcc tggatatttt gtccgagtag catattatgc aaaatggata cacaaaatta 2700
 ttttaacata taaggtagca cagtcatag 2729

<210> 11
 <211> 285
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu
 1 5 10 15
 Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln
 20 25 30
 Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr
 35 40 45
 Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val
 50 55 60
 Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
 65 70 75 80
 Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys
 85 90 95

ES 2 537 971 T3

Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe
 100 105 110

Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys
 115 120 125

Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys
 130 135 140

Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
 145 150 155 160

Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Arg
 165 170 175

Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg
 180 185 190

Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr
 195 200 205

Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly
 210 215 220

Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe
 225 230 235 240

Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys Arg
 245 250 255

Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His
 260 265 270

Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Glu Thr
 275 280 285

<210> 12
 <211> 296
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu
 1 5 10 15

Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln
 20 25 30

Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr
 35 40 45

ES 2 537 971 T3

Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val
 50 55 60
 Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
 65 70 75 80
 Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys
 85 90 95
 Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe
 100 105 110
 Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys
 115 120 125
 Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys
 130 135 140
 Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
 145 150 155 160
 Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr
 165 170 175
 Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser
 180 185 190
 Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu
 195 200 205
 Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp
 210 215 220
 His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro
 225 230 235 240
 His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp
 245 250 255
 Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr
 260 265 270
 Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Asn Met
 275 280 285
 Arg Asp Ile Thr Trp Ala Leu Asn
 290 295

REIVINDICACIONES

1. Una composición la invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de la revascularización incompleta del miocardio en un sujeto que ha tenido un injerto de derivación de la arteria coronaria, pero ha habido una revascularización incompleta del miocardio, comprendiendo la composición dos o más isoformas de HGF o uno o más polinucleótidos que codifican las isoformas como ingredientes activos, en donde dichas dos o más isoformas de HGF se seleccionan del grupo que consiste en HGF completo (flHGF), variante por delección de HGF (dHGF), NK1, NK2 y NK4.
2. La composición para su uso de la reivindicación 1, en donde el sujeto necesita tratamiento de reestenosis.
3. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dichas dos o más isoformas de HGF se administran en forma de polinucleótidos que codifican las isoformas.
4. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha composición se administra mediante inyección.
5. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicha composición se administra utilizando un dispositivo de suministro, y preferiblemente en donde dicho dispositivo de suministro es un implante endoluminal.
6. La composición para su uso de la reivindicación 5, en donde dicho implante endoluminal se selecciona del grupo que consiste en un implante endoluminal de acero inoxidable no basado en polímero, un implante endoluminal de acero inoxidable con una base de polímero, un implante endoluminal de cobalto-cromo no basado en polímero, y un implante endoluminal de cobalto-cromo con una base de polímero.
7. La composición para su uso de la reivindicación 5, en donde dicha composición se libera de dicho implante endoluminal.
8. La composición para su uso de la reivindicación 1, en donde dichas dos o más isoformas de HGF comprenden HGF completo (flHGF) y variante por delección de HGF (dHGF).
9. La composición para su uso de la reivindicación 8, en donde dichas dos o más isoformas de HGF comprenden adicionalmente NK1.
10. La composición para su uso de la reivindicación 8, en donde dichas dos o más isoformas de HGF consisten en flHGF y dHGF.
11. La composición para su uso de la reivindicación 8, en donde dichos flHGF y dHGF son cada uno idénticos al menos en 80%, preferiblemente al menos 90%, o preferiblemente al menos 95% a la secuencia de tipo salvaje de flHGF humano y dHGF humano.
12. La composición para su uso de la reivindicación 11, en donde dichos flHGF y dHGF son flHGF humano y dHGF humano.
13. La composición para su uso de la reivindicación 8, en donde dicho flHGF y dicho dHGF están codificados por polinucleótidos separados o están codificados por el mismo polinucleótido.
14. La composición para su uso de la reivindicación 1, en donde dichos uno o más polinucleótidos están conectados operablemente a un promotor, y preferiblemente a un promotor constitutivo.
15. La composición para su uso de la reivindicación 1, en donde dichos uno o más polinucleótidos están en diferentes vectores.
16. La composición para su uso de la reivindicación 1, en el que dicho uno o más polinucleótidos en el mismo vector.
17. La composición para su uso de la reivindicación 16, en donde dicho vector es un vector viral o un vector plasmídico, preferiblemente un vector pCK.
18. La composición para su uso de la reivindicación 8, en donde dicho flHGF y dicho dHGF están codificados por un constructo de HGF híbrido que comprende los exones 1-18 de HGF o productos degenerados de los mismos que no alteran la secuencia de aminoácidos codificada y que comprende adicionalmente un intrón entre los exones 4 y 5, en donde dicho constructo está desprovisto de otros intrones entre los exones distintos de dicho intrón entre los exones 4 y 5.
19. La composición para su uso de la reivindicación 18, en donde dicho intrón es un intrón inherente, y preferiblemente en donde dicho constructo de HGF híbrido comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7.

20. La composición para su uso de la reivindicación 18, en donde dicho intrón es un fragmento de un intrón inherente, y preferiblemente en donde dicho constructo de HGF híbrido comprende la secuencia de nucleótidos de los SEQ ID NO: 8, 9, o 10.
- 5 21. La composición para su uso de la reivindicación 1, en donde dicho sujeto es un ser humano y dichas isoformas de HGF se administran a una dosis de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 mg cada una.
22. La composición para su uso de la reivindicación 1, en donde dicho sujeto es un ser humano y dichos polinucleótidos se administran a una dosis de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 mg.
- 10 23. Un uso de una composición que comprende dos o más isoformas de HGF o uno o más polinucleótidos que codifican las isoformas para la fabricación de un medicamento para tratar la revascularización incompleta del miocardio en un sujeto que ha tenido un injerto de derivación de la arteria coronaria, pero ha habido una revascularización incompleta del miocardio, en donde dichas dos o más isoformas se seleccionan del grupo que consiste en HGF completo (flHGF), variante por delección de HGF (dHGF), NK1, NK2 y NK4.

FIG. 1

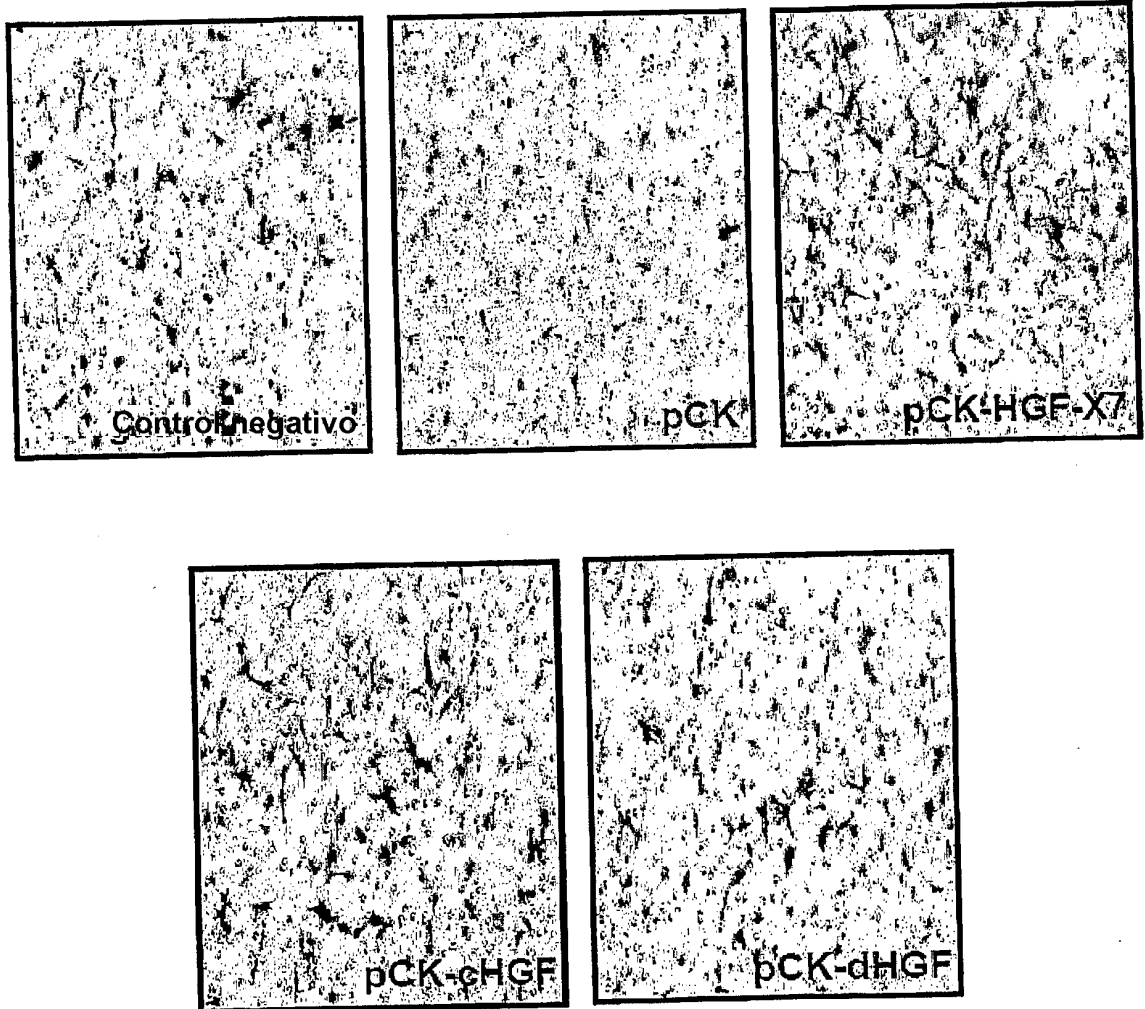


FIG. 1 (continuación)

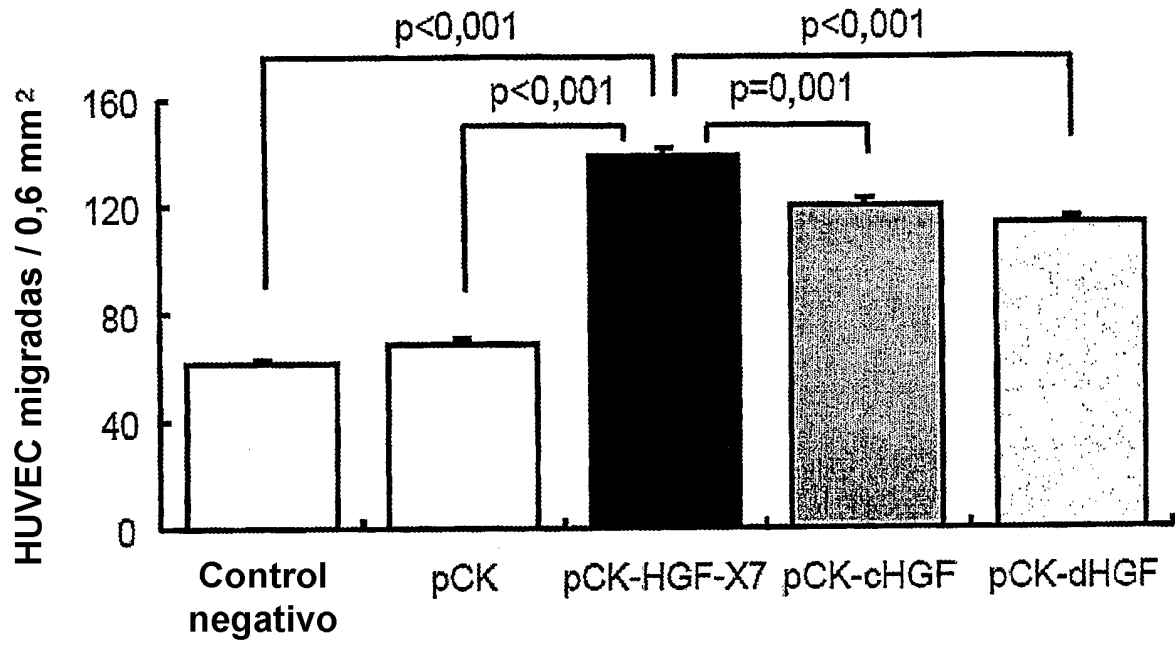


FIG. 2

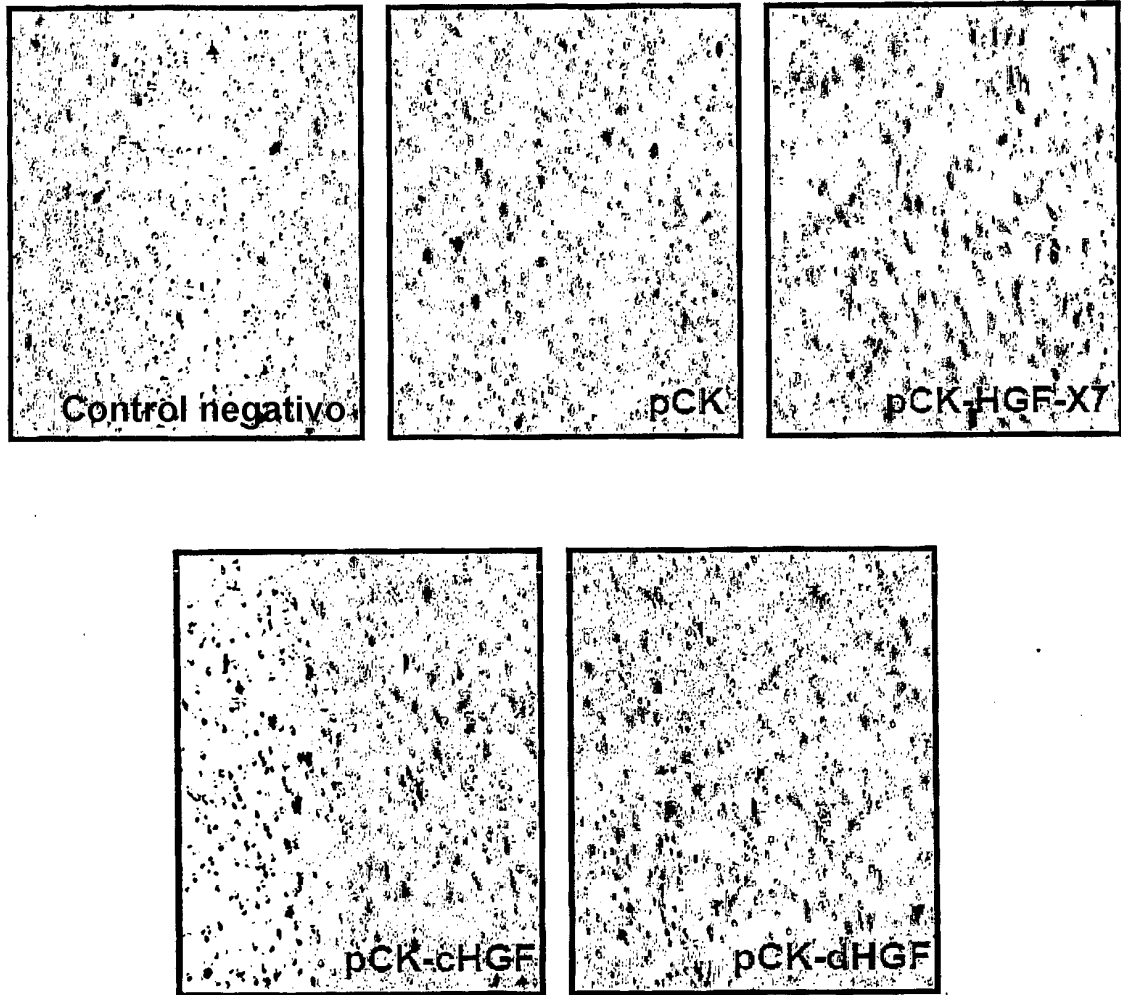


FIG. 2 (continuación)

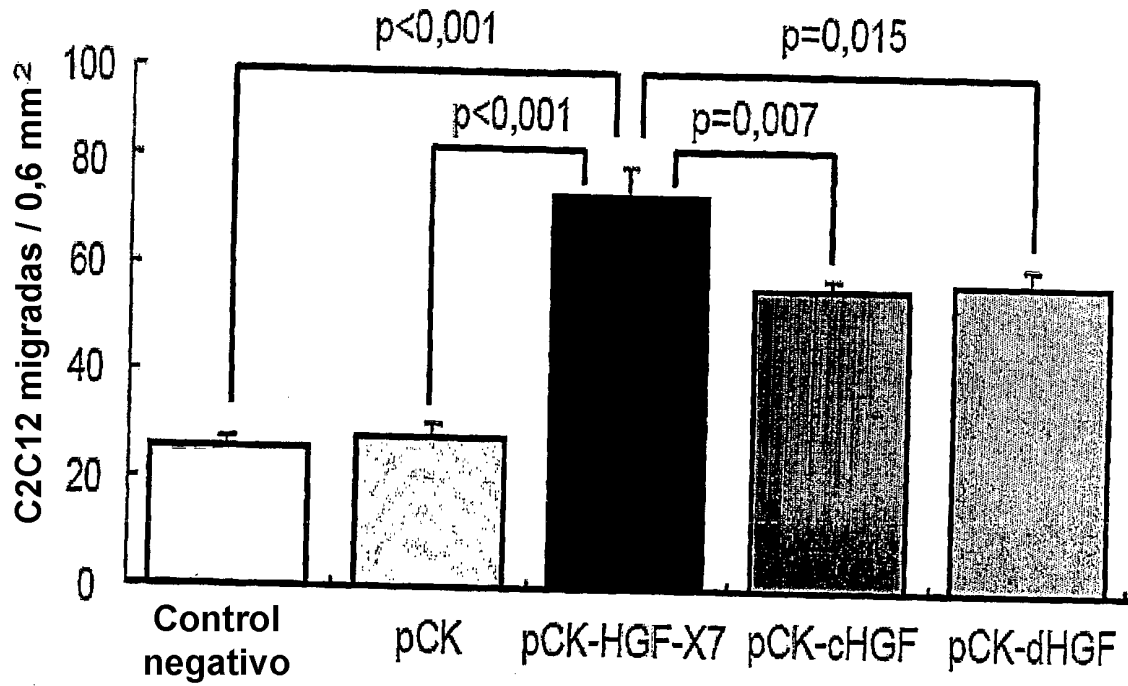


FIG. 3

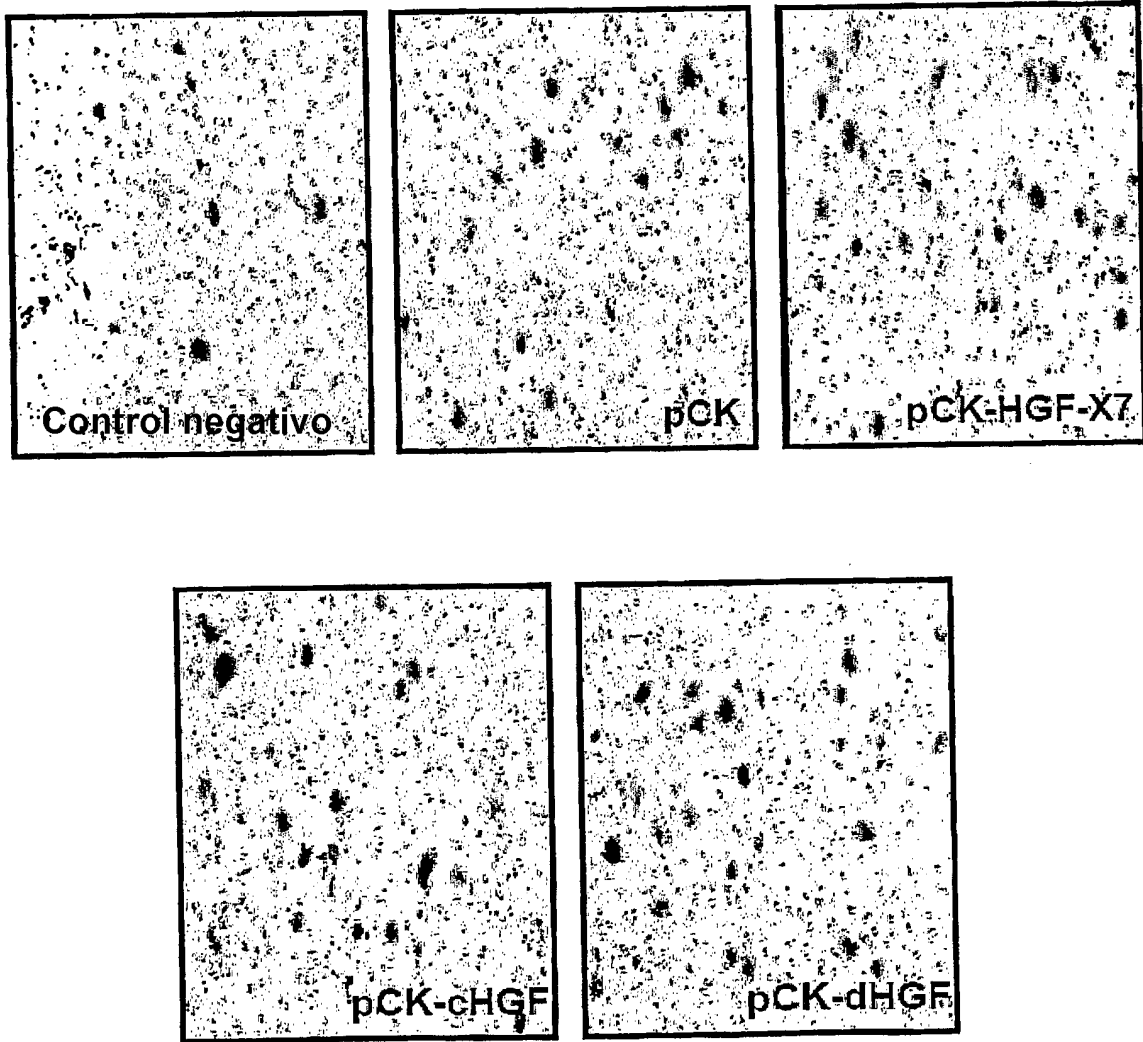


FIG. 3 (continuación)

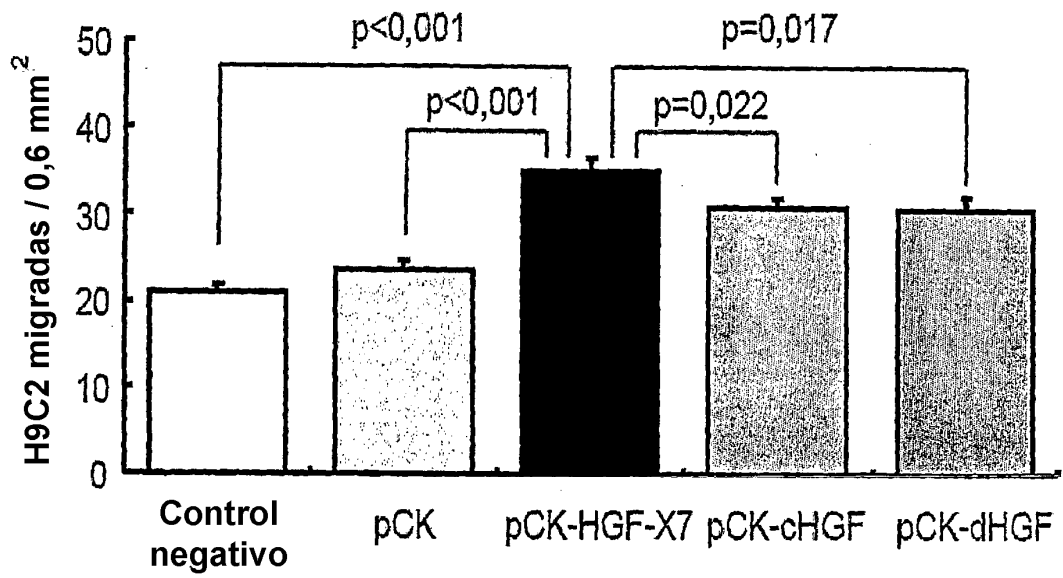


FIG. 4

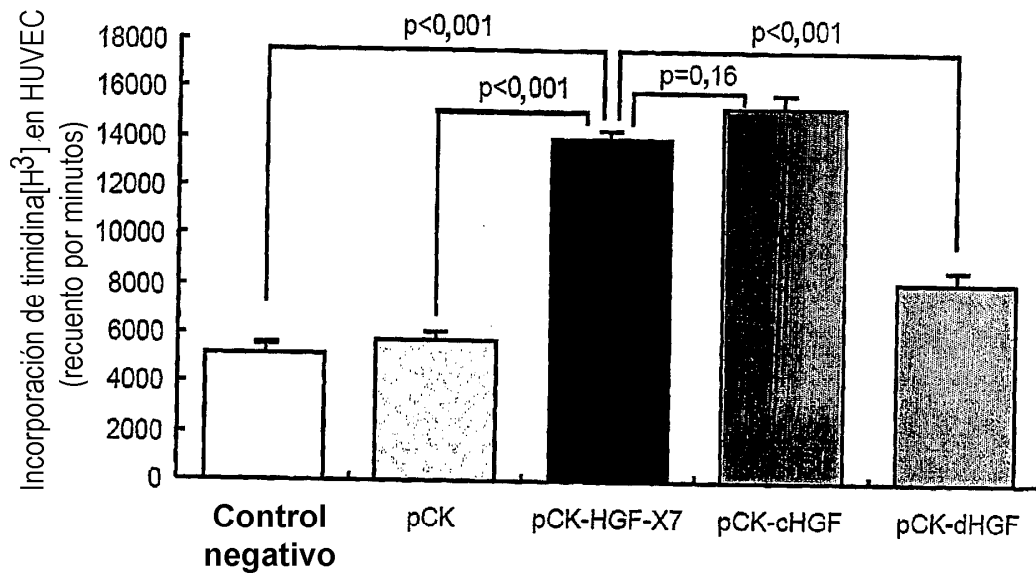


FIG. 5

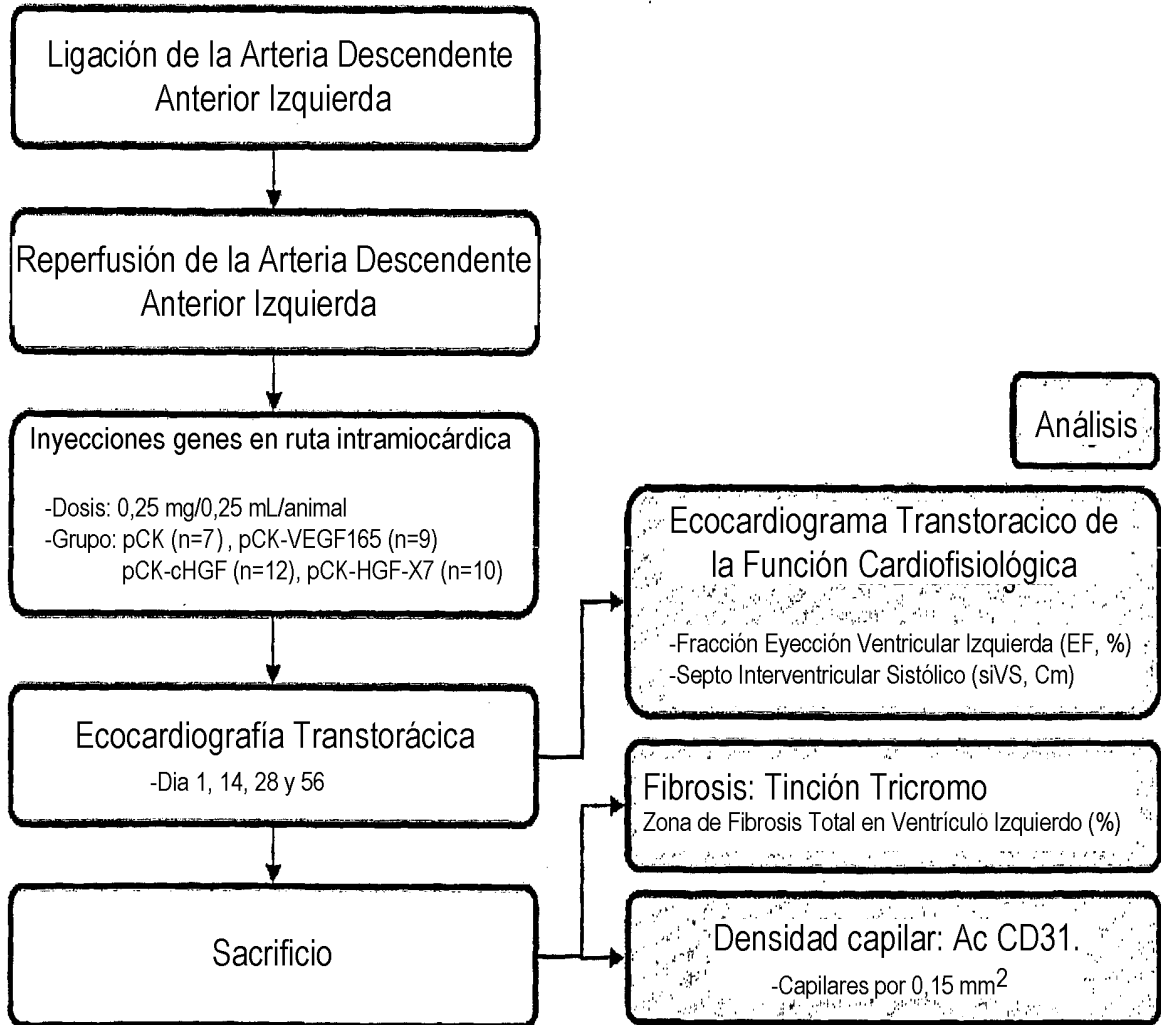
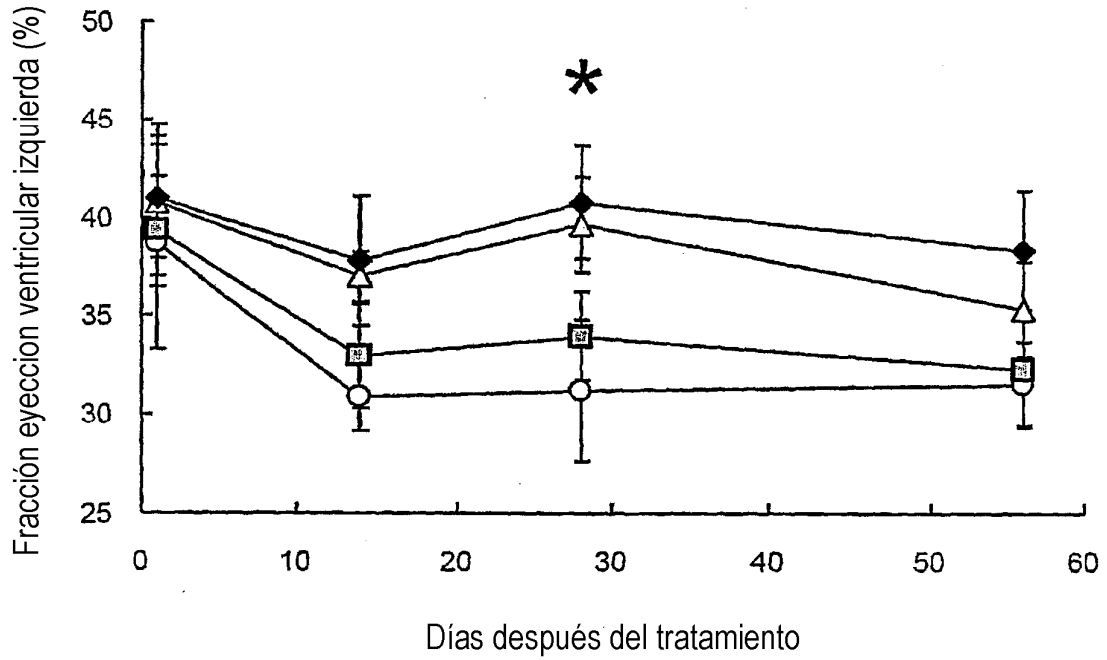


FIG. 6



—○— pCK —△— pCK-VEGF165 —□— pCK-cHGF —◆— pCK-HGF-X7

FIG. 7

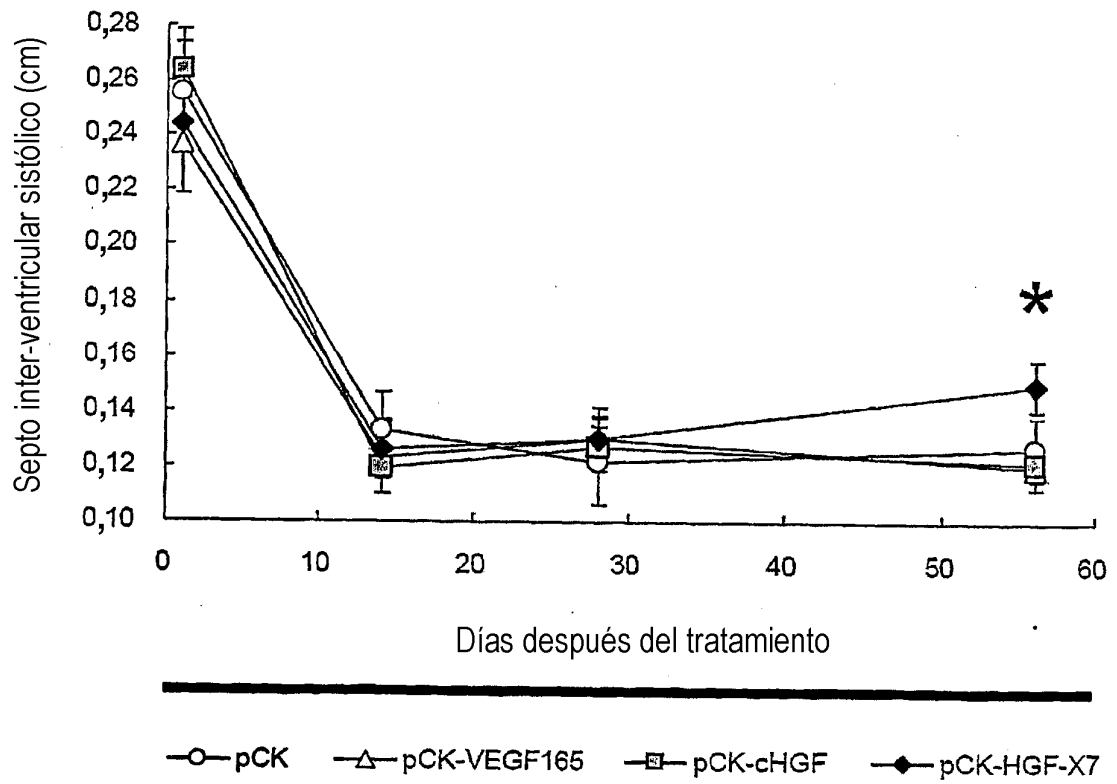


FIG. 8

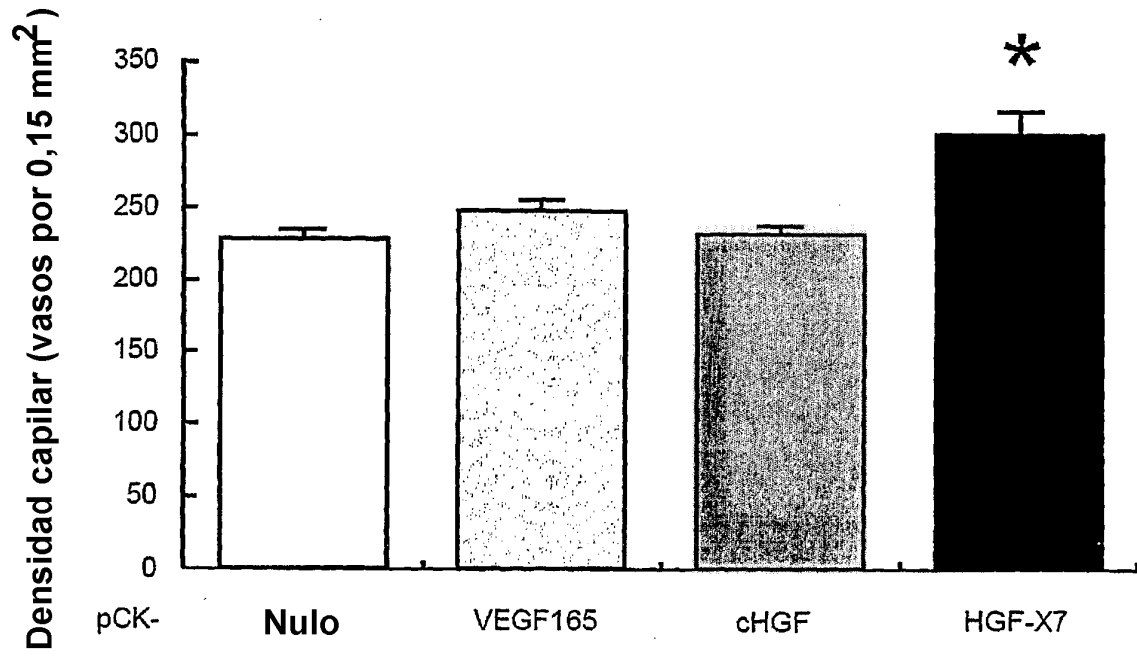


FIG. 9

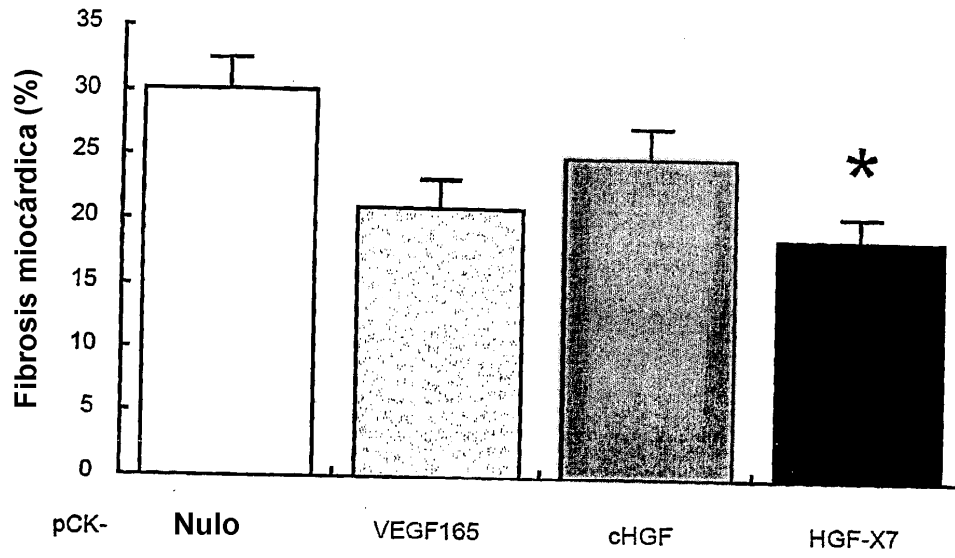


FIG. 10

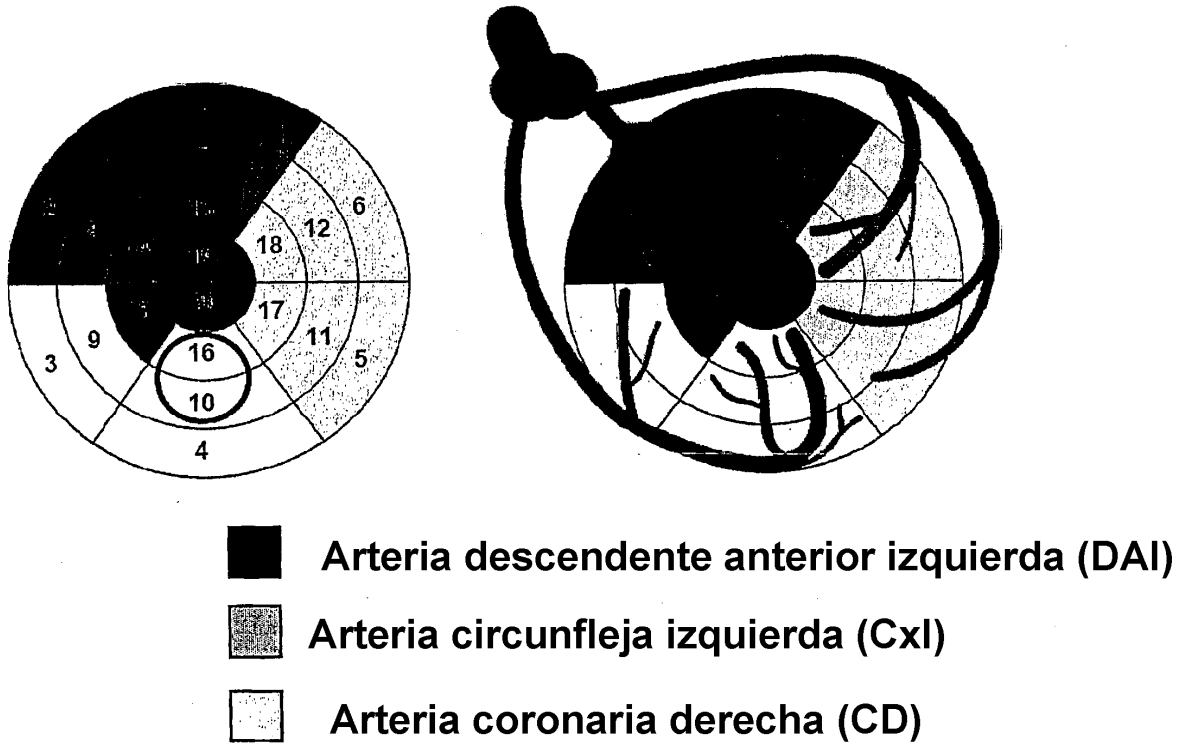
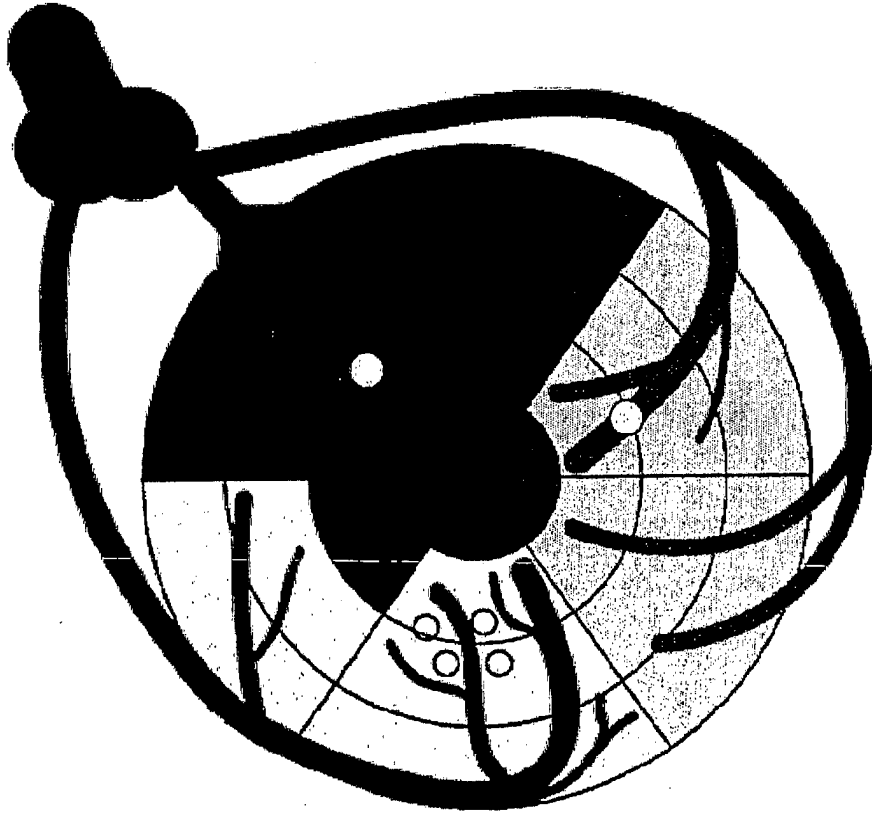


FIG. 11



○ Punto de la inyección

● CABG

FIG. 12

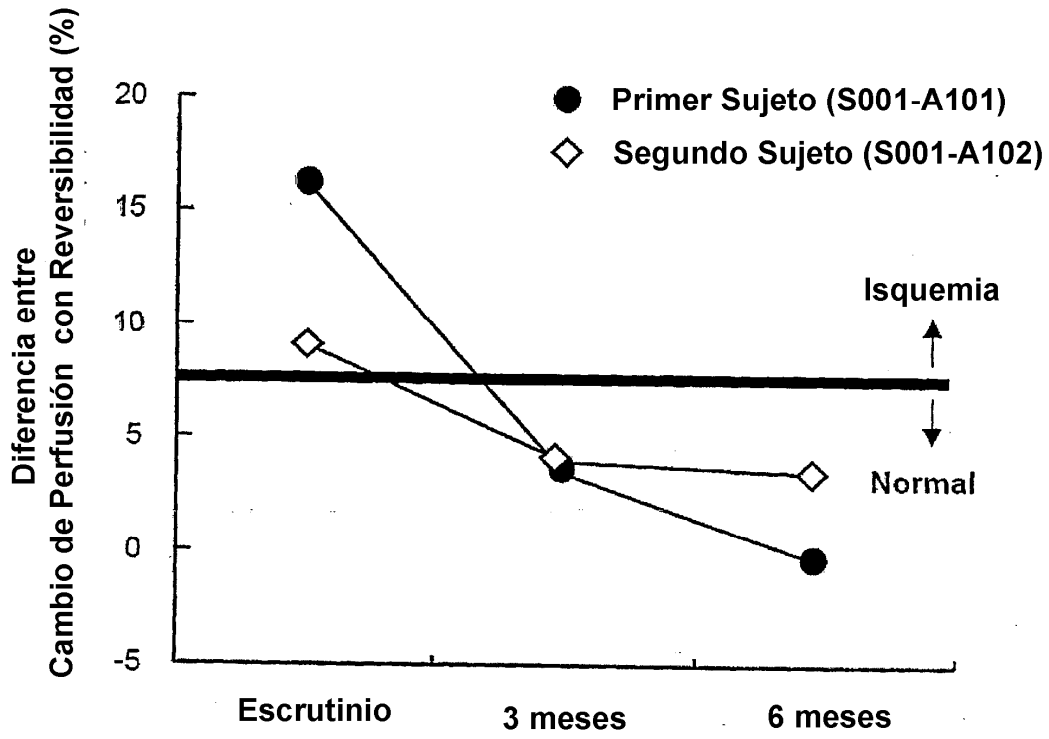
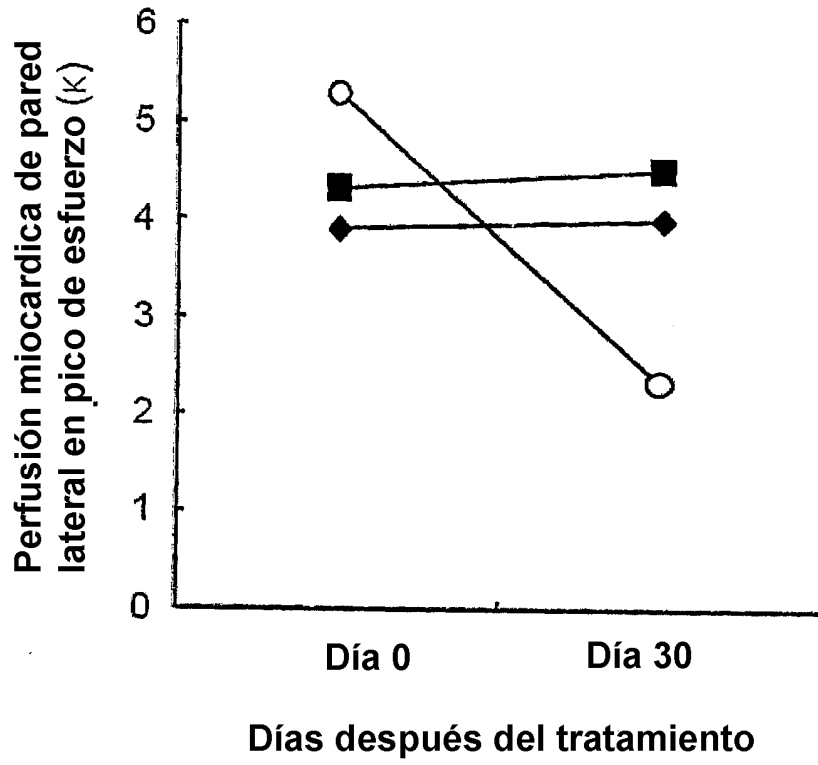
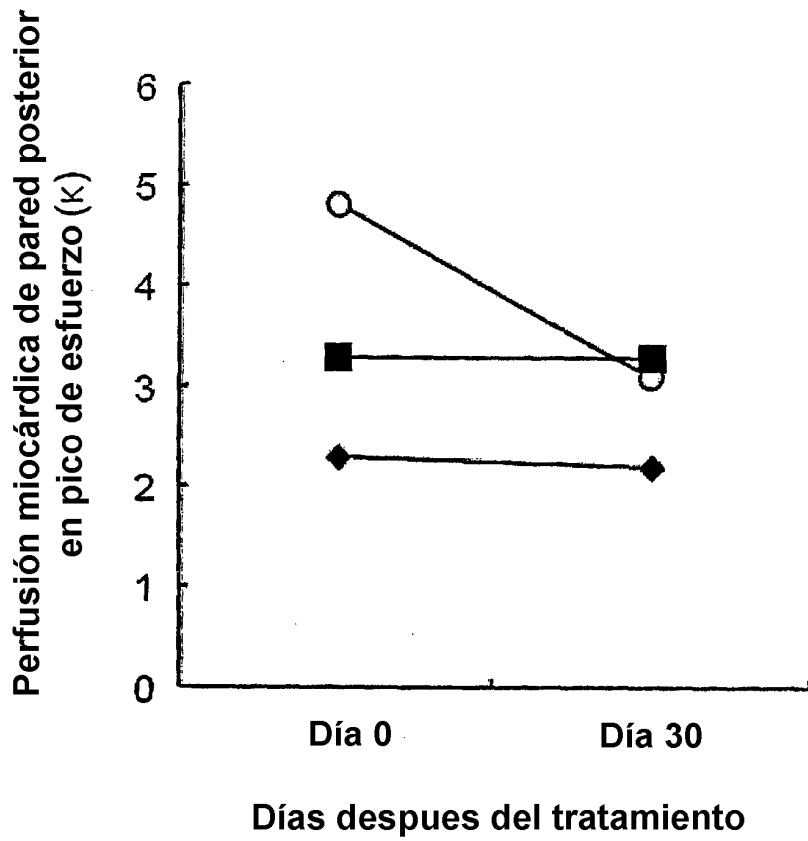


FIG. 13



○ Control vehículo ■ Dosis baja ◆ Dosis elevada

FIG. 13 (continuación)



-○- Control vehículo -■- Dosis baja -◆- Dosis elevada

FIG. 14

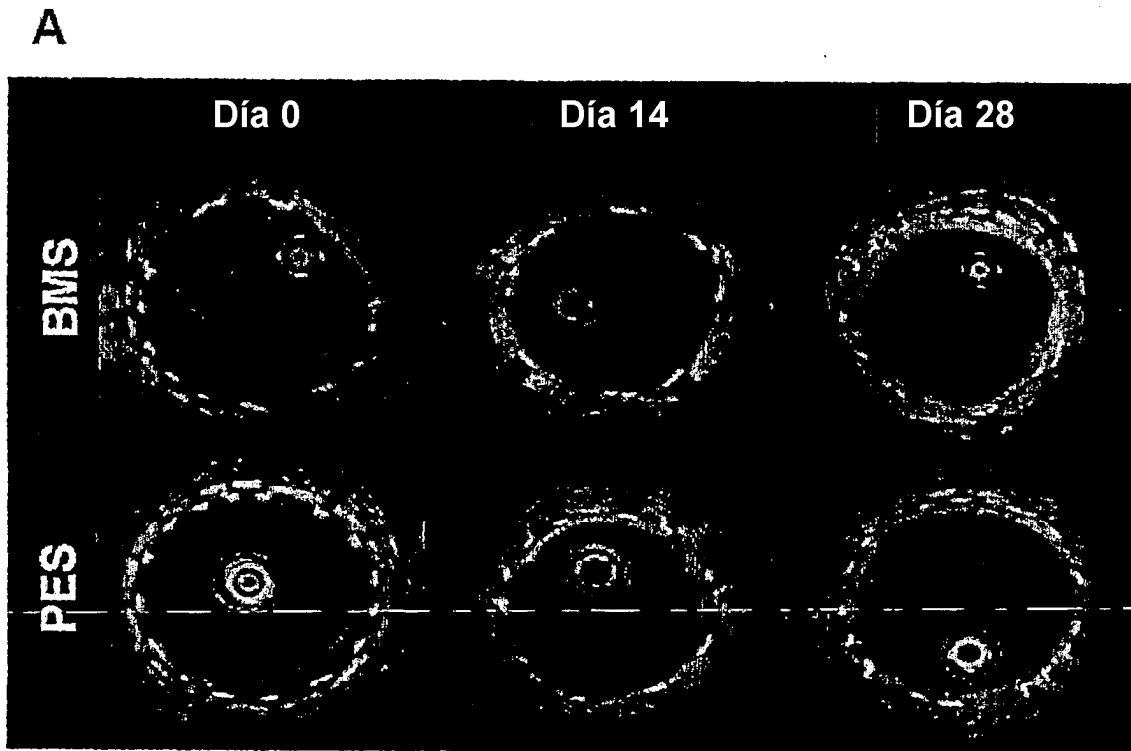


FIG. 14 (continuación)

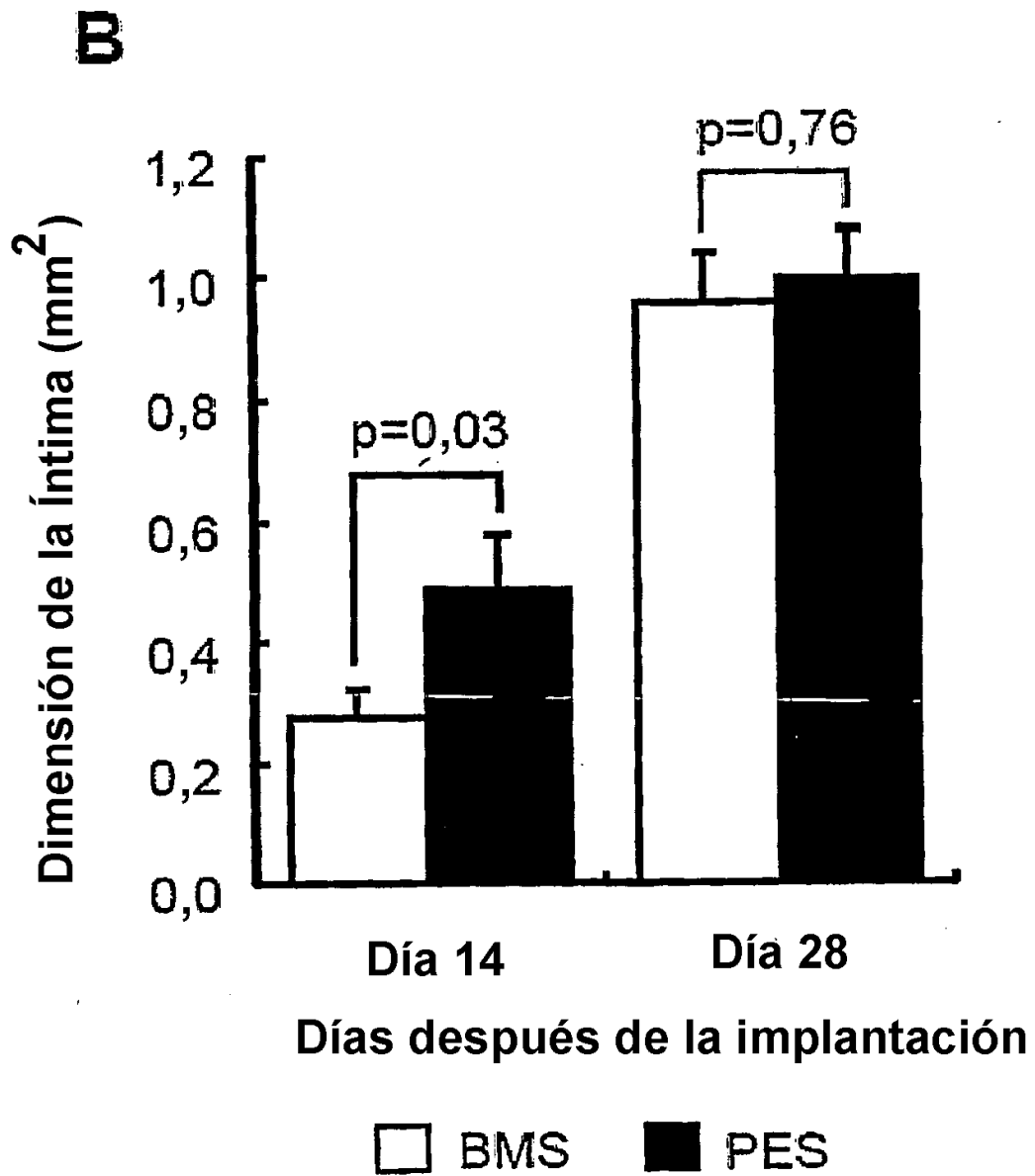
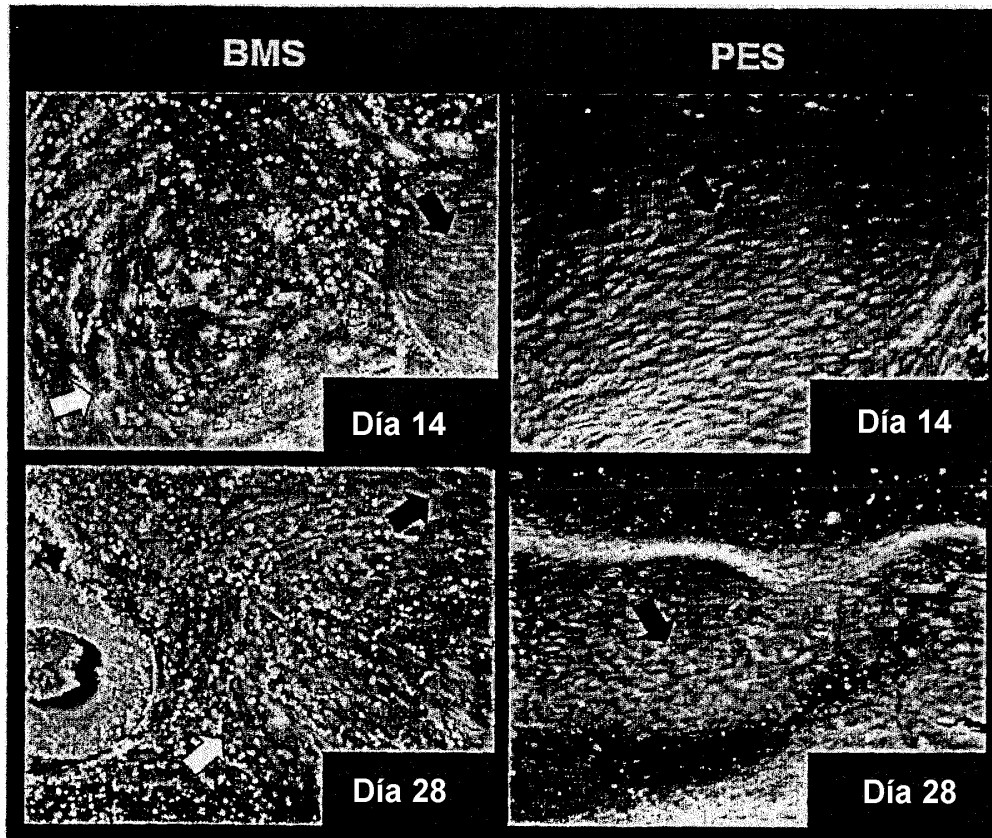


FIG. 15



1. Flecha de color blanco: Capa de células de músculo liso
2. Flecha de color negro: Capa de células endoteliales
3. Aumento: x200