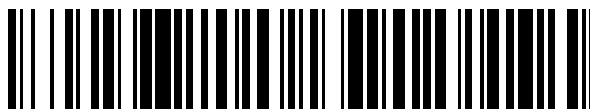


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 711**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2009 E 09730532 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2015 EP 2281040**

54 Título: **Formulaciones liofilizadas de ADN para el aumento de la expresión del ADN plasmídico**

30 Prioridad:

09.04.2008 US 43605 P

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

19.01.2016

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;
HAHN, WOONG y
YOO, WONSUN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 556 711 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

Formulaciones liofilizadas de ADN para el aumento de la expresión del ADN plasmídico

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a una formulación de ADN liofilizado a partir de una composición que comprende un ADN plasmídico, una sal y un carbohidrato, en la que dicho ADN plasmídico comprende un gen de HGF (*hepatocyte growing factor*, factor de crecimiento de hepatocitos), o una variante del mismo.

10

Antecedentes de la invención

La liofilización suele ser una formulación preferida para materiales terapéuticos porque la estabilidad prolongada de muchos materiales aumenta en el estado liofilizado. Sin embargo, para el ADN plasmídico, las formulaciones liofilizadas no son las formulaciones de elección. En la mayoría de los ensayos clínicos que usan ADN desnudo (plasmídico sin formar complejo) como vector de liberación, la formulación preferida ha sido una formulación líquida.

15

Aunque el ADN plasmídico liofilizado puede ser una forma preferida de conservación, se ha considerado que las formulaciones liofilizadas para ADN plasmídico provocan una reducción de la eficacia de la expresión genética. La liofilización provoca la eliminación de la esfera de hidratación alrededor de una molécula. Para el ADN, parece que hay aproximadamente 20 moléculas de agua por cada par de nucleótidos, la mayoría unidas al ADN tan fuertemente que no forman una estructura similar al hielo tras el enfriamiento a baja temperatura. Después de la deshidratación del ADN sobre sales higroscópicas al 0% de humedad relativa, sólo quedan cinco o seis moléculas. Por consiguiente, la liofilización puede aumentar la estabilidad del ADN en conservación a largo plazo, pero también puede causar algún daño en el proceso inicial de liofilización, potencialmente a través de cambios en la estructura secundaria del ADN o la concentración de elementos reactivos, tales como metales contaminantes. Por tanto, un posible mecanismo para la pérdida de eficacia de la expresión genética del ADN plasmídico liofilizado puede ser a través de un cambio estructural importante del plásmido.

20

25

30

En Poxon y cols., *Pharmaceutical Development and Technology* 5:115-122 (2000), los autores demostraron que la liofilización de un ADN plasmídico (pRL-CMV) daba como resultado una pérdida estadísticamente significativa de la eficacia de la transfección. En un ensayo de biofuncionalidad en el que se medía la actividad de transfección, se demostró una pérdida de más del 75 % de la actividad del ADN plasmídico después de la liofilización, en comparación con un plásmido de control que permaneció en solución. Aunque Poxon y cols. usaron carbohidratos para mejorar la eficacia de transfección reducida *in vitro* de un plásmido no terapéutico, pRL-CMV que expresaba luciferasa de *Renilla*, almacenado en tampón EDTA, Poxon y cols. no estudiaron el uso *in vivo* de formulaciones liofilizadas de ADN desnudo para el tratamiento o la prevención de la enfermedad.

35

40

Además, Jo y cols. ("Liver targeting of plasmid DNA with a cationized pullulan for tumor suppression", *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 6, n.º. 9-10, 2006, páginas 2853-2859) divulgan que el ADN plasmídico de NK4 dirigido hacia el hígado mediante la formación de un complejo con espermina-pululano aumentaba de forma específica el nivel de expresión en el hígado, dando como resultado un mayor efecto supresor del crecimiento tumoral en el mismo.

45

Morishita y cols. ("Therapeutic angiogenesis using Hepatocyte Growth Factor (HGF)", *Current Gene Therapy*, vol. 4, n.º. 2, 2004, páginas 199-206) revisan el campo técnico relacionado con el uso de HGF en la enfermedad cardiovascular.

50

Nakagami y cols. ("Hepatocyte growth factor as potential cardiovascular therapy", *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, *Future Drugs*, vol. 3, n.º. 3, 2005, páginas 513-519) divulga que la inyección intramuscular de HGF plasmídico desnudo es segura, factible y pueden lograrse con éxito una mejoría en las extremidades isquémicas.

El documento CN1358543 divulga un plásmido recombinante con un gen de HGF y su aplicación para prevenir y curar enfermedades, específicamente para prevenir y curar enfermedades isquémicas y cicatrización patológica.

55

El documento WO03078568 divulga un gen de HGF híbrido que se prepara mediante la inserción de un intrón extraño o inherente entre los exones 4 y 5 en un ADNc de HGF de SEC ID n.º 2, como se define en dicho documento. El gen tiene una alta eficacia de expresión y expresa simultáneamente dos heterotipos de HGF y HGFd (variante delecionada de HGF). El gen híbrido se propone para el uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades isquémicas o hepáticas.

60

El documento US2003176347 divulga un agente terapéutico y supresor de la progresión para la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) que contiene HGF y/o el gen de HGF como ingrediente activo.

65

El documento EP0838221 divulga una preparación de HGF liofilizado preparado mediante liofilización de una solución acuosa que contiene HGF, un estabilizador, cloruro sódico, un tampón, y/o un agente tensioactivo.

Sharma y cols. ("Moisture-Induced Aggregation of Lyophilized DNA and its Prevention", Pharmaceutical Research, vol. 24, nº 1, 2006, páginas 168-175) divulga que la agregación de ADN liofilizado inducida por humedad está causada principalmente por enlaces transversales no covalentes entre regiones desordenadas de ADN monocatenario. Se divulga además que la agregación puede reducirse al mínimo mediante el uso de una solución con pH y concentración de sal óptimos antes de la liofilización, y mediante la coliofilización con excipientes capaces de formar múltiples puentes de hidrógeno, p. ej., dextrano y sacarosa.

Por tanto, hay una necesidad en la técnica de una formulación liofilizada estable que no afecte a la eficacia de la expresión genética. La presente invención proporciona una formulación liofilizada para ADN plasmídico que no sólo preserva la actividad biológica del gen expresado, sino que, en ciertos casos, es capaz de aumentar la actividad biológica.

Sumario de la invención

La presente invención está dirigida a una formulación liofilizada de ADN que comprende un ADN plasmídico, una sal y un carbohidrato, en la que

- (i) dicho ADN plasmídico comprende un gen del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), o variante del mismo, que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 2 (fHGF), la SEC ID N°: 3 (dHGF), la SEC ID N°: 4 (NK1), la SEC ID N°: 5 (NK2), la SEC ID N°: 6 (NK4),
- (ii) dicha sal es NaCl,
- (iii) dicho carbohidrato es sacarosa,

y en la que, antes de la liofilización, el NaCl estaba presente en la formulación de ADN en una cantidad de entre 0,5 % y 2 % y la sacarosa estaba presente en la formulación de ADN de entre 0,8 % y 5 %, para el uso en un método de tratamiento o prevención de la enfermedad isquémica o hepática en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración de una composición reconstituida de dicha formulación liofilizada de ADN mediante inyección directa.

En ciertas realizaciones de la invención, el carbohidrato estaba presente en la formulación de ADN entre alrededor de 0,8 % y 2 %, y entre alrededor de 0,8 % y 1,5 %. En ciertas otras realizaciones, el carbohidrato de la formulación de ADN estaba presente en una cantidad de alrededor de 1,1 %.

En otras realizaciones más, la sal de la formulación de ADN estaba presente en una cantidad seleccionada del grupo consistente en alrededor de 0,8 % y 1,5 %, entre alrededor de 0,8 % y 1,2 % m/v. En ciertas otras realizaciones, el carbohidrato de la formulación de ADN estaba presente en una cantidad de alrededor de 0,9 % m/v.

En realizaciones particulares, el gen de HGF híbrido comprende HGF-X2 (SEC ID N°: 13), HGF-X3 (SEC ID N°: 14), HGF-X6 (SEC ID N°: 8), HGF-X7 (SEC ID N°: 9) o HGF-X8 (SEC ID N°: 10). En otras realizaciones más, el ADN plasmídico que comprende un gen de HGF híbrido se selecciona del grupo que consiste en: pCK-HGF-X2, pCK-HGF-X3, pCK-HGF-X6, pCK-HGF-X7, pCK-HGF-X8, pCP-HGF-X2, pCP-HGF-X3, pCP-HGF-X6, pCP-HGF-X7 y pCP-HGF-X8, en la que HGF-X2, HGF-X3, HGF-X6, HGF-X7 y HGF-X8 corresponden a los SEC ID N°s: 13-14 y 8-10, respectivamente.

Las formulaciones liofilizadas de ADN mantienen o aumentan la expresión del ADN plasmídico. En ciertos aspectos, la formulación liofilizada de ADN proporciona un aumento de la actividad biológica de la proteína expresada. En ciertos otros aspectos de la invención, la expresión aumentada del ADN plasmídico o la actividad biológica aumentada de la proteína expresada se deben a la presencia del carbohidrato en la formulación.

La invención también proporciona el uso de una formulación liofilizada reconstituida de ADN plasmídico, en la que el ADN liofilizado se reconstituye en una solución farmacéuticamente aceptable. En otras realizaciones más, la solución farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en agua, PBS, TE, tampón Tris y solución salina normal.

En otra realización, el ADN plasmídico de la formulación liofilizada reconstituida está a una concentración final de alrededor de 1 ng/ml, alrededor de 5 ng/ml, alrededor de 10 ng/ml, alrededor de 50 ng/ml, alrededor de 100 ng/ml, alrededor de 250 ng/ml, alrededor de 500 ng/ml, alrededor de 1 µg/ml, alrededor de 5 µg/ml, alrededor de 10 µg/ml, alrededor de 50 µg/ml, alrededor de 100 µg/ml, alrededor de 200 µg/ml, alrededor de 300 µg/ml, alrededor de 400 µg/ml, alrededor de 500 µg/ml, alrededor de 600 µg/ml, alrededor de 700 µg/ml, alrededor de 800 µg/ml, alrededor de 900 µg/ml, alrededor de 1 mg/ml, alrededor de 2 mg/ml, alrededor de 2,5 mg/ml, alrededor de 3 mg/ml, alrededor de 3,5 mg/ml, alrededor de 4 mg/ml, alrededor de 4,5 mg/ml, alrededor de 5 mg/ml, alrededor de 5,5 mg/ml, alrededor de 6 mg/ml, alrededor de 7 mg/ml, alrededor de 8 mg/ml, alrededor de 9 mg/ml, alrededor de 10 mg/ml, alrededor de 20 mg/ml, o alrededor de 30 mg/ml. En otra realización, la concentración final de ADN plasmídico de la formulación liofilizada reconstituida es desde alrededor de 1 ng/ml hasta alrededor de 30 mg/ml. En ciertos aspectos, la concentración final de ADN plasmídico de la formulación liofilizada reconstituida es desde alrededor de 100 µg/ml hasta alrededor de 2,5 mg/ml. En otros aspectos, la concentración final de ADN plasmídico de la formulación liofilizada reconstituida es desde alrededor de 500 µg/ml hasta alrededor de 1 mg/ml.

Se describe, además, un método de elaboración de una formulación liofilizada de ADN de HGF que comprende: (a) preparación de una formulación de ADN que comprende un ADN plasmídico, una sal y un carbohidrato, en la que el ADN plasmídico comprende un gen de HGF o variante del mismo; y (b) liofilización de la formulación de ADN.

Las etapas para la liofilización pueden incluir someter una formulación de ADN al proceso de congelación a temperaturas bajo cero (p. ej., de -10 °C a -50 °C) y después someterla a uno o más ciclos de deshidratación, que comprenden el calentamiento gradual de la formulación de ADN a una temperatura de alrededor de 20 °C hasta alrededor de menos o igual a 30 °C, en la que la liofilización se produce a lo largo de un periodo de alrededor de 50 hasta alrededor de 100 horas. Un método de preparación de la formulación liofilizada de ADN de uso en la presente invención puede comprender: (a) formación de una formulación acuosa de ADN que comprende el ADN plasmídico, la sal y el carbohidrato; (b) enfriamiento de la solución de la formulación de ADN a una temperatura de alrededor de -10 °C hasta alrededor de -50 °C, hasta la congelación; (c) deshidratación de la formulación de ADN mediante calentamiento a una temperatura de alrededor de 20 °C hasta alrededor de 30 °C; y (d) recuperación de una composición de formulación liofilizada de ADN que tiene un contenido de agua de desde alrededor de 0,1 de porcentaje en peso hasta alrededor de 5 de porcentaje en peso, sobre la base del peso total de la formulación recuperada de ADN.

La formulación liofilizada de ADN de uso en la invención puede prepararse en condiciones que comprenden (a) alrededor de 30 horas hasta alrededor de 50 horas a una temperatura mayor o igual a alrededor de -50 °C y menor que alrededor de 0 °C, y (b) alrededor de 20 horas hasta alrededor de 50 horas a una temperatura mayor o igual a alrededor de 0 °C hasta menor o igual a alrededor de 30 °C, progresivamente, en las que la menor temperatura (a) es de alrededor de -50 °C hasta alrededor de -30 °C y la mayor temperatura (b) está entre alrededor de 20 °C hasta alrededor de 30 °C. La formulación liofilizada de ADN de uso en la invención puede prepararse en condiciones de -50 °C durante 4 horas, -40 °C durante 12 horas, -30 °C durante 6 horas, -20 °C durante 6 horas, -10 °C durante 6 horas, 0 °C durante 6 horas, 10 °C durante 6 horas y 30 °C durante 24 horas, progresivamente. La formulación liofilizada de ADN de uso en la invención puede prepararse en condiciones de 5 °C durante 1 minuto, -50 °C durante 2 horas, -40 °C durante 6 horas, -35 °C durante 3 horas, -30 °C durante 6 horas, -25 °C durante 3 horas, -20 °C durante 3 horas, -15 °C durante 3 horas, -10 °C durante 6 horas, -5 °C durante 3 horas, 0 °C durante 6 horas, y 30 °C durante 17 horas, progresivamente. La formulación liofilizada de ADN de uso en la presente invención puede prepararse en condiciones de 5 °C durante 1 minuto, -10 °C durante 1 minuto, -20 °C durante 1 minuto, -30 °C durante 1 minuto, -50 °C durante 1 minuto, -50 °C durante 2 horas, -45 °C durante 6 horas, -40 °C durante 3 horas, -35 °C durante 6 horas, -30 °C durante 3 horas, -25 °C durante 6 horas, -20 °C durante 3 horas, -15 °C durante 6 horas, -10 °C durante 3 horas, -5 °C durante 6 horas, 0 °C durante 12 horas, 10 °C durante 3 horas, 20 °C durante 6 horas, y 30 °C durante 29 horas, progresivamente.

Breve descripción de los dibujos

Los aspectos y objetos anteriores y otros de la presente invención se harán aparentes a partir de la siguiente descripción de la invención, cuando se consideren junto con los dibujos acompañantes, en los que:

La fig. 1 representa un gráfico de barras en el que se compara la expresión *in vitro* de HGF entre diversas formulaciones. Los niveles de expresión de HGF se midieron usando ELISA en sobrenadantes de cultivo aislados de células 293T transfectadas con un ADN plasmídico liofilizado pCK-HGF-X7 formulado en NaCl al 0,9 % a una concentración final de ADN de 0,5 mg/ml, con sacarosa al 0,25 % (carril 3), 1,1 % (carril 4), 5 % (carril 5), 10 % (carril 6) o 20 % (carril 7), o con manitol al 1,2 % (carril 8), 4,85 % (carril 9) o 10 % (carril 10). Como comparación, se usaron reacciones de control con un control negativo (carril 1) y ADN no liofilizado (carril 2).

La fig. 2 representa un gráfico de barras en el que se compara la expresión *in vitro* de HGF entre pCK-HGF-X7 no liofilizado y liofilizado. Se inyectaron en ratones 100 µg de pCK-HGF-X7 no liofilizado que contenía NaCl al 0,9 % (NL-pCK-HGF-X7), o pCK-HGF-X7 liofilizado con sacarosa al 1,1 % y NaCl al 0,9 % (L-HGF-X7) en el tibial craneal. Se midieron altos niveles de expresión de HGF usando ELISA en lisados de tejido muscular, después de sacrificar a los ratones el día 7. Se muestran altos niveles de expresión de HGF para el control negativo (carril 1), pCK-HGF-X7 no liofilizado que contenía NaCl al 0,9 % (NL-HGF-X7; carril 2), y pCK-HGF-X7 liofilizado con sacarosa al 1,1 % y NaCl al 0,9 % (L-HGF-X7; carril 3).

La fig. 3 muestra un diagrama esquemático del procedimiento experimental, usando el modelo porcino de cardiopatía isquémica. NL-HGF-X7 corresponde a pCK-HGF-X7 no liofilizado que contenía NaCl al 0,9 %. L-HGF-X7 corresponde a pCK-HGF-X7 liofilizado con sacarosa al 1,1 % y NaCl al 0,9 %.

La fig. 4 representa un gráfico de barras que muestra el efecto de pCK-HGF-X7 no liofilizado y liofilizado sobre la perfusión miocárdica. Se muestra el porcentaje de mejoría de la perfusión miocárdica en comparación con los valores iniciales cuando se utiliza el modelo porcino de cardiopatía isquémica. Se muestran los resultados para cerdos a los que se inyectó plásmido solo (pCK, carril 1), pCK-HGF-X7 no liofilizado que contenía NaCl al 0,9 % (NL-HGF-X7; carril 2) y pCK-HGF-X7 liofilizado con sacarosa al 1,1 % y NaCl al 0,9 % (L-HGF-X7; carril 3).

La fig. 5 representa un gráfico de barras que muestra el efecto de pCK-HGF-X7 no liofilizado y liofilizado sobre el engrosamiento parietal. Se muestra el porcentaje de engrosamiento parietal en el área inyectada del margen isquémico del ventrículo izquierdo en comparación con los valores iniciales cuando se utiliza el modelo porcino de cardiopatía isquémica. Se muestran los resultados para cerdos a los que se inyectó plásmido solo (pCK, carril 1)

pCK-HGF-X7 no liofilizado que contenía NaCl al 0,9% (NL-HGF-X7; carril 2) y pCK-HGF-X7 liofilizado con sacarosa al 1,1 % y NaCl al 0,9 % (L-HGF-X7; carril 3).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

La expresión "ADN", o "ácido nucleico" o "fragmento de ácido nucleico" se refiere a cualquiera o a más segmentos de ácido nucleico, p. ej., fragmentos de ADN o ARN presentes en un polinucleótido o una construcción. Un ácido nucleico o fragmento del mismo puede proporcionarse en forma lineal (p. ej., ARNm) o circular (p. ej., plásmido), así como en forma de cadena doble o monocatenaria. Mediante ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se quiere decir una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha retirado de su entorno nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante contenido en un vector se considera aislado con el propósito de la presente invención. Otros ejemplos más de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterólogas o polinucleótidos purificados (parcialmente o sustancialmente) en solución. Las moléculas de ARN aislado incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de los polinucleótidos de la presente invención. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de acuerdo con la presente invención incluyen, además dichas moléculas producidas sintéticamente.

Tal como se usa en el presente documento, una "región codificante" es una porción de ácido nucleico que consiste en codones traducidos a aminoácidos. Aunque un "codón de terminación" (TAG, TGA, o TAA) no se traduce a un aminoácido, puede considerarse como parte de una región codificante, pero cualquiera de las secuencias adyacentes, por ejemplo, promotores, sitios de unión a ribosomas, terminadores de la transcripción, y similares, no son parte de una región codificante. Dos o más ácidos nucleicos o fragmentos de ácido nucleico de la presente invención pueden estar presentes en una única construcción de polinucleótido, p. ej., en un único plásmido, o en construcciones separadas de polinucleótido, p. ej., en plásmidos separados (diferentes). Además, cualquier ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico puede codificar un único polipéptido de HGF, fragmento, derivado o variante del mismo, p. ej., o puede codificar más de un polipéptido, p. ej., un ácido nucleico puede codificar dos o más polipéptidos. Además, un ácido nucleico puede incluir un elemento regulador, tal como un promotor, un sitio de unión a ribosoma o un terminador de la transcripción, o puede codificar regiones codificantes heterólogas, fusionadas a la región codificante de HGF, p. ej., elementos o porciones especializadas, tales como un péptido de señal secretora o un dominio funcional heterólogo.

En el caso del ADN, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido normalmente también comprende un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o la traducción asociados operativamente con el fragmento de ácido nucleico codificante del polipéptido. Una asociación operativa es cuando un fragmento de ácido nucleico que codifica un producto génico, p. ej., un polipéptido, está asociado con una o más secuencias reguladoras de modo que la expresión del producto génico se sitúa bajo la influencia o el control de la secuencias (o secuencias) reguladora.

Un polinucleótido de ADN puede ser un plásmido o un vector circular o linealizado, u otro ADN lineal que también puede ser no infeccioso y no integrativo (es decir, que no se integra en el genoma de las células de vertebrados) Un plásmido linealizado es un plásmido que previamente era circular pero se ha linealizado, por ejemplo, mediante digestión con una endonucleasa de restricción. Tal como se usa en el presente documento, los términos "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente.

La expresión "ADN liofilizado" se refiere a cualquier ADN que se prepara en forma seca mediante deshidratación y congelación rápida. "Liofilizar" o "liofilización" se refiere a un proceso de congelación y deshidratación de una solución. El ADN liofilizado listo para usar suele elaborarse mediante adición de agua destilada estéril.

Un "vector" se refiere a cualquier vehículo para la clonación y/o transferencia de un ácido nucleico al interior de una célula huésped. Un vector puede ser un replicón al que puede unirse otro segmento de ADN para producir la replicación del segmento ligado. 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, capaz de replicación bajo su propio control. El término "vector" incluye vehículos para introducir el ácido nucleico dentro de una célula *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Pueden usarse un gran número de vectores conocidos en la técnica para manipular ácidos nucleicos, incorporar elementos de respuesta y promotores a genes, etc. Posibles vectores incluyen, por ejemplo, plásmidos tales como derivados plasmídicos de 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 puede lograrse ligando los fragmentos de ADN apropiados en un vector elegido que tenga extremos complementarios cohesivos. Alternativamente, los extremos de las moléculas de ADN pueden modificarse enzimáticamente o puede producirse cualquier sitio ligando secuencias de nucleótidos (engarzadores) en los extremos del ADN. Dichos vectores pueden diseñarse para contener genes marcadores seleccionables que proporcionen la selección de las células. Dichos marcadores permiten la identificación y/o la selección de las células huésped que expresan las proteínas codificadas por el marcador.

Vectores adicionales incluyen lipoplejos (complejos catiónicos de liposoma-ADN), poliplexos (complejos catiónicos de polímero-ADN) y complejos de proteína-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 controlar los resultados de la transferencia de ácido nucleico (transferencia a qué tejidos, duración de la expresión, etc.)

El término "plásmido" se refiere a un elemento extracromosómico que suele portar un gen que no es parte del metabolismo principal de la célula, y normalmente en forma de moléculas de ADN circular de cadena doble. Dichos elementos pueden ser secuencias de replicación autónoma, secuencias integrativas en el genoma, fagos o secuencias de nucleótidos, ADN lineal, circular o superenrollado de un ADN de cadena doble o monocatenario procedente de cualquier fuente, en el que se han unido o recombinado varias secuencias de nucleótido en una única construcción que es capaz de introducir en una célula un fragmento de un promotor y una secuencia de ADN para un producto genético seleccionado junto con la secuencia 3' no traducible apropiada. Tal como se usa en el presente documento, el término "plásmido" se refiere a una construcción hecha de material genético (es decir, ácidos nucleicos). Típicamente, un plásmido contiene un origen de replicación que es funcional en las células huésped bacterianas, p. ej., *Escherichia coli*, y marcadores seleccionables para detectar las células huésped bacterianas que comprenden el plásmido.

Los plásmidos de uso en la presente invención pueden incluir elementos genéticos como se describe en el presente documento, dispuestos de modo que una secuencia codificante insertada puede transcribirse y traducirse en células eucariotas. En ciertas realizaciones descritas en el presente documento, un plásmido es una molécula de ADN circular cerrado.

El término "expresión" se refiere a la producción biológica de un producto codificado por una secuencia codificante. En la mayoría de los casos, una secuencia de ADN, que incluye la secuencia codificante, se transcribe para formar un ARN mensajero (ARNm). El ARN mensajero se traduce después para formar un producto polipeptídico que tiene una actividad biológica de interés. El proceso de expresión también puede implicar etapas de procesamiento posteriores del producto de ARN de la transcripción, tales como corte y empalme para eliminar intrones, y/o procesamiento postraduccional de un producto polipeptídico.

La expresión "vector de expresión" se refiere a un vector, plásmido o vehículo diseñado para posibilitar la expresión, después de la transformación, de una secuencia de ácido nucleico insertada en el huésped. El gen clonado, es decir, la secuencia de ácido nucleico insertado, p. ej., un gen de HGF o variante del mismo, suele estar situado bajo el control de elementos de control tales como un promotor, un promotor mínimo, un potenciador, o similar. Las regiones de control de la iniciación o promotores, que son útiles para dirigir la expresión de un ácido nucleico en la célula huésped deseada, son numerosas y familiares para los expertos en la técnica. Prácticamente, cualquier promotor capaz de dirigir la expresión de estos genes puede usarse en un vector de expresión, incluyendo, pero no limitándose a, promotores víricos, promotores bacterianos, promotores de animales, promotores de mamífero, promotores sintéticos, promotores constitutivos, promotores específicos de tejido, promotores relacionados con la patogenia o la enfermedad, promotores específicos del desarrollo, promotores inducibles, promotores regulados por la luz, que incluyen, pero no se limitan a, la región promotora temprana de SV40 (SV40), el promotor contenido en la repetición terminal larga (LTR, *long terminal repeat*) en 3' del virus del sarcoma de Rous (RSV), el promotor E1A o promotor principal tardío (MLP, *major late promoter*) de adenovirus (Ad), el promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMVH), el promotor de timidina cinasa (TK) del virus herpes simple (VHS), el promotor IE1 de baculovirus, el promotor del factor de elongación 1 alfa (FE1), el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), el promotor de la fosfoglicerato cinasa (PGK, *phosphoglycerate kinase*), el promotor de la ubiquitina C (Ubc), el promotor de albúmina, las secuencias reguladoras del promotor de la metalotioneína-L de ratón y las 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 el factor de tipo VIII y similares), promotores relacionados con la patogenia o la enfermedad, y promotores que muestran especificidad tisular y se han utilizado en animales transgénicos, tales como la región del 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 pancreáticas beta, la región de control del gen de inmunoglobulina, activa en células linfoides, región de control del virus del tumor mamario de ratón, activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos; el gen de la albúmina, las regiones de control Apo AI y Apo AII, activas en hígado, la región de control del gen de la alfa-fetoproteína, activa en hígado, la región de control de la antitripsina alfa 1, activa en el hígado, la región de control de beta globina, activa en células mieloides, la región de control del gen de la proteína básica de mielina, activa en células oligodendrocíticas del cerebro, la región de control de la cadena ligera 2 de miosina, activa en músculo esquelético, y la región de control de la hormona liberadora de gonadotropinas, activa en el hipotálamo, promotor de piruvato cinasa, promotor de vilina, promotor de la proteína intestinal de unión a ácido graso, promotor de la β -actina de músculo liso y similar. Además, estas secuencias de expresión pueden modificarse mediante la adición de secuencias potenciadoras o reguladoras y similares. Ejemplos no limitantes de vectores de expresión de la invención incluyen pCK (Lee y cols., Biochem. Biophys. Res. Commun. 272:230 (2000); documento WO 2000/040737) y pCP (pCDNA3.1, Invitrogen, USA).

Una "construcción" tal como se usa en el presente documento denota generalmente una composición que no aparece en la naturaleza. Una construcción puede producirse mediante tecnologías sintéticas, p. ej., técnicas sintéticas químicas o preparación y expresión de ADN recombinante para ácidos nucleicos o aminoácidos. Una construcción también puede producirse mediante la adición o asociación de un material con otro de modo que el resultado no se encuentra en la naturaleza en esa forma.

Un "gen" se refiere a un polinucleótido que comprende nucleótidos que codifican una molécula funcional, incluyendo moléculas funcionales producidas sólo mediante transcripción (p. ej., una especie bioactiva de ARN) o mediante transcripción y traducción (p. ej., un polipéptido). El término "gen" engloba 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 las secuencias reguladoras que preceden (secuencias no codificantes en 5') y siguen (secuencias no codificantes en 3') a la secuencia codificante. "Gen nativo" se refiere a un gen tal 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. En consecuencia, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que proceden de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificantes procedentes de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente a como se encuentran en la naturaleza. Un gen quimérico puede comprender secuencias codificantes procedentes de diferentes fuentes y/o secuencias reguladoras procedentes de diferentes fuentes. "Gen endógeno" se refiere a un gen nativo en su localización natural en el genoma de un organismo. Un gen "extraño" o "heterólogo" se refiere a un gen que no se encuentra normalmente en el organismo huésped, sino que se ha introducido dentro del organismo huésped mediante transferencia genética. Los genes extraños pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo o a genes quiméricos. Un "transgén" es un gen que se ha introducido dentro de la célula mediante un procedimiento de transferencia genética.

"ADN heterólogo" se refiere a ADN que no se localiza de forma natural en la célula o en un sitio cromosómico de la célula. El ADN heterólogo puede incluir un gen extraño a la célula.

Las frases "aislado" o "biológicamente puro" se refieren a material que está sustancialmente o esencialmente libre de los componentes que acompañan normalmente al material tal como se encuentra en su estado nativo. Por tanto, los péptidos aislados preferentemente no contienen materiales normalmente asociados con los péptidos en su entorno *in situ*.

Formulaciones liofilizadas de ADN

Como se describe en el presente documento, la estabilidad de una formulación liofilizada de ADN para utilizar como un agente diagnóstico o terapéutico puede aumentarse mediante la formulación del ADN antes de la liofilización con una solución acuosa que comprende una cantidad estabilizante de sacarosa.

La solución de carbohidrato antes de la liofilización puede corresponder a carbohidrato en agua sola o puede incluirse un tampón. Ejemplos de dichos tampones incluyen PBS, HEPES, TRIS o TRIS/EDTA. La solución de carbohidrato se combina con el ADN hasta una concentración final de entre 0,8% y 5%, preferentemente 1% a 5% de sacarosa, 1% a 3% sacarosa, y más preferentemente alrededor de 1,1% sacarosa.

Una sal de la formulación de ADN de la invención es NaCl. La sal de la formulación de ADN antes de la liofilización está en una cantidad de entre 0,5% y 2%, p. ej., entre alrededor de 0,8% y 1,5%, o entre alrededor 0,8% y 1,2% m/v. En ciertas otras realizaciones, la sal de la formulación de ADN está en una cantidad de alrededor de 0,9 % m/v.

Antes de la liofilización, la concentración de ADN en la formulación es desde 1 ng/ml a 30 mg/ml de plásmido. Por ejemplo, antes de la liofilización, una formulación de uso en la presente invención puede tener una concentración de alrededor de 1 ng/ml, alrededor de 5 ng/ml, alrededor de 10 ng/ml, alrededor de 50 ng/ml, alrededor de 100 ng/ml, alrededor de 200 ng, alrededor de 500 ng/ml, alrededor de 1 µg/ml, alrededor de 5 µg/ml, alrededor de 10 µg/ml, alrededor de 50 µg/ml, alrededor de 100 µg/ml, alrededor de 200 µg/ml, alrededor de 400 µg/ml, alrededor de 500 µg/ml, alrededor de 600 µg/ml, alrededor de 800 µg/ml, alrededor de 1 mg/ml, alrededor de 2 mg/ml, alrededor de 2,5 mg/ml, alrededor de 3 mg/ml, alrededor de 3,5 mg/ml, alrededor de 4 mg/ml, alrededor de 4,5 mg/ml, alrededor de 5 mg/ml, alrededor de 5,5 mg/ml, alrededor de 6 mg/ml, alrededor de 7 mg/ml, alrededor de 8 mg/ml, alrededor de 9 mg/ml, alrededor de 10 mg/ml, o alrededor de 20 mg/ml, del plásmido. En ciertas realizaciones de la invención, la concentración final de ADN es desde alrededor de 100 µg/ml hasta alrededor de 2,5 mg/ml. En realizaciones particulares de la invención, antes de la liofilización, la concentración de ADN es desde alrededor de 0,5 mg/ml hasta 1 mg/ml.

La formulación liofilizada de ADN de uso en la invención se prepara mediante liofilización en condiciones habituales conocidas en la técnica. Un método para preparar la formulación liofilizada de ADN de uso en la invención puede comprender (a) carga en un liofilizador de un envase, p. ej., un vial, con el ADN plasmídico, la sal, y el carbohidrato, en el que el liofilizador tiene una temperatura de inicio de alrededor de 5 °C hasta alrededor de -50 °C; (b) enfriamiento de la formulación de ADN a temperaturas bajo cero (p. ej., de -10 °C a -50 °C); y (c) deshidratación sustancial de la formulación de ADN. Un experto habitual en la técnica puede ajustar las condiciones de liofilización,

p. ej., temperatura y duración, teniendo en cuenta factores que influyen en los parámetros de liofilización, p. ej., el tipo de liofilizadora, la cantidad de ADN y el tamaño del envase que vaya a utilizarse.

El envase que contiene la formulación liofilizada de ADN puede sellarse después y conservarse durante un periodo de tiempo prolongado a diversas temperaturas (p. ej., temperatura ambiente hasta alrededor de -180 °C, preferentemente alrededor de 2-8 °C hasta alrededor de -80 °C, más preferentemente alrededor de -20 °C hasta alrededor de -80°C, y lo más preferentemente, alrededor de -20°C). En ciertos aspectos, las formulaciones liofilizadas de ADN son estables preferentemente dentro de un intervalo de desde alrededor de 2-8 °C hasta alrededor de -80 °C durante un periodo de al menos 6 meses sin perder una actividad significativa. La conservación estable de la formulación de ADN plasmídico también puede corresponder a conservación del ADN plasmídico en una forma estable durante largos periodos de tiempo antes de su uso, tal como para investigación o terapia a base de plásmidos. El tiempo de conservación puede ser de varios meses, 1 año, 5 años, 10 años, 15 años, de hasta 20 años. Preferentemente, la preparación es estable durante un periodo de al menos alrededor de 3 años.

ADN plasmídico de HGF

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) es una glicoproteína de unión a heparina, conocida también como factor de dispersión o hepatopoyetina A. Un gen endógeno que codifica el HGF humano está localizado en el cromosoma 7q21.1 y comprende 18 exones y 17 intrones que tienen la secuencia de nucleótidos SEC ID N°: 1 (Seki T., y cols., Gene 102:213-219 (1991)). Del gen se transcribe un transcrito de 6 kb y a partir de él se sintetiza después un polipéptido precursor de HGF que consiste en 728 aminoácidos (SEC ID N°: 2). Simultáneamente, también se sintetiza un polipéptido precursor de dHGF que consiste en 723 aminoácidos mediante un corte y empalme alternativo del gen de HGF. Los precursores biológicamente inactivos pueden convertirse a formas activas de heterodímero unido por puentes disulfuro mediante proteasa en el suero. En los heterodímeros, la cadena alfa que tiene un alto peso molecular forma cuatro dominios *kringle* y una horquilla N-terminal igual que una región peptídica preactivada de plasminógeno. Los dominios *kringle* de una estructura de bucle unida por puentes disulfuro triples que consiste en alrededor de 80 aminoácidos puede jugar un importante papel en la interacción proteína-proteína. La cadena beta de bajo peso molecular forma un dominio de serina similar a proteasa. El dHGF que consiste en 723 aminoácidos es un polipéptido con delección de cinco aminoácidos en el 1^{er} dominio *kringle* de la cadena alfa, es decir, F, L, P, S y S.

El HGF segregado por células procedentes de mesodermo tiene diversas funciones biológicas, p. ej., 1) inducción de una estructura tubular en las células epiteliales; 2) estimulación *in vivo* e *in vitro* de la vascularización a partir de células endoteliales; 3) regeneración del hígado y el riñón, debido a su actividad antiapoptótica; 4) organogénesis del riñón, los ovarios y los testículos; 5) control de la osteogénesis; 6) estimulación del crecimiento y la diferenciación de las células precursoras hematopoyéticas eritroides; y 7) brote axonal de las neuronas (Stella, M.C. y Comoglio, P.M., The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 31:1357-1362 (1999)). Sobre la base de estas diferentes funciones puede formularse HGF o un gen codificador de HGF o de una variante del mismo como agente terapéutico para tratar enfermedades isquémicas o hepáticas. En realidad, el HGF puede existir *in vivo*, bien como HGF, o bien como dHGF, y, por tanto, la coexpresión de HGF y dHGF es importante para aumentar al máximo el efecto terapéutico. Un gen de HGF híbrido que puede expresar simultáneamente HGF y dHGF con una alta eficiencia para terapia génica es una variante de HGF que podría ser ventajoso utilizar en la formulación de ADN plasmídico de uso en la presente invención.

El gen de HGF híbrido se ha descrito previamente en la solicitud de patente internacional N° WO 03/078568 y en la public. de Estados Unidos N°. 2005/0079581 A1. El gen de HGF híbrido se prepara mediante la inserción de un intrón inherente o extraño entre los exones 4 y 5 en el ADNc de HGF. El gen de HGF híbrido tiene una eficacia de expresión mayor que el ADNc de HGF y expresa simultáneamente dos heterotipos de HGF y HGFd (variante delecionada de HGF).

La expresión "isoforma de HGF" se refiere a cualquier polipéptido de HGF que tenga una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en un 80 % (p. ej., idéntica al menos en un 90 % o 95%) a una secuencia de aminoácidos de HGF que se produce naturalmente en un animal, incluyendo todas las variantes alélicas. El término se refiere a isoformas que se sabe que tienen actividad de proliferación celular. Las isoformas de HGF incluyen, sin limitación fHGF, dHGF, NK1, NK2, y NK4, p. ej., correspondientes a las SEC ID N°s: 2-6, y variantes de las mismas (p. ej., las variantes de NK2, SEC ID N°s: 11-12).

El término "fHGF" se refiere a la proteína completa de HGF de un animal, p. ej., un mamífero, p. ej., los aminoácidos 1-728 (SEC ID N°: 2) de HGF humano.

El término "dHGF" se refiere a la variante delecionada 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 en 723 aminoácidos (SEC ID N°: 3) con delección de cinco aminoácidos en el 1^{er} dominio *kringle* de la cadena alfa (F, L, P, S y S) de la secuencia completa de HGF.

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 la horquilla N-terminal y *kringle*.

5 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 la horquilla N-terminal, *kringle* 1 y *kringle* 2.

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 la horquilla N-terminal, *kringle* 1, *kringle* 2, *kringle* 3, y *kringle* 4.

10 La estructura y la función de HGF se han estudiado ampliamente y uno de los expertos en la técnica está al tanto de los aminoácidos de la secuencia de HGF que son importantes para retener sustancialmente toda la actividad biológica de la proteína y que preferentemente no se cambian o sólo se cambian de forma conservativa en cualquier secuencia variante de HGF. Véase, p. ej., Hartmann y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11574 (1992); Lokker y cols., EMBO J. 11:2503 (1992), Zhou y cols., Structure 6:109 (1998), Ultsch y cols., Structure 6:1383 (1998), Shimizu y cols., Biochem. Biophys. Res. Commun. 189:1329 (1992), Yoshiyama y cols., Biochem. Biophys. Res. Commun. 175:660 (1991). Por ejemplo, parece que los dominios de la horquilla N-terminal y *kringle* 1 se requieren para la actividad de proliferación celular. Otros aminoácidos que no son críticos para la actividad biológica pueden delecionarse y/o sustituirse más libremente. Uno de los expertos en la técnica puede preparar variantes de isoformas de HGF usando técnicas rutinarias de mutagénesis, tales como las que se describen en las referencias citadas anteriormente, e identificar variantes que retienen sustancialmente toda la actividad biológica de la isoforma de HGF.

Una realización del gen de HGF híbrido de la formulación liofilizada de ADN de uso en la presente invención que comprende el intrón inherente tiene 7113 pb de longitud y tiene la secuencia de nucleótidos SEC ID N°: 7.

25 Un gen de HGF híbrido puede comprender un fragmento de intrón inherente que, opcionalmente, tiene una pequeña secuencia recombinante insertada en el mismo entre los exones 4 y 5 del ADNc de HGF. En el presente documento, dicho gen de HGF híbrido que comprende un fragmento de intrón inherente se designa como "HGF-X". Ejemplos de genes HGF híbridos incluyen HGF-X2 (SEC ID N°: 13), HGF-X3 (SEC ID N°: 14), HGF-X6 (SEC ID N°: 8), HGF-X7 (SEC ID N°: 9) y HGF-X8 (SEC ID N°: 10).

30 Administración y métodos de tratamiento

35 El término "reconstituido" o "reconstitución" se refiere a la restauración de la forma original, p. ej., mediante rehidratación, de una sustancia previamente alterada para su conservación y almacenamiento, p. ej., la restauración a un estado líquido de una formulación de ADN plasmídico que ha sido deshidratada y almacenada. La composición liofilizada de uso en la presente invención puede reconstituirse en cualquier solución acuosa que produce una solución estable monodispersa adecuada para su administración. Dichas soluciones acuosas incluyen, pero no se limitan a: agua estéril, TE, PBS, tampón Tris o solución salina normal.

40 La concentración de la formulación liofilizada reconstituida de ADN de uso en la presente invención se ajusta dependiendo de muchos factores, incluyendo la cantidad a liberar de una formulación, la edad y el peso del sujeto, el método de liberación y la vía y la inmunogenicidad del antígeno que se libera.

45 La formulación liofilizada reconstituida de ADN de uso en la invención puede administrarse mediante inyección directa intramuscular, intraendocrítica, intramiocrítica, intrapericrítica, intraventricular, intraarticular, intradérmica, intracerebral, intrarrenal, intrahepática, intraesplénica, intralinfática, subcutánea, intraabdominal, intratesticular, intraovárica, intrauterina, esternal, intratraqueal, intrapleural, intratorácica, intradural, intrarraquídea, intramedular e intraparietal. En ciertas realizaciones, el método de liberación es por vía de inyección directa intramuscular, intramiocrítica, intracerebral o intrarrenal.

50 Debe entenderse que la dosis diaria típica de la formulación liofilizada reconstituida de uso en la presente invención debería determinarse teniendo en cuenta diversos factores de interés, incluyendo las condiciones para ser tratado, la vía de administración seleccionada, la edad, el género y el peso corporal del paciente individual, y la gravedad del síntoma del paciente, y puede administrarse en una dosis única o en dosis dividida. Por tanto, la dosis diaria no debe interpretarse en modo alguno como una limitación del alcance de la invención.

55 El término "tratar" o "tratamiento" de una enfermedad isquémica o hepática, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la administración a un sujeto de un factor, p. ej., un HGF, p. ej., un HGF híbrido, o variante de los mismos, en una cantidad suficiente para dar como resultado una mejoría de uno o más síntomas de la enfermedad isquémica o hepática, o evitar el avance de la enfermedad isquémica o hepática.

60 Una "enfermedad isquémica" se refiere a una enfermedad asociada con un aporte insuficiente de sangre a una parte del organismo (como el corazón o el cerebro) que se debe a la obstrucción de la afluencia de sangre arterial (como el estrechamiento de las arterias por espasmo o enfermedad). Ejemplos de enfermedades isquémicas incluyen la arteriopatía coronaria (AC) y la arteriopatía periférica (AP).

El término "enfermedad hepática" se aplica a muchas enfermedades y trastornos que ocasionan que el hígado funcione de forma inadecuada o deje de funcionar. HGF es un agente esencial en la inducción de la proliferación de los hepatocitos, y actúa en conjunto con el factor transformante del crecimiento alfa y el factor de crecimiento ligado a la heparina durante la regeneración del hígado. Adicionalmente, HGF mejora el daño hepático por medio de efectos antiapoptóticos en modelos animales de insuficiencia hepática fulminante, y atenúa la fibrosis hepática en animales con cirrosis hepática. En consecuencia, se considera que HGF no solo induce la regeneración del hígado, sino que también inhibe la progresión de la enfermedad y mejora la fibrosis hepática en pacientes que padecen enfermedades hepáticas intratables. Con respecto al tratamiento de la enfermedad hepática, la formulación liofilizada reconstituida de ADN de uso en la invención puede administrarse de acuerdo con los métodos de liberación expuestos anteriormente. En ciertas realizaciones, el método de liberación del tratamiento de la enfermedad hepática será la inyección intrahepática directa.

En ciertos aspectos de la invención, la formulación liofilizada reconstituida de ADN de uso en la invención puede comprender dos o más isoformas de HGF. Las isoformas de HGF pueden liofilizarse previamente por separado o en la misma formulación de ADN. Tras su reconstitución, estas dos isoformas pueden administrarse por separado o al mismo tiempo, es decir, coadministrarse; pueden administrarse o coadministrarse formulaciones reconstituidas separadas de ADN plasmídico de las dos o de más isoformas de HGF, o puede administrarse un único plásmido de expresión que contiene genes de dos o más isoformas de HGF y es capaz de expresar los genes de las dos o más isoformas de HGF. Por ejemplo, las dos isoformas fHGF y dHGF pueden administrarse usando dos plásmidos separados. Alternativamente, los dos plásmidos separados que contienen genes de fHGF y dHGF pueden usarse para su coadministración. Finalmente, puede administrarse un único plásmido de expresión que contiene genes tanto de fHGF como de dHGF. En ciertos aspectos de la invención, los fHGF y dHGF en un único plásmido de expresión están codificados por el mismo polinucleótido o por polinucleótidos separados.

Hay numerosos planteamientos para incluir más de un polinucleótido capaz de expresar una isoforma de HGF en un único plásmido. Estos incluyen, por ejemplo, el uso de secuencias del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, *Internal Ribosome Entry Site*), casetes dobles de promotor/expresión, y proteínas de fusión. Las dos o más isoformas expresadas a partir del mismo plásmido o en dos plásmidos separados, como se discute anteriormente, se seleccionan del grupo que consiste en fHGF, dHGF, NK1, NK2, y NK4 o se seleccionan del grupo que consiste en las SEC ID N^{as}: 2 a 6. Las dos o más isoformas también pueden incluir isoformas adicionales de HGF conocidas por alguien con experiencia habitual en la técnica.

En ciertos aspectos de la invención, el ADN plasmídico se administra a través de inyección intracelular directa y, más preferentemente, mediante el uso de una jeringa o un catéter. Se han usado catéteres para introducir genes recombinantes *in vivo* (véase, p. ej., E.G. Nabel, y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5157 (1992); E.G. Nabel, y cols., Science 249, 1285 (1990); E.G. Nabel, y cols., Science 244, 1342 (1989); E.G. Nabel, y cols., J. Clin. Invest. 91, 1822 (1993); G. Plautz, y cols., Circ. 83, 578 (1991); E.G. Nabel, y cols., Nature (1993) (en prensa)). La utilización de un catéter proporciona la capacidad de liberar el ADN plasmídico dentro de células que son de difícil acceso mediante el uso de una jeringa.

La administración del ADN plasmídico de la invención también puede lograrse mediante transferencia genética a las células diana *in situ*, para optimizar la posterior liberación de genes *in vivo*.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular (incluida la PCR), vacunología, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª Ed., Sambrook y cols., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); DNA Cloning, volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis y cols. Patente de Estados Unidos N^o: 4.683.195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); The treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, vols. 154 y 155 (Wu y cols. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, London, 1987); y en Ausubel y cols., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989).

Los siguientes ejemplos se dan a efectos de muestra solamente y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Preparación del plásmido

En el experimento se usó el plásmido pCK-HGF-X7 (documento WO 03/078568) que está diseñado para expresar la proteína del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).

Se transformaron *E. coli* (TOP10, Invitrogen, USA) con pCK-HGF-X7, y se aisló una colonia única. La colonia aislada se cultivó después en medio LB que contenía 30 µg/ml de kanamicina. El ADN plasmídico se purificó usando un *kit*

EndoFree plasmid Giga (Qiagen, EE. UU.), y se resuspendió en solución salina que contenía NaCl al 0,9% a una concentración final de ADN de 1,0 a 2,0 mg/ml.

Ejemplo 2: Liofilización

Se prepararon formulaciones de pCK-HGF-X7 en solución salina que contenía NaCl al 0,9% a una concentración final de ADN de 0,5 o 1 mg/ml, con sacarosa (0,25, 1,1, 5, 10 o 20 % m/v) o manitol (1,2, 4,85 o 10 % m/v). Las tablas A y B muestran el porcentaje de sacarosa y manitol, respectivamente, y las proporciones correspondientes de carbohidrato/ADN (m/m) para las formulaciones ensayadas de pCK-HGF-X7.

Tabla 1A Porcentaje de sacarosa

ADN (mg/ml)	Sacarosa (%)	Sacarosa (mg/ml)	Proporción de sacarosa a ADN (m/m)
0,5	0,25	2,5	5
0,5	1,1	11	22
0,5	5	50	100
0,5	10	100	200
0,5	20	200	400
1	0,25	2,5	2,5
1	1,1	11	11
1	5	50	50
1	10	100	100
1	20	200	200

Tabla 1B Porcentaje de manitol

ADN (mg/ml)	Manitol (%)	Manitol (mg/ml)	Proporción de manitol a ADN (m/m)
0,5	1,2	12	24
0,5	4,85	48,5	97
0,5	10	100	200
1	1,2	12	12
1	4,85	48,5	48,5
1	10	100	100

El ADN plasmídico suspendido se liofilizó después con Production-Master Freeze Dryer (C&H Cooling and Heating Systems, Corea). La temperatura se redujo a -50 °C durante 4 horas a 100 mTorr. Después, la temperatura se elevó hasta -40 °C durante 12 horas, -30 °C durante 6 horas, -20 °C durante 6 horas, -10 °C durante 6 horas, 0 °C durante 6 horas, 10 °C durante 6 horas, y 30 °C durante 24 h, progresivamente a 28~29 mTorr. El ADN plasmídico liofilizado se conservó a -20 °C hasta su análisis.

El ADN plasmídico suspendido se liofilizó también con Production-Master Freeze Dryer (C&H Cooling and Heating Systems, Corea). La temperatura se redujo a 5 °C durante 1 minuto y a -50 °C durante 2 horas a 100 mTorr. Después, la temperatura se elevó hasta -40 °C durante 6 horas, -35 °C durante 3 horas, -30 °C durante 6 horas, -25 °C durante 3 horas, -20 °C durante 3 horas, -15 °C durante 3 horas, -10 °C durante 6 horas, -5 °C durante 3 horas, 0 °C durante 6 horas, y 30 °C durante 17 horas, progresivamente a 28~29 mTorr. El ADN plasmídico liofilizado se conservó a -20 °C hasta su análisis.

El ADN plasmídico suspendido se liofilizó también con Production-Master Freeze Dryer (C&H Cooling and Heating Systems, Corea). La temperatura se redujo a 5 °C durante 1 minuto, -10 °C durante 1 minuto, -20 °C durante 1 minuto, -30 °C durante 1 minuto, and -50 °C durante 1 minuto a 150 mTorr. La temperatura se mantuvo a -50 °C durante otras 2 horas a 150 mTorr. Después, la temperatura se elevó hasta -45 °C durante 6 horas, -40 °C durante 3 horas, -35 °C durante 6 horas, -30 °C durante 3 horas, -25 °C durante 6 horas, -20 °C durante 3 horas, -15 °C durante 6 horas, -10 °C durante 3 horas, -5 °C durante 3 horas, 0 °C durante 12 horas, 10 °C durante 3 horas, -20 °C

durante 6 horas y 30 °C durante 29 horas, progresivamente a 30 mTorr. El ADN plasmídico liofilizado se conservó a -20 °C hasta su análisis.

La eficacia *in vitro* de la expresión génica de las formulaciones liofilizadas preparadas anteriormente se analizó de acuerdo con los métodos descritos en el ejemplo 3. Los resultados *in vitro* para estas preparaciones fueron los mismos.

Ejemplo 3: Efectos de la liofilización sobre la eficacia *in vitro* de la expresión génica del ADN plasmídico.

1. Materiales y métodos

Para evaluar los efectos de la liofilización sobre la eficacia de la expresión génica del ADN plasmídico, el ADN plasmídico liofilizado se transfectó a células 293T, y se midió el nivel de expresión de HGF. Como control, también se transfectó ADN plasmídico no liofilizado.

Se transfectaron cuatro microgramos de pCK-HGF-X7 en diversas formulaciones (como se indica anteriormente, en el ejemplo 1) a 1×10^6 células 293T, usando FuGENE6 (Roche Diagnostics, Alemania) (n= 5). Antes de la transfección, 1 mg del ADN plasmídico liofilizado se reconstituyó con 2 ml de agua para inyección hasta una concentración final de 0,5 mg/ml.

Dos días después de la transfección, se obtuvieron los sobrenadantes del cultivo y se analizó la expresión de HGF usando un *kit* de ELISA para HGF humano (R&D Systems, MN, EE.UU.), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los resultados del ELISA se evaluaron estadísticamente mediante la prueba de comparación múltiple de Dunnett, usando el programa SPSS (versión 13.0, SPSS Inc. EE.UU.).

2. Resultados y discusión

Los resultados de la expresión del gen de HGF se proporcionan en la fig. 1. Al contrario que en publicaciones previas, la liofilización no afectó a la eficacia *in vitro* de la expresión génica del ADN plasmídico. Entre diversas formulaciones, el nivel de HGF del pCK-HGF-X7 liofilizado con sacarosa al 1,1% y NaCl al 0,9% fue significativamente mayor que el del pCK-HGF-X7 no liofilizado ($p = 0,001$) (fig. 1).

Estos resultados indican que la formulación de liofilización que contiene sacarosa al 1,1% y NaCl al 0,9% sería más adecuada para el pCK-HGF-X7 que una formulación no liofilizada.

Ejemplo 4: Análisis comparativo de la expresión génica *in vitro* entre pCK-HGF-X7 no liofilizado y liofilizado.

1. Materiales y métodos

Se obtuvieron trece ratones BALB/c (machos, Charles River) para cada grupo y se les proporcionó agua y alimento a voluntad. Se permitió descansar a los animales durante 7 días antes de someterlos al experimento.

Se inyectaron a los ratones 100 µg de pCK-HGF-X7 no liofilizado que contenía NaCl al 0,9% (NL-pCK-HGF-X7), o pCK-HGF-X7 liofilizado con sacarosa al 1,1 % y NaCl al 0,9 % (L-HGF-X7) en el tibial craneal y se les sacrificó en el día 7 después del tratamiento. El ADN plasmídico liofilizado se reconstituyó con agua hasta una concentración final de 0,5 mg/ml antes de la inyección. Para medir el nivel de expresión de la proteína HGF, se recogieron los músculos inyectados y se lisó el tejido muscular con 500 µl de tampón de lisis (NaCl 50 mM, dodecilsulfato sódico al 0,2 %, desoxicolato sódico al 0,5 %, IGEPAL CA-630 al 2 %, Tris-HCl 25 mM a pH 7,4, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM) durante 16 horas a 4 °C. Los lisados se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos, y los sobrenadantes se recogieron y se analizó la expresión de HGF usando un *kit* de ELISA para HGF humano (R&D Systems).

Los resultados del ELISA se evaluaron estadísticamente mediante análisis simple de la varianza (*one way ANOVA*) y posterior prueba de Tukey, usando el programa SPSS (versión 13.0).

2. Resultados y discusión

Se produjo un promedio de 246 ng/ml de proteína HGF a partir de los animales a los que se administró pCK-HGF-X7 liofilizado con sacarosa al 1,1 % y NaCl al 0,9 % (L-HGF-X7), mientras que los animales a los que se administró pCK-HGF-X7 expresaron 76 ng/ml de HGF (fig. 2). Este resultado indica que el pCK-HGF-X7 liofilizado con sacarosa al 1,1 % y NaCl al 0,9 % puede expresar HGF más eficazmente que el pCK-HGF-X7 no liofilizado ($p < 0,001$).

Ejemplo 5: Análisis comparativo de los efectos terapéuticos en el modelo porcino de cardiopatía isquémica entre pCK-HGF-X7 no liofilizado y liofilizado

1. Materiales y métodos

(1) Animales

Se obtuvieron once cerdos Yorkshire (machos, de 28 a 30 kg. Instituto de Investigación Clínica, del Hospital Universitario Nacional de Seúl) y se les proporcionó agua y alimento dos veces al día a voluntad. Se permitió descansar a los cerdos durante 7 días antes de someterlos al experimento. El diseño experimental completo se muestra en la fig. 3.

(2) Establecimiento del modelo porcino de cardiopatía isquémica

Se inyectaron a cada cerdo Xilacina (2 mg/kg), ketamina (20 mg/kg), y atropina (0,05 mg/kg) por vía intramuscular. Veinte minutos más tarde, se insertó una vía Medicut del calibre 22 en la arteria femoral superficial para el control continuo de la tensión arterial. Se inyectó tiopental sódico (10 mg/ml) por vía intravenosa, y la intubación endotraqueal se realizó por vía orotraqueal. La anestesia se mantuvo mediante inhalación de enflurano. Durante la operación, se mantuvieron una presión de ventilación positiva y una fracción de oxígeno de 30 % ~ 40 %. Los electrocardiogramas, la saturación de oxígeno y la tensión arterial se controlaron continuamente.

Después, se realizó una toracotomía izquierda. Tras la apertura del pericardio, seguida de la exploración de la arteria coronaria anterior izquierda descendente (AID), se inyectó lidocaína al 2% (1 mg/kg) por vía intravenosa y el tercio distal de la AID se ligó durante 3 minutos dejando la segunda ramificación diagonal tanto como fue posible. Se realizó una perfusión (preacondicionamiento isquémico) durante 5 minutos, usando suturas de polipropileno 5-0 reforzadas con un trozo pequeño de Nelaton (4 Fr). Después de este único preacondicionamiento isquémico, se ligó la AID distal y se confirmó la depresión o elevación del segmento ST en el electrocardiograma controlado. Se inyectó lidocaína adicional (1 mg/kg) por vía intravenosa 15 minutos después del ligamiento, y se cerraron las heridas del pericardio y la toracotomía. Se retiró una única sonda pleural de 28 Fr conectada a la succionador de pared. Inmediatamente después de que retornase suficientemente la respiración espontánea, a lo que siguió la retirada del tubo endotraqueal.

Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité para el Cuidado y el Uso de Animales de la Universidad Nacional de Seúl.

(3) Inyección intramiocárdica de los plásmidos

Veintiocho días después del ligamiento de la arteria coronaria, se realizó una nueva toracotomía. Mediante el uso de agujas de inyección para insulina del calibre 27, se inyectó una dosis total de 1 mb de pCK-HGF-X7 liofilizado con sacarosa al 1,1% y NaCl al 0,9 % (L-HGF-X7, n= 3) o pCK-HGF-X7 no liofilizado, que contenía NaCl al 0,9 % (NL-HGF-X7, n= 4) en el margen de la zona isquémica anterolateral, que se encuentra entre el área del infarto fibrótico y el miocardio macroscópicamente normal, a lo largo del curso de la segunda ramificación diagonal. Se inyectaron un total de cinco sitios. En cada sitio se inyectaron 0,2 mg de ADN plasmídico y el intervalo entre sitios de inyección fue de 1,5 cm. El ADN plasmídico liofilizado se reconstituyó con agua hasta la concentración final de 1 mg/ml antes de la inyección. Como control, se inyectó la cantidad idéntica de pCK no liofilizado que contenía NaCl al 0,9 % (n= 4) en el margen de la zona isquémica anterolateral. Los puntos de inyección se marcaron con etiquetas de sutura utilizando anillos de metal.

(4) Tomografía computarizada miocárdica de emisión monofotónica

Veintiséis días después de la inducción quirúrgica del infarto de miocardio, se realizó una tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT, *single photon emission computed tomography*) seleccionada con ^{99m}Tc- MIBI (Vertex EPIC, ADAC Labs, CA., EE. UU.) para establecer unos valores iniciales antes de la inyección del plásmido. La SPECT regulada se repitió 28 días más tarde (el día 54 después de la inducción del infarto de miocardio).

Se eligió un modelo de 20 segmentos para el análisis segmentario. Seis segmentos correspondientes a la base cardíaca se excluyeron del análisis porque la atenuación diafragmática o algunos artefactos alrededor del corazón podrían influir fácilmente sobre esta región; también porque la base del corazón estaba lejos de los sitios del ligamiento coronario distal y de la inyección del plásmido.

Las imágenes de la SPECT construidas mediante electrocardiograma seleccionado se analizaron mediante un programa de autocuantificación (AutoQUANT, ADAC Labs, CA., EE.UU.), que se cree que elimina el posible sesgo asociado a cualquier manipulación del técnico.

La cantidad de perfusión segmentaria se cuantificó mediante la medición de la captación de ^{99m}Tc-MIBI, y se calculó como un porcentaje de la captación máxima. Cuando la perfusión segmentaria así estimada fue inferior al 70 %, se definió como un segmento hipoperfundido y se usó como la diana de la liberación del plásmido. Los segmentos que siguieron bien perfundidos después del ligamiento coronario también se excluyeron, ya que, probablemente, no obtendrían beneficio de la angiogénesis terapéutica. El engrosamiento parietal en la fase sistólica se indicó como un porcentaje del engrosamiento diastólico final en las imágenes seleccionadas.

(5) Estadística

Los datos se presentan como el porcentaje de mejoría comparado con los valores iniciales. Todos los datos se analizaron usando SPSS (versión 13.0). El análisis estadístico de la perfusión miocárdica y el engrosamiento parietal segmentario se realizó usando la prueba de la t de Student de muestras emparejadas.

2. Resultados

Dentro de cada grupo de tratamiento se compararon los cambios en la perfusión segmentaria antes y después de la inyección de ADN plasmídico. Los valores iniciales para el promedio de perfusión segmentaria medidos en el día 26 después del ligamiento de la AID fueron $39,0 \pm 14,6$, $43,4 \pm 13,4$ y $36,9 \pm 16,3$ % para los grupos de tratamiento con pCK, NL-HGF-X7 y L-HGF-X7 respectivamente. La SPECT seleccionada con ^{99m}Tc -MIBI, efectuada el día 54 mostró que los valores promedio de la perfusión segmentaria en los grupos de pCK y NL-HGF-X7 fueron $37,8 \pm 13,9$ % y $44,0 \pm 14,5$ %, respectivamente, los cuales no fueron significativamente diferentes de los valores iniciales medidos el día 26 ($p = 0,320$ para pCK y $0,721$ para NL-HGF-X7). Por el contrario, el valor promedio de la perfusión segmentaria en el grupo de tratamiento de L-HGF-X7 fue de $41,2 \pm 17,6$ %, mostrando un incremento significativo por encima del valor inicial ($p = 0,003$). Cuando se comparó entre grupos la magnitud del porcentaje de incremento en la perfusión segmentaria con respecto al valor inicial, el porcentaje de incremento de la perfusión segmentaria en el grupo de tratamiento de L-HGF-X7 fue $14,74$ % mayor que el del grupo de tratamiento de pCK ($p = 0,003$), mientras que el grupo de tratamiento de NL-HGF-X7 no mostró diferencia significativa con el grupo de tratamiento de pCK ($p = 0,254$) (fig. 4).

Dentro de cada grupo de tratamiento se compararon los cambios en el engrosamiento parietal antes y después de la administración del ADN. El día 26, los valores promedio del engrosamiento parietal fueron $24,7 \pm 16,5$, $33,4 \pm 15,9$ y $16,5 \pm 15,9$ % para los grupos tratados con pCK, NL-HGF-X7 y L-HGF-X7, respectivamente, y no hubo diferencias significativas entre grupos ($p = \text{N.S.}$). El día 54, el valor promedio del engrosamiento parietal para los grupos de tratamiento de pCK, NL-HGF-X7 y L-HGF-X7 fue $27,9 \pm 18,4$, $43,1 \pm 11,8$, y $30,2 \pm 10,7$ %, respectivamente. Cuando la magnitud del porcentaje de incremento del engrosamiento parietal segmentario a partir del valor inicial se comparó entre los grupos de tratamiento, el porcentaje de incremento en el grupo de tratamiento de L-HGF-X7 fue de $83,54$ %, lo que fue significativamente mayor que el del grupo de NL-HGF-X7 ($28,99$ %) (fig. 5).

Estos resultados indican que la administración intramiocárdica de la formulación liofilizada (L-HGF-X7) puede incrementar de forma más eficaz el flujo sanguíneo regional y el engrosamiento parietal en el área inyectada del margen isquémico del ventrículo izquierdo, en comparación con la formulación no liofilizada (NL-HGF-X7). Sin el deseo que quedar limitado a la teoría, esto se debe, probablemente, a las actividades angiogénica y antifibrótica del HGF-X7 expresado.

3. Sumario

La perfusión segmentaria y el engrosamiento parietal se incrementaron significativamente en el grupo tratado con pCK-HGF-X7 liofilizado, en comparación con los grupos tratados con pCK y pCK-HGF-X7 no liofilizados.

Estos resultados demuestran que la administración intramiocárdica de pCK-HGF-X7 liofilizado con sacarosa al $1,1$ % y NaCl al $0,9$ % a los cerdos afectados podía incrementar de forma eficaz y estable la perfusión regional y el engrosamiento parietal en el miocardio isquémico en comparación con pCK-HGF-X7 no liofilizado.

Aunque la invención se ha descrito con respecto a las realizaciones específicas anteriores, debe reconocerse que pueden hacerse diversas modificaciones y cambios en la invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

<110> VIROMED CO., LTD.

Formulaciones liofilizadas de ADN para el aumento de la expresión del ADN plasmídico

<130> PCA810080VML

<150> US 61/043.605

<151> 09-04-2008

<160> 14

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 2187

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

ES 2 556 711 T3

<400> 1

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcctctcctc	60
ctgtccccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat	120
gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaatag atccagcact gaagataaaa	180
accaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt	240
ccattcactt gcaaggcitt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc	300
ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa	360
aacaaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctacaa gggacagta	420
tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccttggagtt ccatgatacc acacgaacac	480
agctttttgc ctctgagcta tcggggtaaa gacctacagg aaaactactg tcgaaatcct	540
cgaggggaag aagggggacc ctgggtgttc acaagcaatc cagaggtagc ctacgaagtc	600
tgtgacattc ctacagtgtc agaagttgaa tgcattgacct gcaatgggga gagttatcga	660
ggctcatggt atcatacaga atcaggcaag atttgtcagc gctgggatca tcagacacca	720
caccggcaca aattcttggc tgaaagatat cccgacaagg gctttgatga taattattgc	780
cgcaatcccg atggccagcc gagggcatgg tgcatactc ttgacctca caccgctgg	840
gagtactgtg caattaaaac atgcgctgac aatactatga atgacactga tgttcctttg	900
gaaacaactg aatgcatcca aggtcaagga gaaggctaca ggggcactgt caataccatt	960
tggaatggaa ttccatgtca gcgttgggat tctcagtatc ctacagagca tgacatgact	1020
cctgaaaatt tcaagtgcaa ggacctacga gaaaattact gccgaaatcc agatgggtct	1080
gaatcacctt ggtgttttac cactgatcca aacatccgag ttggcta ² ctg ctcccaaatt	1140
ccaaactgtg atatgtcaca tggacaagat tgttatcgtg ggaatggcaa aaattatatg	1200
ggcaacttat cccaaacaag atctggacta acatgttcaa tgtgggacaa gaacatggaa	1260
gacttacatc gtcatactt ctgggaacca gatgcaagta agctgaatga gaattactgc	1320
cgaaatccag atgatgatgc tcatggaccc tgggtgtaca cgggaaatcc actcattcct	1380
tgggattatt gccctatttc tcgttgtgaa ggtgatacca cacctacaat agtcaattta	1440
gaccatcccg taatacttg tgcacaaacg aaacaattgc gagttgtaaa tgggattcca	1500
acacgaacaa acataggatg gatggttagt ttgagataga gaaataaaca tatctgcgga	1560
ggatcattga taaaggagag ttgggttctt actgcacgac agtgtttccc ttctcgagac	1620
ttgaaagatt atgaagcttg gcttgggaatt catgatgtcc acggaagagg agatgagaaa	1680
tgcaaacagg ttctcaatgt ttcccagctg gtatatggcc ctgaaggatc agatctggtt	1740
ttaatgaagc ttgccaggcc tgcgtcctg gatgattttg ttagtacgat tgatttacct	1800
aattatggat gcacaattcc tgaaaagacc agttgcagtg ttataggctg gggctacact	1860
ggattgatca actatgatgg cctattacga gtggcacatc tctatataat gggaaatgag	1920
aatgcagcc agcatcatcg agggaagggt actctgaatg agtctgaaat atgtgctggg	1980
gctgaaaaga ttggatcagg accatgtgag ggggattatg gtggccact tgtttgtgag	2040
caacataaaa tgagaatggt tcttgggtgc attgttctg gtcgtggatg tgccattcca	2100
aatcgtcctg gtatttttgt ccgagtagca tattatgcaa aatggataga caaaattatt	2160
ttaacatata aggtaccaca gtcatag	2187

ES 2 556 711 T3

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

5

<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
          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 2 556 711 T3

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	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				
						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 2 556 711 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>

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 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 Ala Asp Asn Thr Met
 275 280 285

ES 2 556 711 T3

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 Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr
 435 440 445
 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

ES 2 556 711 T3

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

5
<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 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

10
15
<210> 5
<211> 290
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 5

ES 2 556 711 T3

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
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

ES 2 556 711 T3

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 2 556 711 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	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> Secuencia artificial

<220
 <223> Híbrido sintético del factor de crecimiento de hepatocitos

ES 2 556 711 T3

<400> 7

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcattcctc	60
ctgtcccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat	120
gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa	180
acaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt	240
ccattcactt gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc	300
ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa	360
aacaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctacaa gggaaacagta	420
tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac	480
aggtagaac agtatgaaga aaagagatga agcctctgtc ttttttacct gttaacagtc	540
tcatattagt ccttcagaat aattctacaa tcctaaaata acttagccaa ctgtctgaat	600
tgtattacgg caaggtttat atgaattcat gactgatatt tagcaaatga ttaatttaata	660
tgttaataaa atgtagccaa aacaatatct taccttaatg cctcaatttg tagatctcgg	720
tatttgtgaa ataataacgt aaacttcgtt taaaaggatt ctctctcctg tctttgagaa	780
agtacggcac tgtgcagggg gagaggttga ttgtgaaaa tcagaggtag atgagaatct	840
tactgagggc tgagggttct ttaaccttgg tggatctcaa catttggtgc acattaaaat	900
cacctgtctg aagcccttga cgaatcttac ttagaagatg acaacacaga acaattaaat	960
cagaatctct ggggagaata gggcaccagt attttttgag ctcccacat gattccaaag	1020
tgcagccaaa ttlgagaacc actgctaaaa gctcaagctt cagattgacc agcttttcca	1080
tctcacctat gcgctaaga ccaaattgga taaatgtgtt cattacgaca gatgggtact	1140
atttaaagat gagtaaacac aataactta ggctcgtcag actgagagtt ttaatcatca	1200
ctgagggaaa acatagatat ctaatactga ctggagtatt agtcaaggct tatttcacac	1260
acaattttat cagaaaccaa agtagtttaa aacagctctc ccttattag taatgcattg	1320
gagggtttac ttaccatgt accttgctga gcactgtacc 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 gtgatttgtt ttgacagtgg tggatgatgac	1620
tgccttgttg aatccacttt ttattctatt ccattttggg gacacaattc tgcaagatga	1680
ttcttcatfa ggaacagag atgagttatt gaccaacaca gaaagaaaa gagtttgttg	1740
ctccacactg ggattaaacc tatgatcttg gcctaattaa cactagctag taagtgtcca	1800
agctgatcat ctctacaaca tttaataac agaaaacaac aattttcaaa attagttaact	1860
tacaattatg tagaaatgcc tctaaaacac agtattttcc ttataattaca aaaacaaaaa	1920
ttataattgg ttttgtctc ttttgagagt ttgatgggtg ttactccctg catagtgaag	1980
aaaacatttt atttaagtag atggatctaa gtttttcatg aacaaaggaa tgacatttga	2040
aatcaatcct accctagtcc aggagaatgc attagattaa cctagtagag gtcttatttc	2100
accttgagtt ttctatgatc gtgattctct gctggaggag taattgtgaa atagatctct	2160

ctgggaactg gcttcctagt ccaatcagct cttttaccaa tgaacacttc cttgtgatat	2220
agatgtttat ggccgagagg atccagtata ttaataaaat cccittttgt attcaatgag	2280
ggaaacacat aattttcatt aattagcagc ttatttgaat atctgcatga tggtttaaca	2340
cttttaagt ttgactaaag attaatftta cagaaaatag aaaaagaaat atgtttctgt	2400
ctggaggaat gattttattgt tgacccttaa attgaaatat ttacttagtg gcttaatgga	2460
aagatgatga aagatgatga aattaatgta gaagcttaac tagaaaatca ggtgacctga	2520
tatctacatc tgtatccttc attggccacc cagcattcat taatgaatca gatgatgga	2580
tagatcaagt ttcttaggaa cacagtgaat attaaaagaa aacaaggga gcctagacc	2640
tagaagacct agtttataat tcaaagtata ttggatgta acccaatttt aaacatttcc	2700
tcacttgtct ctcttaaagc ctggccaaca gcaaggacag agaaccaaaa atagtgtata	2760
tatgaataaa tgcattttac agaattctgt gactggcaca tgcitttgtgt gtaatgggtt	2820
ctcataaaca cttgttgaat gaacacacat aagtgaagaa gcatggctag gcttcatccc	2880
ttggicaaat atggggtgct aaagaaaagc aggggaaata cattgggaca ctaacaaaaa	2940
aaaacagtta atttaggtaa aagataaaat acaccacaga atgaagaaaa gagatgaccc	3000
agactgctct ttaaccttca tgccttagag aggtttttga tatgaattgc attcagaatt	3060
gtggaaagga gcccatcttt tctcttcatt ttgattttat taactccaat gggggaattt	3120
tattcgtgtt ttggccatat ctacttttga ttctacatt attctctctt cctttctacc	3180
tgtatttgc ctaataaatt gttgacttat taattcacta ctctctcaca gctttttttt	3240
ggctttacaa atccactgga aaggtatatg ggtgtatcac ttgtgtatt tcggtgtgca	3300
tgtgtagagg ggacaaaaat cctctctcaa actataaata ttgagtattt gtgtattgaa	3360
catttgctat aactactagg ttctttaaat aatcttaata tataaaatga tatagaaaaa	3420
gggaaattat agttcgtatt attcatctaa gtgaagagat taaaaccag ggagtaata	3480
aattgtctaa ggactaaggt tgtatactat ttaggtgata gatatggggc aaccgtatgg	3540
gttttatgat taacaaataa acttctcacc actctacat atcaactttt ccataaaaga	3600
gagctatagt attctttgct taaataaatt tgattagtgc atgacttctt gaaaacatat	3660
aaagcaaaag tcacatttga ttctatcaga aaagttagta agccatggcc caaacaaaag	3720
atgcattaaa atattctgga atgatggagc taaaagtaag aaaaatgact ttttaaaaaa	3780
gtttactgtt aggaattgtg aaattatgct gaattttagt tgcattataa tttttgtcag	3840
tcatacggtc tgacaacctg tcttatttct atttcccat atgaggaatg ctagttaagt	3900
atggatatta actattacta cttagatgca ttgaagttgc ataataatga taatacttca	3960
ctggttccct gaaaatgttt agttagtaat aagtctctta cactatttgt ttgtccaat	4020
aatttatatt ttctgaagac ttaactctag aatacactca tgtcaaaatg aaagaatttc	4080
attgcaaaat attgcttggc acatgacgca tacctgtatt tgttttgtgt cacaacatga	4140
aaaatgatgg ttattatgaa gtttcattgg gtaggaaaca catttgaatg gtatttacta	4200
agatactaaa atccttggac ttactcttaa ttttagtgcc atttagaact caaggtctca	4260
gtaaaagtag aaataaagcc tgttaacaaa acacaagctg aatattaaaa atgtaactgg	4320
atttcaaaag aaatgtttac tggatttacc tgtagaatga tattctttat tatgatcttt	4380

tgtgtaaagt ctggcagaca aatgcaatat ctaattgttg agtccaatat cacaagcagt	4440
acaaaaglat aaaaaagact tggccttttc taatgtgtta aaatacttta tgctggtaat	4500
aacactaaga gtagggcact agaaatttta agtgaagata atgtgttgca gttactgcac	4560
tcaatggctt actattataa accaaaactg ggatcactaa gctccagtca gtcaaaatga	4620
tcaaaattat tgaagagaat aagcaattct gttctttatt aggacacagt agatacagac	4680
tacaaagtgg agtgtgctta ataagaggta gcatttgta agtgtcaatt actctattat	4740
cccttggagc ttctcaaaat aaccatataa ggtgttaagt gttaaaggtt atggttacac	4800
tcagtgcaca ggtaagctaa taggctgaga gaagctaaat tacttactgg ggtctcacag	4860
taagaaagtg agctgaagtt tcagcccaga tttactgga ttctgggctc ttatttcatg	4920
ttacttcatg aatctgtttc tcaattgtgc agaaaaagg gggctattta taagaaaagc	4980
aataacaaa caagtaatga tctcaataa gtaatgcaag aaatagtga atttcaaat	5040
cagtggcagc gatttctcag ttctgtccta agtggccttg ctcaatcacc tgctatcttt	5100
tagtggagct ttgaaattat gtttcagaca acttcgattc agttctagaa tgtttgactc	5160
agcaaatca caggctcacc ttcttaactt gatggigaat atggaaattc agctaaatgg	5220
atgtaataa aattcaaacg ttttaaggac agatgaaaat gacagaattt taaggtaaaa	5280
tatatgaagg aatataagat aaaggatttt tctaccttca gcaaaaacat acccactaat	5340
tagtaaaatt aataggcaaa aaaaagttgc atgctcttat actgtaatga ttatcatttt	5400
aaaactagct tttgccttc gagctatcgg ggtaaagacc tacaggaaaa ctactgtcga	5460
aatcctcgag gggaagaagg gggaccctgg tgtttcaca gcaatccaga ggtacgctac	5520
gaagictgtg acattcctca gtgttcagaa gttgaatgca tgacctgcaa tggggagagt	5580
tatcgaggtc tcatggatca tacagaatca ggcaagattt gtcagcgtg ggatcatcag	5640
acaccacacc ggcacaaatt ctgtcctgaa agatatcccg acaagggctt tgatgataat	5700
tattgccgca atcccgatgg ccagccgagg ccatgggtgt atactcttga ccctcacacc	5760
cgctgggagt actgtgcaat taaaacatgc gctgacaata ctatgaatga cactgatgtt	5820
ccitttgaaa caactgaatg catccaaggt caaggagaag gctacagggg cactgtcaat	5880
accatttggg atggaattcc atgtcagcgt tgggattctc agtatcctca cgagcatgac	5940
atgactcctg aaaatttcaa gtgcaaggac ctacgagaaa attactgccg aaatccagat	6000
gggtctgaat caccctggtg ttttaccact gatccaaaca tccgatttgg ctactgtctc	6060
caaatccaa actgtgatat gtcacatgga caagattgtt atcgtgggaa tggcaaaaat	6120
tatatgggca acttatccca aacaagatct ggactaacat gttcaatgtg ggacaagaac	6180
atggaagact tacatcgtca tatcttctgg gaaccagatg caagtaagct gaatgagaat	6240
tactgccgaa atccagatga tgatgctcat ggaccctggt gctacacggg aaatccactc	6300
attccttggg attattgccc tatttctcgt tgtgaagggt ataccacacc tacaatagtc	6360
aatttagacc atcccgtaat atcttgtgcc aaaacgaaac aattgagagt tgtaaatggg	6420
attccaacac gaacaaacat aggatggatg gttagtgtga gatacagaaa taaacatatc	6480
tgcggaggat catlgataaa ggagagtggg gttcttactg cagcacagtg tttcccttct	6540
cgagacttga aagattatga agcttggctt ggaattcatg atgtccacgg aagaggagat	6600
gagaaatgca aacaggttct caatgtttcc cagctgggat atggccctga aggatcagat	6660

ES 2 556 711 T3

ctggtttttaa tgaagcttgc caggcctgct gtcctggatg attttgtag tacgattgat	6720
ttaccttaatt atggatgcac aattcctgaa aagaccagtt gcagtgttta tggctggggc	6780
tacactggat tgatcaacta tgatggccta ttacgagtgg cacatctcta tataatggga	6840
aatgagaaat gcagccagca tcatcgaggg aaggtagctc tgaatgagtc tgaaatatgt	6900
gctggggctg aaaagattgg atcaggacca tgtgaggggg attatggtag cccacttggt	6960
tgtgagcaac ataaaatgag aatggttctt ggtgtcattg ttccctggtag tggatgtgcc	7020
attccaaatc gtcctggtag ttttgtccga gtagcatatt atgcaaaatg gatacacaaa	7080
attatitttaa catataaggt accacagica tag	7113

5	<210> 8
	<211> 4679
	<212> ADN
	<213> Secuencia artificial
10	<220
	<223> Gen sintético HGF-X6
	<400> 8

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcatctcctc	60
ctgctcccca tgcctatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat	120
gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa	180
acaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt	240
ccattcactt gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctgggtcccc	300
ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa	360
aacaaagact acattagaaa ctgcatcatc ggtaaggac gcagctacaa gggaacagta	420
tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac	480
aggtaagaac agtatgaaga aaagagatga agcctctgtc ttttttacct gttaacagtc	540
tcataattagt ccttcagaa! aattctacaa tcctaaaata acttagccaa ctgtctgaat	600
tgtattacgg caaggtttat atgaattcat gactgatatt tagcaaatga ttaattaata	660
tgttaataaa atgtagccaa aacaataict taccitaaag cctcaatttg tagatctcgg	720
tatttgtgga tcccttcctt tctacctgta ttgtcctaa taaattgttg acttattaat	780
tcactacttc ctacagctt ttttttggct ttacaaatcc actggaaagg tatatgggtg	840
tatcactttg tgtatttcgg tgtgcatgtg tagaggggac aaaaatcctc tctcaacta	900
taaatattga gtatttgtgt attgaacatt tgctataact actaggtttc ttaaataatc	960
ttaatatata aaatgatata gaaaaagga aattatagtt cgtattattc atctaagtga	1020
agagattaaa acccaggagg taaataaatt gtctaaggac taaggttgta tactatttag	1080
gtgatagata tggggcaacc gtatgggttt tatgattaac aaataaactt ctccaccctc	1140
taccatatca acttttccat aaaagagagc tatagtattc ttgtcttaaa taaatttgat	1200
tagtgcatga ctctctgaaa acatataaag caaaagtcac atttgattct atcagaaaag	1260
tgagtaagcc atggcccaaa caaaagatgc attaaaatat tctggaatga tggagctaaa	1320
agtaagaaaa atgacttttt aaaaaagttt actgttagga atttgigaaat tatgctgaat	1380
tttagttgca ttataatttt tgtcagtcac acggtctgac aacctgtctt atttctattt	1440

ccccatatga ggaatgctag ttaagfatgg atattaacta ttactactta gatgcattga	1500
agttgcataa tatggataat acttcactgg ttccctgaaa atgtttagtt agtaataagt	1560
ctcttacct atttgttttg tccaataatt tataatctct gaagacttaa ctctagaata	1620
cactcatgtc aaaaatgaaag aatttcattg caaaaatattg ctgggtacat gacgcatacc	1680
tgtatttggt ttgtgtcaca acatgaaaaa tgaatgggtta ttagaagttt cattgggtag	1740
gaaacacatt tgaatgggtat ttactaagat actaaaatcc ttggacttca ctctaatttt	1800
agtgccattt agaactcaag gtctcagtaa aagtagaaat aaagcctgtt aacaaaacac	1860
aagctgaata ttaaaaatgt aactggattt tcaagaaat gtttactggt attacctgta	1920
gatgtatatt ctttattatg atcttttggt taaagtctgg cagacaaatg caatatctaa	1980
ttgttgagtc caatatcaca agcaglacaa aagiataaaa aagacttggc cttttcta	2040
gtgttaaaat actttatgtt ggtaataaca ctaagagtag ggcactagaa attttaagt	2100
aagataatgt gttgcagtta ctgcactcaa tggcttacta ttataaacca aaactgggat	2160
cactaagctc cagtcagtca aaatgatcaa aattattgaa gagaataagc aattctgttc	2220
tttattagga cacagtagat acagactaca aagtggagtg tgccttaataa gaggtagcat	2280
ttgttaagtg tcaattactc tattatccct tggagcttct caaaataacc atataagggtg	2340
taagatgtta aaggttatgg ttacactcag tgcacaggta agctaatagg ctgagagaag	2400
ctaaattact tactggggtc tcacagtaag aaagttagct gaagttcag ccagattta	2460
actggattct gggctcttta ttcatgttac ttcatgaatc tgtttctcaa ttgtgcagaa	2520
aaaagggggc tatttataag aaaagcaata aacaacaag taatgatctc aaataagtaa	2580
tgaagaaat agtgagattt caaaatcagt ggcagcgatt tctcagttct gtcctaagt	2640
gccttgctca atcacctgct atcttttagt ggagctttga aattatgttt cagacaactt	2700
cgattcagtt ctagaatgtt tgactcagca aattcacagg ctcatcttct taacttgatg	2760
gtgaatatgg aaattcagct aaatggatgt taataaaatt caaacgtttt aaggacagat	2820
gaaaatgaca gaattttaag gtaaaatata tgaaggaata taagataaag gatttttcta	2880
ccctcagcaa aaacataccc actaattagt aaaatttaata ggcaaaaaaa agttgcatgc	2940
tccttacttg taatgattat cattttaaaa ctagcttttt gccttcgagc tatcggggta	3000
aagacctaca ggaaaactac tgcgaaatc ctcgagggga agaaggggga ccctgggtgtt	3060
tcacaagcaa tccagaggta cgctacgaag tctgtgacat tcctcagttt tcagaagttg	3120
aatgcatgac ctgcaatggg gagagttatc gaggtctcat ggatcataca gaatcaggca	3180
agatttgtca gcgctgggat catcagacac cacaccggca caaattcttg cctgaaagat	3240
atcccagcaa gggctttgat gataattatt gccgcaatcc cgaatggccag ccgaggccat	3300
gggtgtatata tcttgaccct cacaccgct gggagtactg tgcaattaaa acatgcgctg	3360
acaatactat gaatgacact gatgttcctt tggaaacaac tgaatgcatc caaggtcaag	3420
gagaaggcta caggggcact gtcaatacca tttggaatgg aattccatgt cagcgttggg	3480
atttctagta tcctcacgag catgacatga ctccctgaaaa ttccaagtgc aaggacctac	3540
gagaaaatta ctgccgaaat ccagatgggt ctgaatcacc ctgggtgttt accactgatc	3600
caaacatccg agttggctac tgctcccaaa ttccaaactg tgatatgtca catggacaag	3660

ES 2 556 711 T3

```

attgttatcg tgggaatggc aaaaattata tgggcaactt atcccaaaca agatctggac 3720
taacatgttc aatgtgggac aagaacatgg aagacttaca tcgtcatatc ttctgggaac 3780
cagatgcaag taagctgaat gagaattact gccgaaatcc agatgatgat gctcatggac 3840
cctggtgcta cacgggaaat ccactcattc ctgtgggatta ttgccctatt tctcgttggtg 3900
aaggatgatac cacacctaca atagtcaatt tagaccatcc cgtaatatct tgtgccaaaa 3960
cgaaacaatt gcgagttgta aatgggattc caacacgaac aaacatagga tggatgggta 4020
gtttgagata cagaaataaa catatctgcg gaggaatcatt gataaaggag agttgggttc 4080
ttactgcacg acagtgttgc ccttctcgag acttgaaaga ttatgaagct tggcttggaa 4140
ttcatgatgt ccacggaaga ggagatgaga aatgcaaaca ggttctcaat gtitcccagc 4200
tggatatatg cctgaagga tcagatctgg ttttaataaa gcttgccagg cctgctgtcc 4260
tggatgattt tgttagtacg attgatttac ctaattatgg atgcacaatt cctgaaaaga 4320
ccagttgcag tgtttatggc tggggctaca ctggattgat caactatgat ggcctattac 4380
gagtggcaca tctctatata atgggaaatg agaaatgcag ccagcatcat cgaggggaagg 4440
tgactctgaa tgagtctgaa atatgtgctg gggctgaaaa gattggatca ggaccatgtg 4500
agggggatta tgggtggcca ctgtttgtg agcaacataa aatgagaatg gtcttgggtg 4560
tcattgttcc tggtcgtgga tgtgccattc caaatcgtcc tggatatttt gtccgagtag 4620
catattatgc aaaatggata cacaaaatta ttttaacata taaggtaacca cagtcatag 4679

```

<210> 9
 <211> 3679
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220
 <223> Gen sintético HGF-X7

<400> 9

ES 2 556 711 T3

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtccctct gcctctctct	60
ctgtcctcca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaaagga aaagaagaaa tacaattcat	120
gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa	180
accaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt	240
ccattcacit gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc	300
ttcaatagca tgicaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa	360
aacaaagact acattagaaa ctgcatcatc ggtaaaggac gcagctacaa gggaacagta	420
tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac	480
aggaagaac agtatgaaga aaagagatga agcctctgtc ttttttacct gttaacagtc	540
tcatattagt ccttcagaat aattctacaa tcttaaaata acttagccaa ctgtctgaat	600
tgtattacgg caaggtttat atgaattcat gactgatatt tagcaaatga ttaattaata	660
tgttaataaa atgtagccaa aacaatatct taccttaatg ccitcaattg tagatctcgg	720
tatttgtgga tcctgggtag gaaacacatt tgaatggat ttactaagat actaaatcc	780
ttggactica ctctaatttt agtgccattt agaactcaag gtctcagtaa aagtagaaat	840
aaagcctgtt aacaaaacac aagctgaata ttaaaaatgt aactggattt tcaaagaaat	900

ES 2 556 711 T3

gtttactggg attacctgta gatgtatatt ctttattatg atcttttgig taaagtctgg 960
 cagacaaatg caatatctaa ttgttgagtc caatatcaca agcagtacaa aagtataaaa 1020
 aagacttggc cttttctaatt gtgttaaaat actttatgct ggtaataaca ctaagagtag 1080
 ggcactagaa attttaagtg aagataatgt gttgcagtta ctgcactcaa tggcttacta 1140
 ttataaacca aaactgggat cactaagctc cagtcagtca aaatgatcaa aattattgaa 1200
 gagaataagc aattctgttc ttatttagga cacagtagat acagactaca aagtggagtg 1260
 tgcttaataa gaggtagcat ttgttaagtg tcaattactc tattatccct tggagcttct 1320
 caaaataacc atataagggtg taagatgita aagggttatgg ttacactcag tgcacaggta 1380
 agctaatagg ctgagagaag ctaaattact tactggggtc tcacagtaag aaagtggagct 1440
 gaagtttcag cccagattta actggattct gggctcttta ttcatgttac ttcatgaatc 1500
 tgtttctcaa ttgtgcagaa aaaagggggc tatttataag aaaagcaata aacaacaag 1560
 taatgatctc aaataagtaa tgcaagaaat agtgagattt caaatcagt ggcagcgatt 1620
 tctcagttct gtccctaagtg gccttgctca atcacctgct atcttttagt ggagctttga 1680
 aattatgttt cagacaactt cgattcagtt ctagaatgtt tgactcagca aattcacagg 1740
 ctcatctttc taacttgatg gtgaatatgg aaattcagct aaatggatgt taataaaatt 1800
 caaacgtttt aaggacagat gaaaatgaca gaattttaag gtaaaatata tgaagggaata 1860
 taagataaag gatTTTTtcta ccttcagcaa aaacataccc actaattagt aaaattaata 1920
 ggcaaaaaaa agttgcatgc tcttatactg taatgattat catTTTTaaa ctgctTTTT 1980
 gccttcgagc tatcggggta aagacctaca ggaaaactac tgcgaaatc ctcgagggga 2040
 agaaggggga ccttggtgtt tcacaagcaa tccagaggta cgctacgaag tctgtgacat 2100
 tcctcagtg tcaagaattg aatgcatgac ctgcaatggg gagagttatc gaggtctcat 2160
 ggatcataca gaatcaggca agatttgta gcgctgggat catcagacac cacaccgga 2220
 caaattcttg cctgaaagat atcccgacaa gggctttgat gataattatt gccgcaatcc 2280
 cgatggccag ccgaggccat ggtgctatc tcttgaccct cacaccgct gggagtactg 2340
 tgcaattaaa acatgcgtg acaatactat gaatgacact gatgttctt tggaaacaac 2400
 tgaatgcatc caaggtaag gagaaggcta caggggact gtcaatacca ttgggaatgg 2460
 aattccatgt cagcgttggg attctcagta tcctcagag catgacatga ctctgaaaa 2520
 ttcaagtgc aaggacctac gagaaaatta ctgccgaaat ccagatgggt ctgaatcacc 2580
 ctggtgtttt accactgatc caaacatccg agttggctac tgcctccaaa ttccaaactg 2640
 tgatatgtca catggacaag attgttatcg tgggaatggc aaaaattata tgggcaactt 2700
 atcccaaaca agatctggac taacatgttc aatgtgggac aagaacatgg aagacttaca 2760
 tcgtcatatc ttctgggaac cagatgcaag taagctgaat gagaattact gccgaaatcc 2820
 agatgatgat gctcatggac cctggtgcta caggggaaat ccactcattc ctgggatta 2880
 ttgccctatt tctcgttggt aaggtgatac cacacctaca atagtcaatt tagaccatcc 2940
 cgtaatatct tgtgcaaaa cgaacaatt gcgagttgta aatgggattc caacacgaac 3000
 aaacatagga tggatggta gtttgagata cagaaataaa catatctgcg gaggatcatt 3060
 gataaaggag agttgggttc ttactgcacg acagtgttcc ctttctcgag acttgaaaga 3120
 ttatgaagct tggcttggaa ttcatgatgt ccacggaaga ggagatgaga aatgcaaca 3180

gggtcicaat gtttcccagc tggatatgg ccctgaagga tcagatctgg ttttaatgaa	3240
gcttgccagg cctgctgtcc tggatgattt tgttagtacg attgatttac ctaattatgg	3300
atgcacaatt cctgaaaaga ccagttgcag tgtttatggc tggggctaca ctggattgat	3360
caactatgat ggcttattac gagtggcaca tctctatata atgggaaatg agaaatgcag	3420
ccagcatcat cgaggggaagg tgactctgaa tgagtcigaa atalgtgctg gggctgaaaa	3480
gattggatca ggaccatgtg agggggatta tggtaggcca ctgtttgtg agcaacataa	3540
aatgagaatg gttcttgggtg tcattgttcc tggtagtgga tgtgccattc caaatcgtcc	3600
tggatatttt gtccgagtag catattatgc aaaatggata cacaaaaata ttttaacata	3660
taaggtagca cagtcatag	3679

<210> 10
 <211> 2729
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Gen sintético HGF-X8

<400> 10

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcatactctc	60
ctgctcccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat	120
gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaatag atccagcact gaagataaaa	180
accaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt	240
ccattcactt gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc	300
ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa	360
aacaagact acattagaaa ctgcatcatc ggtaaaggac gcagctacaa gggaacagta	420
tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac	480
aggtaagaac agtatgaaga aaagagaaga agcctctgtc ttttttacct gttaacagtc	540
tcatattagt ccttcagaat aattctacaa tcctaaaata acttagccaa ctgtctgaat	600
tgtattacgg caaggtttat atgaattcat gactgatatt tagcaaatga ttaattaata	660
tgttaataaa atgtagccaa aacaatatct taccittaatg cctcaatttg tagatctcgg	720
tatttgtgga tccttatgtt tcagacaact tcgattcagt tctagaatgt ttgactcagc	780
aaattcacag gctcatcttt ctaacttgat ggtgaatatg gaaattcagc taaatggatg	840
ttaataaaat tcaaacgttt taaggacaga tgaaaatgac agaattttaa ggtaaaatat	900
atgaaggaat ataagataaa ggatttttct accttcagca aaaacatacc cactaattag	960
taaaattaat aggcaaaaaa aagttgcatg ctcttatact gtaatgatta tcatttttaa	1020
actagctttt tgccttcgag ctatcggggt aaagacctac aggaaaacta ctgtcgaaat	1080
cctcgagggg aagaaggggg accctgggtt ttcacaagca atccagaggt acgctacgaa	1140
gtctgtgaca ttcttcagtg ttcagaagtt gaatgcatga cctgcaatgg ggagagttaa	1200
cgaggcttca tggatcatc agaatcaggc aagatttgtc agcgctggga tcatcagaca	1260
ccacaccggc acaaattctt gcctgaaaga tatcccgaca agggctttga tgataattat	1320
tgccgcaatc ccgatggcca gccgaggcca tgggtctata ctcttgacct tcacaccgc	1380

tgggagtact gtgcaattaa aacatgcgct gacaatacta tgaatgacac tgatgttcct	1440
ttggaaacaa ctgaatgcat ccaagggtcaa ggagaaggct acaggggcac tgtcaatacc	1500
atttggaaig gaattccatg tcagcgttgg gattctcagt atccctacga gcatgacatg	1560
actcctgaaa atttcaagtg caaggaccta cgagaaaatt actgccgaaa tccagatggt	1620
ctgaatcacc ctggigtitt accactgac caaacatccg agttggctac tgctcccaa	1680
ttccaaactg tgatattgca catggacaag attgttatcg tgggaatggc aaaaattata	1740
tgggcaactt atcccaaaca agatctggac taacatgttc aatgtgggac aagaacatgg	1800
aagacttaca tcgtcatatc ttctgggaac cagatgcaag taagctgaat gagaattact	1860
gccgaaatcc agatgatgat gctcatggac cctggigtca cacgggaaat ccactcattc	1920
cittgggatta ttgccctatt tctcgttgtg aaggatgac cacacctaca atagtcaatt	1980
tagaccatcc cgtaatatct tgtgccaaaa cgaacaatt gcgagttgta aatgggattc	2040
caacacgaac aaacatagga tggatggita gtttgagata cagaaataaa catactgcg	2100
gaggatcatt gataaaggag agttgggttc ttactgcacg acagtgtttc ccttctcgag	2160
acttgaaaga ttatgaagct tggcttggaa ttcatgatgt ccacggaaga ggagatgaga	2220
aatgcaaaca ggttctcaat gtttccacg tggatatgg cctgaagga tcagatctgg	2280
ttttaatgaa gcttgccagg cctgctgtcc tggatgattt tgttagtacg attgatttac	2340
ctaattatgg atgcacaatt cctgaaaaga ccagtgcag tgtttatggc tggggctaca	2400
ctggattgat caactatgat ggcctattac gagtggcaca tctctatata atgggaaatg	2460
agaaatgcag ccagcatcat cgaggggaagg tgactctgaa tgagtctgaa atatgtgctg	2520
gggctgaaaa gatggatca ggaccatgtg agggggatta tggtaggcca ctgttttgtg	2580
agcaacataa aatgagaatg gtcttgggtg tcattgttcc tggctgtgga tgtgccattc	2640
caaatcgtcc tggatatttt gtccgagtag catattatgc aaaaaggata cacaaaatta	2700
ttttaacata taaggtagca cagtcatag	2729

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

 <400> 11

ES 2 556 711 T3

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 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

5

<210> 12
 <211> 296
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12

ES 2 556 711 T3

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
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

- 5 <210> 13
<211> 6190
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Híbrido Sintético del Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF)-X2
<400> 13

ES 2 556 711 T3

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcatctcctc	60
ctgctcccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat	120
gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa	180
acaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt	240
ccattcactt gcaaggcttt tgtttttgat aaagaagaa aacaatgcct ctgggtcccc	300
ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa	360
aacaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctacaa gggaacagta	420
tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccctggagt ccatgatacc acacgaacac	480
aggtaagaac agtatgaaga aaagagatga agcctctgtc ttttttacct gttaacagtc	540
tcatattagt ccttcagaat aattctacaa tcctaaaata acttagccaa ctgtctgaat	600
tgtattacgg caaggtttat atgaattcat gactgatatt tagcaaatga ttaattaata	660
tgttaataaa atgtagccaa aacaatatct taccttaatg cctcaatttg tagatctcgg	720
tatttgtgaa ataataacgt aaacttcgtt taaaaggatt ctcttcctg tctttgagaa	780
agtacggcac tgtgcagggg gagagggtga ttgtgaaaaa tcagaggtag atgagaatct	840
tactgagggc tgagggttct ttaaccttgg tggatctcaa cattggttgc acattaaaat	900
cacctgctgc aagcccttga cgaatcttac ttagaagatg acaacacaga acaattaaat	960
cagaatctct ggggagaata gggcaccagt attttttgag ctcccacat gattccaaag	1020
tgcagccaaa tttgagaacc actgctaaaa gctcaagctt cagattgacc agcttttcca	1080
tctcacctat cgcctaaaga ccaaattgga taaatgtgtt cattacgaca gatgggtact	1140
atttaaagat gagtaaacac aatatactta ggctcgtcag actgagagtt ttaatcatca	1200
ctgaggaaaa acatagatat ctaatactga ctggagtatt agtcaaggct tatttcacac	1260

acaattttat cagaaaccaa agtagtttaa aacagctctc cccttattag taatgcattg	1320
gagggtttac ttaccatgt accitgctga gcactgtacc ttgttaatct catttacttg	1380
taatgagaac cacacagcgg gtagttttat tggttctatt ttacctacat gacaaaactg	1440
aagcataaaa acacttagta agttttcagt gtcattgcaca actaggaagt gacatggcca	1500
gaatataagc ccagtcacca tcactctata acctgcgcctt ttaacaactt cagggcatga	1560
cacatttggc cggtcagtag aacctatgct gtgatttgtt ttgacagtg 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 ttcaataac agaaaacaac aattttcaaa attagtact	1860
tacaattatg tagaatgcc tctaaaacac agtattttcc ttatattaca aaaacaaaaa	1920
ttataattgg ttttgcctc ttttgagagt ttgcatggtg ttactccctg catagtgaag	1980
aaaacatttt atttaagtag atggatctaa gtttttcag aacaaaggaa tgacatttga	2040
aatcaatcct accctagtcc aggagaatgc attagattaa cctagtagag gtcttatttc	2100
accttgagtt ttctatgac gtgattctct gctggaggag taatttgtga atagatctct	2160
ctgggaactg gcttcctagt ccaatcagct cttttaccaa tgaacacttc cttgtgatat	2220
agatgtttat ggccgagagg atcccttcct ttctacctgt atttgtccta ataaattgtt	2280
gacttattaa ttactactt cctcacagct ttttttggc tttaacaatc cactggaaag	2340
gtatatgggt gtatcacttt gtgtatttcg gtgtgcatgt gtagagggga caaaaatcct	2400
ctctcaaaact ataaatattg agtatttgtg tattgaacat ttgtataac tactaggttt	2460
cttaaaat attaatatat aaaatgatat agaaaaagg aaattatagt tcgtattatt	2520
catctaagt aagagattaa aacctaggga gtaataaat tgtctaagga ctaaggttgt	2580
atactattta ggtgatagat atggggcaac cgtatgggtt ttatgattaa caaataaact	2640
tctcaccact ctaccatac aacttttcca taaaagagag ctatagtatt ctttgcttaa	2700
ataaatttga ttagtgcatg acttcttgaa aacatataaa gcaaaagtca catttgattc	2760
tatcagaaaa gtgagtaagc catggcccaa acaaaagatg cattaaaata ttctggaatg	2820
atggagctaa aagtaagaaa aatgactttt taaaaagtt tactgttagg aatttgtgaa	2880
ttatgctgaa ttttagttgc attataattt ttgtcagtca tacggctga caacctgtct	2940
tatttctatt tcccatatg aggaatgcta gtttaagtat gatattaaact attactactt	3000
agatgcattg aagttgcata atatggataa tacttcactg gtccctgaa aatgtttagt	3060
tagtaataag tctcttacac tatttgtttt gtccaataat ttatattttc tgaagactta	3120
actctagaat acactcatgt caaaatgaaa gaatttcatt gcaaaatatt gcttggta	3180
tgacgcatat ctgtatttgt ttgtgtcac aacatgaaa atgatgggtt attagaagtt	3240
tcatfoggta ggaaacacat ttgaatggta ttactaaga tactaaaatc cttggacttc	3300
actctaattt tagtgccatt tagaactcaa ggtctcagta aaagtagaaa taaagcctgt	3360
taacaaaaca caaactgaat attaaaaatg taactggatt ttcaaagaaa tgtttactgg	3420
tattacctgt agatgtatat tctttattat gatctttgt gtaaagtcig gcagacaaat	3480
gcaatattca attgttgagt ccaatatcac aagcagtaca aaagtataaa aaagacttgg	3540

ccittttctaa tgtgttaaaa tacittatgc tggtaataac actaagagta gggcactaga	3600
aattttaagt gaagataatg tgttgcagtt acigcactca atggcctact attataaacc	3660
aaaactggga tcactaagct ccagtcagtc aaaatgatca aaattattga agagaataag	3720
caattctggt ctttattagg acacagtaga tacagactac aaagtggagt gtgcttaata	3780
agaggtagca ttgtttaagt gtcaattact ctattatccc ttggagcttc tcaaaataac	3840
catataaggt gtaagatgtt aaaggttatg gttacactca gtgcacaggt aagctaatag	3900
gttgagagaa gctaaattac ttactggggt ctacacagtaa gaaagtgagc tgaagtttca	3960
gccagatgtt aactggattc tgggctcttt attcatgtta ctcatgaat ctgtttctca	4020
attgtgcaga aaaaaggggg ctatttataa gaaaagcaat aaacaaacaa gtaatgatct	4080
caaataagta atgcaagaaa tagtgagatt tcaaaatcag tggcagcgtt ttctcagttc	4140
tgtcctaagt ggccttgctc aatcacctgc tatcttttag tggagctttg aaattatggt	4200
tcagacaact tcgattcagt tctagaatgt ttgactcagc aaattcagc gctcatcttt	4260
ctaacttgat ggtgaatatg gaaattcagc taaatggatg ttaataaaa tcaaactgtt	4320
taaggacaga tggaaatgac agaattttta ggtaaaatat atgaaggaa ataagataaa	4380
ggatttttct accttcagca aaaacatacc cactaattag taaaattaat aggcgaaaaa	4440
aagttgcatg ctcttatact gtaatgatta tcattttaaa actagctttt tgccttcgag	4500
ctatcggggt aaagacctac aggaaaaacta ctgtcgaaat cctcgagggg aagaaggggg	4560
accttggtgt ttcacaagca atccagaggt acgctacgaa gtctgtgaca ttccctcagt	4620
ttcagaaggt gaatgcatga cctgcaatgg ggagagttat cgaggcttca tggatcatc	4680
agaatcagc aagattttgc agcgctggga tcatcagaca ccacaccggc acaaattctt	4740
gcctgaaaga tatcccgaca agggctttga tgataattat tgcgcgaatc ccgatggcca	4800
gccgaggcca tgggtctata ctcttgacct tcacaccgc tgggagtagt gtgcaattaa	4860
aacatgccgt gacaatacta tgaatgacac tgatgttcct ttggaaacaa ctgaatgat	4920
ccaaggctaa ggagaaggct acagggggcac tgtcaatacc atttggaatg gaattccatg	4980
tcagcgttgg gatctcagt atcctcacga gcatgacatg actcctgaaa atttcaagt	5040
caaggaccta cgagaaaatt actgccgaaa tccagatggg tctgaatcac cctggtgttt	5100
taccactgat ccaaaccatc gagttggcta ctgctcccaa attccaaact gtgatatgtc	5160
acatggacaa gatgtttatc gtgggaatgg caaaaattat atgggcaact tatcccaaac	5220
aagatctgga ctaacatgtt caatgtggga caagaacatg gaagacttac atcgtcatat	5280
cttctgggaa ccagatgcaa gtaagctgaa tgagaattac tgcggaaatc cagatgatga	5340
tgctcatgga ccttggtgct acacgggaaa tccactcatt ccttgggatt attgccctat	5400
ttctcgttgt gaaggtgata ccacacctac aatagtcaat ttagaccatc ccgtaatatc	5460
ttgtgccaaa acgaaacaa tgcgagtgtt aaatgggatt ccaacacgaa caaacatagg	5520
atggatggtt agtttgagat acagaaataa acatatctgc ggaggatcat tgataaagga	5580
gagttgggtt ctactgcac gacagtgttt cccttctcga gacttgaaag attatgaagc	5640
ttggcttggga attcatgatg tccacggaag aggagatgag aaatgcaaac aggtttctaa	5700
tgtttccag ctggtataat gccctgaagg atcagatctg gttttaatga agcttgccag	5760

ES 2 556 711 T3

gcctgctgtc ctggatgatt ttgttagtac gattgattta cctaattatg gatgcacaat 5820
 tcctgaaaag accagttgca gtgtttatgg ctggggctac actggattga tcaactatga 5880
 tggcctatta cgagtggcac atctctatat aatgggaaat gagaaatgca gccagcatca 5940
 tggaggaag gtgactctga atgagctga aatatgtgct ggggctgaaa agattggatc 6000
 aggaccatgt gagggggatt atggtggccc acttgtttgt gagcaacata aaatgagaat 6060
 ggttcttggg gtcatgttgc ctggctgtgg atgtgccatt ccaaatcgtc ctggatattt 6120
 tgtccgagta gcatattatg caaaatggat acacaaaatt attttaacat ataaggtacc 6180
 acagtcatag 6190

<210> 14
 <211> 5190
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Híbrido Sintético del Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF)-X3

<400> 14

atgtgggtga ccaaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcctctcctc 60
 ctgctcccca tcgcatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120
 gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa 180
 accaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt 240
 ccattcactt gcaaggcttt tgttttcat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc 300
 ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa 360
 aacaaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctacaa gggaacagta 420
 tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac 480
 aggttaagaac agtatgaaga aaagagatga agcctctgtc ttttttcat gttaacagtc 540
 tcatattagt ccttcagaat aattctacaa tcctaaaata acttagccaa ctgtctgaat 600
 tgtattacgg caaggtttat atgaattcat gactgataat tagcaaatga ttaattaata 660
 tgttaataaa atgtagccaa aacaatatct taccttaatg cctcaatttg tagatctcgg 720
 tatttgtgaa ataataacgt aaacttcgtt taaaaggatt ctctctcctg tctttgagaa 780
 agtacggcac tgtgcagggg gagagggtga ttgtgaaaaa tcagaggtag atgagaatct 840
 tactgagggc tgagggttct ttaaccttgg tggatctcaa cattgggtgc acattaaaat 900
 cacctgctgc aagcccttga cgaatcttac ttagaagatg acaacacaga acaattaaat 960
 cagaatctct ggggagaata gggcaccagt attttttgag ctcccacat gattccaaag 1020
 tgcagccaaa tttgagaacc actgctaaaa gctcaagctt cagattgacc agcttttcca 1080
 tctcacctat cgcctaaaga ccaaatgga taaatgtgtt cattacgaca gatgggtact 1140
 atttaaagat gagtaaacac aatatactta ggctcgtcag actgagagtt ttaatcatca 1200
 ctgaggaaaa acatagatat ctaatactga ctggagtatt agtcaaggct tatttcacac 1260
 acaattttat cagaaaccaa agtagtttaa aacagctctc cccttattag taatgcattg 1320
 gagggtttac ttaccatgt accttgctga gcactgtacc ttgttaatct catttacttg 1380
 taatgagaac cacacagcgg gtagtattat tggttctatt ttacctacat gacaaaactg 1440

ES 2 556 711 T3

aagcataaaa acacttagta agttttcagt gtcatgcaca actaggaagt gacatggcca	1500
gaatataagc ccagtcacca tcactctata acctgcgctt ttaacaactt cagggcatga	1560
cacatttggc cggtcagtag aacctatgct gtgatttgtt ttgacagtg tggtgatgac	1620
tgccttgttg aatccacttt ttattctatt ccattttggg gacacaattc tgcaagatga	1680
ttcttcatta ggaaacagag atgagttatt gaccaacaca gaaagaaaa gagtttgttg	1740
ctccacactg ggattaaacc tatgatcttg gcctaattaa cactagctag taagtgtcca	1800
agctgatcat ctctacaaca ttcaataac agaaaacaac aattttcaaa attagttact	1860
tacaattatg tagaaatgcc tctaaaacac agtatittcc ttataattaca aaaacaaaaa	1920
ttataattgg ttttgcctc ttttgagagt ttgcatggtg ttactccctg catagtgaag	1980
aaaacatttt atttaagtag atggatctaa gtttttcag aacaaaggaa tgacatttga	2040
aatcaatcct acctagtc ccaggagaatgc attagattaa cctagtagag gtcttatttc	2100
acctgagtt ttctatgac gtgatttctt gctggaggag taattgtgaa atagatctct	2160
ctgggaactg gcttccctagt ccaatcagct cttttacca tgaacacttc cttgtgatat	2220
agatgtttat ggccgagagg atcctgggta ggaaacacat ttgaatggta ttactaaga	2280
tactaaaatc ctgggacttc actctaattt tagtgccatt tagaactcaa ggtctcagta	2340
aaagtagaaa taaagcctgt taacaaaaca caaactgaat attaaaaatg taactggatt	2400
ttcaaagaaa tgtttactgg tattacctgt agatgtatat tctttattat gatctttgt	2460
gtaaagtctg gcagacaaat gcaatatcta attgttgagt ccaatatcac aagcagtaca	2520
aaagtataaa aaagacttgg ctttttctaa tgtgttaaaa tactttatgc tggtaataac	2580
actaagagta gggcactaga aattttaagt gaagataatg tgttgagtt actgcactca	2640
atggcttact attataaacc aaaactggga tcactaagct ccagtcagtc aaaatgatca	2700
aaattattga agagaataag caattctgtt ctttattagg acacagtaga tacagactac	2760
aaagtggagt gtgcttaata agaggtagca ttgtttaagt gtcaattact ctattatccc	2820
ttggagcttc tcaaaaatac catataaggt gtaagatgtt aaaggttatg gttacactca	2880
gtgcacaggt aagctaatag gctgagagaa gctaaattac ttactggggt ctacacagta	2940
gaaagtgagc tgaagtcca gccagattt aactggattc tgggctcttt attcatgtta	3000
cttcatgaat ctgtttctca attgtgcaga aaaaaggggg ctatttataa gaaaagcaat	3060
aaacaaacaa gtaatgatct caaataagta atgcaagaaa tagtgagatt tcaaaatcag	3120
tggcagcgat ttctcagttc tgccttaagt ggccttgctc aatcacctgc tatcttttag	3180
tggagcttgg aaattatgtt tcagacaact tcgattcagt tctagaatgt ttgactcagc	3240
aaattcacag gctcatcttt ctaacttgat ggtgaatatg gaaattcagc taaatggatg	3300
ttaataaaat tcaaacgttt taaggacaga tggaaatgac agaattttaa ggtaaaatat	3360
atgaaggaaat ataagataaa ggatttttct accttcagca aaaacatacc cactaattag	3420
taaaattaat aggcgaaaaa aagttgcatt ctcttatact gtaatgatta tcattttaaa	3480
actagctttt tgccttcgag ctatcggggg aaagacctac aggaacta ctgtcgaaat	3540
ccctcagggg aagaaggggg accttgggtt ttcacaagca atccagaggt acgctacgaa	3600
gtctgtgaca ttccctcagtg ttcagaagtt gaatgcatga cctgcaatgg ggagagttat	3660
cgaggcttca tggatcatat agaatcaggc aagatttgtc agcgctggga tcatcagaca	3720

ccacaccggc acaaattctt gcctgaaaga tatcccgaca agggctttga tgataattat	3780
tgccgcaatc ccgatggcca gccgaggcca tgggtctata ctcttgaccc tcacaccgc	3840
tgggagtact gtgcaattaa aacatgcgct gacaatacta tgaatgacac tgatgttcct	3900
ttggaaacaa ctgaatgcat ccaagggtcaa ggagaaggct acaggggcac tgtcaatacc	3960
atttggaaatg gaattccatg tcagcgttgg gattctcagt atcctcacga gcatgacatg	4020
actcctgaaa atttcaagtg caaggacctt cgagaaaatt actgccgaaa tccagatggg	4080
tctgaatcac cctggtgttt taccactgat ccaaacatcc gagttggcta ctgctcccaa	4140
attccaaact gtgatatgtc acatggacaa gattgttatt gtgggaatgg caaaaattat	4200
atgggcaact tatcccaaac aagatctgga ctaacatgtt caatgtggga caagaacatg	4260
gaagacttac atcgtcatat ctctcgggaa ccagatgcaa gtaagctgaa tgagaattac	4320
tgccgaaatc cagatgatga tgctcatgga ccctggtgct acacgggaaa tccactcatt	4380
ccctgggatt attgccctat ttctcgttgt gaagggtgata ccacacctac aatagtcaat	4440
ttagaccatc ccgtaatatc ttgtgccaaa acgaaacaat tgcgagttgt aaatgggatt	4500
ccaacacgaa caaacatagg atggatggtt agtttgagat acagaaataa acatatctgc	4560
ggaggatcat tgataaagga gagttgggtt ctactgcac gacagtgttt cccttctcga	4620
gacttgaaag attatgaagc ttggcttgga attcatgatg tccacggaag aggagatgag	4680
aaatgcaaac aggttctcaa tgtttccag ctggtatatg gccctgaagg atcagatctg	4740
gttttaatga agcttgccag gcctgctgtc ctggatgatt ttgttagtac gattgattta	4800
cctaattatg gatgcacaat tcctgaaaag accagttgca gtgtttatgg ctggggctac	4860
actggattga tcaactatga tggcctatta cgagtggcac atctctatat aatgggaaat	4920
gagaaatgca gccagcatca tcgaggggaag gtgactctga atgagtctga aatatgtgct	4980
ggggctgaaa agattggatc aggaccatgt gagggggatt atgggtggccc acttgtttgt	5040
gagcaacata aaatgagaat ggttcttggg gtcatgtgtc ctgggtcgtg atgtgccatt	5100
ccaaatcgtc ctggtatttt tgtccgagta gcatattatg caaaatggat acacaaaatt	5160
attttaacat ataagggtacc acagtcatag	5190

REIVINDICACIONES

1. Una formulación liofilizada de ADN que comprende un ADN plasmídico, una sal y un carbohidrato, en la que

- 5 (i) dicho ADN plasmídico comprende un gen del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), o variante del mismo, que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 2 (flHGF), la SEC ID N°: 3 (dHGF), la SEC ID N°: 4 (NK1), la SEC ID N°: 5 (NK2), la SEC ID N°: 6 (NK4),
 (ii) dicha sal es NaCl,
 (iii) dicho carbohidrato es sacarosa,

10 y en la que, antes de la liofilización, el NaCl estaba presente en la formulación de ADN en una cantidad de entre 0,5 % y 2 % y la sacarosa estaba presente en la formulación de ADN de entre 0,8 % y 5 %, para el uso en un método de tratamiento o prevención de enfermedad isquémica o hepática en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración de una composición reconstituida de dicha formulación liofilizada de ADN mediante inyección directa.

15 2. La formulación liofilizada de ADN para uso en un método de tratamiento o prevención de enfermedad isquémica o hepática en un sujeto de la reivindicación 1, en la que dicho ADN plasmídico comprende un gen de HGF híbrido seleccionado del grupo que consiste en la SEC ID N°: 7, la SEC ID N°: 13 (HGF-X2), la SEC ID N°: 14 (HGF-X3), la SEC ID N°: 8 (HGF-X6), la SEC ID N°: 9 (HGF-X7), y la SEC ID N°: 10 (HGF-X8).

20 3. La formulación liofilizada de ADN para uso en un método de tratamiento o prevención de enfermedad isquémica o hepática en un sujeto de la reivindicación 2, en la que dicho ADN plasmídico se selecciona del grupo que consiste en pCK-HGF-X2, pCK-HGF-X3, pCK-HGF-X6, pCK-HGF-X7, pCK-HGF-X8, pCP-HGF-X2, pCP-HGF-X3, pCP-HGF-X6, pCP-HGF-X7 y pCP-HGF-X8.

25 4. La formulación liofilizada de ADN para uso en un método de tratamiento o prevención de enfermedad isquémica o hepática en un sujeto de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que antes de la liofilización, dicho ADN plasmídico estaba presente a una concentración de 1 ng/ml a 30 mg/ml.

30 5. El uso de una formulación liofilizada de ADN que comprende un ADN plasmídico, una sal y un carbohidrato, en la que

- 35 (i) (dicho ADN plasmídico comprende un gen del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), o variante del mismo, que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 2 (flHGF), la SEC ID N°: 3 (dHGF), la SEC ID N°: 4 (NK1), la SEC ID N°: 5 (NK2), la SEC ID N°: 6 (NK4),
 (ii) dicha sal es NaCl,
 (iii) dicho carbohidrato es sacarosa,

40 y en la que, antes de la liofilización, el NaCl estaba presente en la formulación de ADN en una cantidad de entre 0,5 % y 2 % y la sacarosa estaba presente en la formulación de ADN en una cantidad de entre 0,8 % y 5 %, en la fabricación de un medicamento para el uso en un método de tratamiento o prevención de enfermedad isquémica o hepática en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración de una composición reconstituida de dicha formulación liofilizada de ADN mediante inyección directa.

45 6. La formulación liofilizada de ADN para el uso en un método de tratamiento o prevención de enfermedad isquémica o hepática en un sujeto de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 5, en la que dicha formulación de ADN se reconstituye en una solución farmacéuticamente aceptable, preferentemente en la que dicha solución farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en agua, PBS, TBE, tampón Tris y solución salina normal.

50

FIG. 1

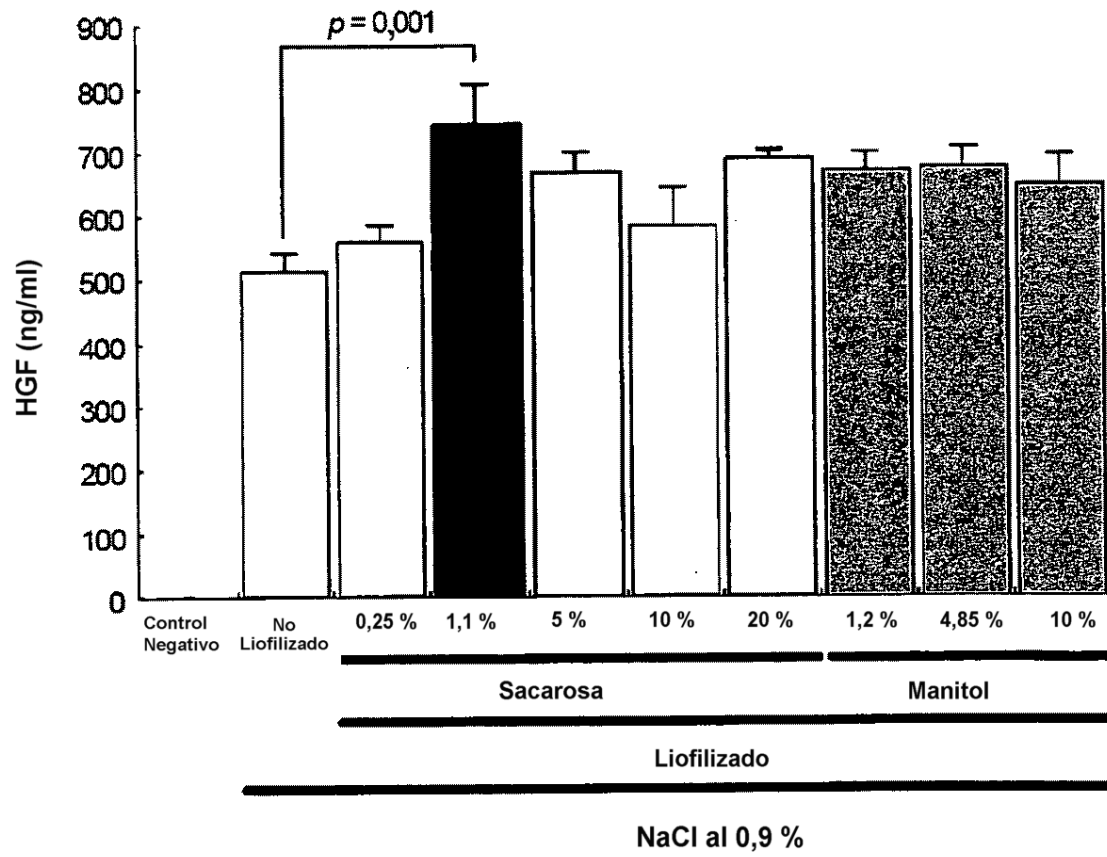


FIG 2

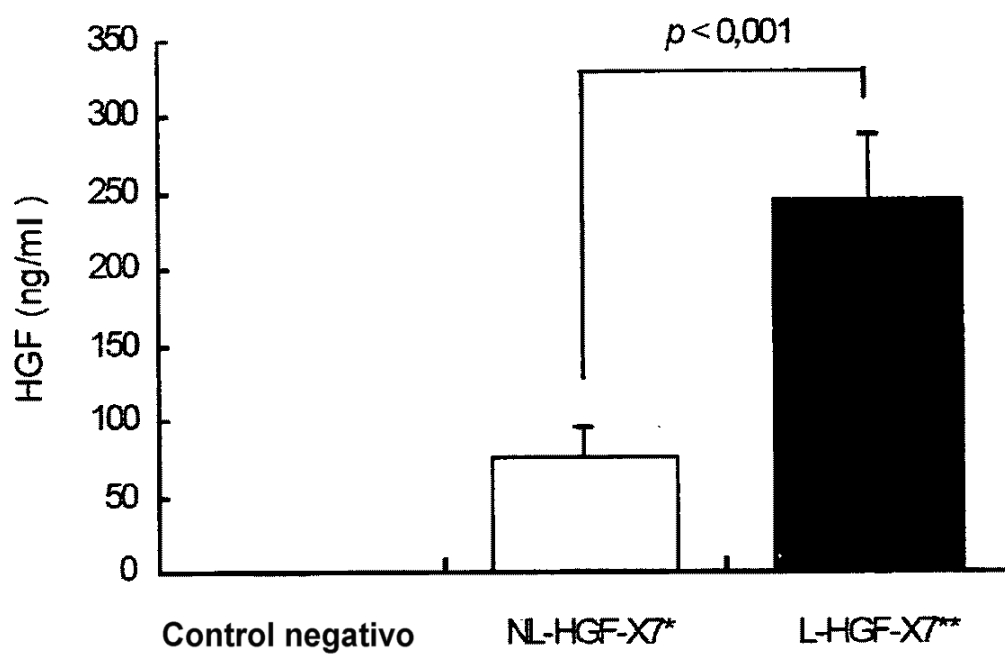
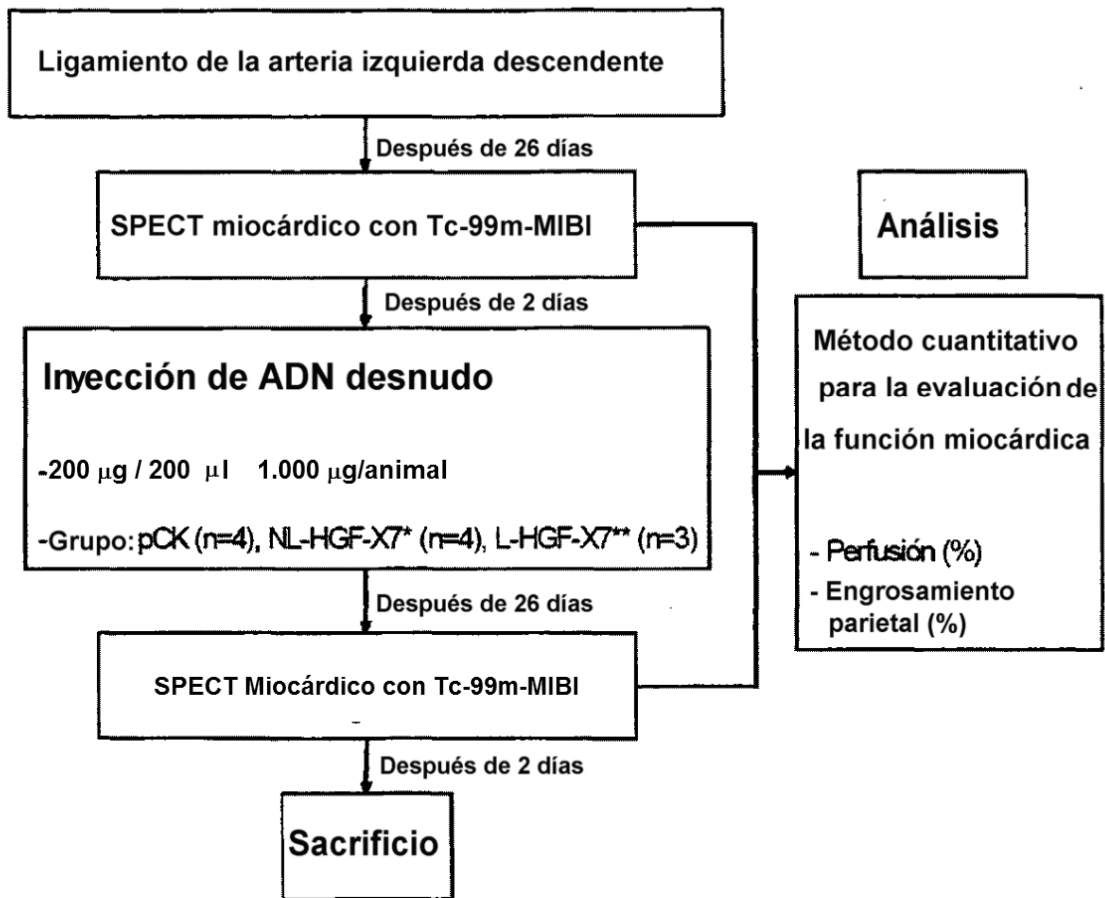


FIG. 3



* NL-HGF-X7: pCK-HGF-X7 no liofilizado que contiene NaCl al 0,9 %

** L-HGF-X7: pCK-HGF-X7 liofilizado que contiene sacarosa al 1,1 % y NaCl al 0,9 %

FIG. 4

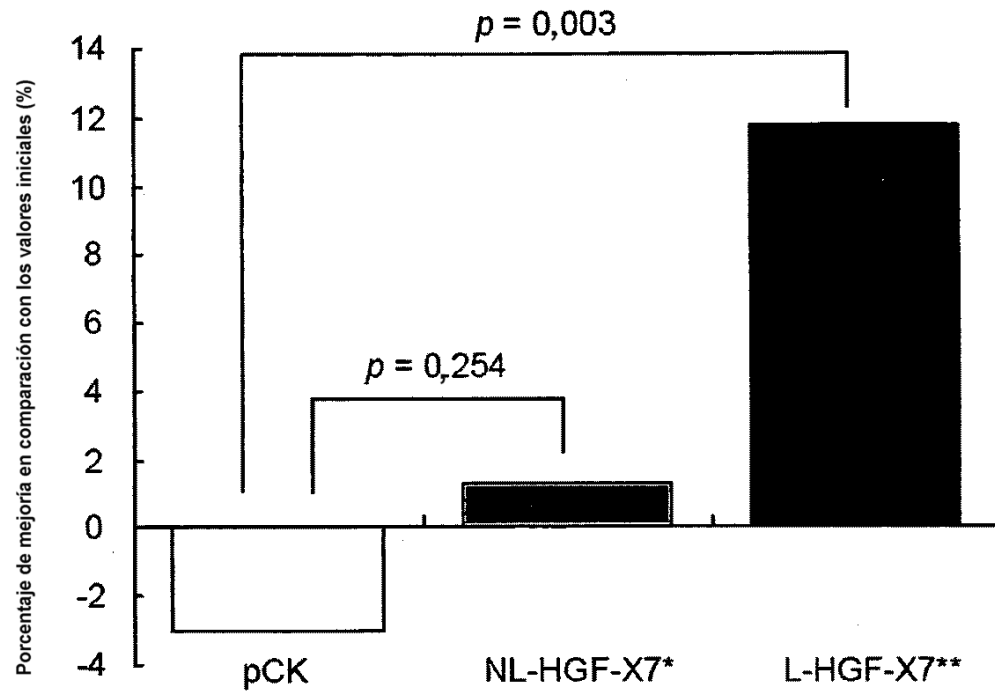


FIG. 5

