

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 155**

51 Int. Cl.:

A61K 38/22 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 7/10 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12R 1/91 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2006 E 06781920 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 1911459**

54 Título: **Promotor de la linfangiogénesis**

30 Prioridad:

28.07.2005 JP 2005219410
29.05.2006 JP 2006148970

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.02.2016

73 Titular/es:

ANGES MG, INC. (100.0%)
7-15 SAITOASAGI 7-CHOME
IBARAKI-SHI, OSAKA 5670085, JP

72 Inventor/es:

MORISHITA, RYUICHI;
KANEDA, YASUFUMI;
NAKAGAMI, HIRONORI y
SAITO, YUKIHIRO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 561 155 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

Promotor de la linfangiogénesis

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a agentes promotores de la linfangiogénesis nuevos que comprenden, como ingredientes activos, a los HGF o ácidos nucleicos que codifican los HGF, y/o a los métodos para promover la linfangiogénesis. La presente invención también se refiere a agentes o a métodos para la prevención o el tratamiento del linfedema. Adicionalmente, la presente invención se refiere a métodos de exploración de compuestos que tienen actividad promotora de la linfangiogénesis, o a compuestos que tienen efectos preventivos o terapéuticos sobre el linfedema.

15 **Técnica antecedente**

Linfedema se refiere a una afección que se caracteriza por la oclusión de los vasos linfáticos lo que, a su vez, provoca congestión anormal de líquido tisular, lo que da como resultado hinchazón, inflamación crónica, y/o fibrosis. Hay linfedemas primarios y secundarios. Los casos conocidos de linfedema primario incluyen a la enfermedad de Milroy, enfermedad de Meige, hipoplasia distal, linfadenopatía obstructiva proximal y linfangiectasia. El linfedema secundario proviene de otra enfermedad; por ejemplo, a menudo aparece como una consecuencia del tratamiento quirúrgico de cánceres. En particular, el linfedema secundario a menudo se produce después de la cirugía o de la radioterapia del cáncer de mama, cáncer de útero, cáncer de próstata, sarcoma de Kaposi y similares. De forma particular, después de la cirugía del cáncer de mama, a menudo el linfedema aparece en las extremidades superiores. El 80 % o más de los casos de linfedema de las extremidades superiores aparecen después de la cirugía del cáncer de mama. Además, se supone que después de la cirugía del cáncer de mama, el linfedema de las extremidades superiores se desarrolla con una frecuencia de varios puntos porcentuales, o más. En contraste con esto, el linfedema de las extremidades inferiores a menudo se observa de forma posterior a la cirugía del cáncer de útero. Además de lo anterior, las infecciones, lesiones tales como lesión por quemadura, inflamaciones y similares, también pueden dar como resultado linfedema secundario.

El linfedema afecta de forma significativa a las funciones motoras y aumenta el riesgo de infección en las áreas afectadas, lo que da como resultado una disminución de la calidad de vida del paciente. Sin embargo, las terapias comunes para el linfedema, tales como el masaje, terapia de ejercicio, y llevar puesto un soporte, simplemente tratan los síntomas; no están disponibles en el momento actual ni métodos de tratamiento ni agentes terapéuticos radicales, y casi no se conocen agentes terapéuticos. Aunque se ha informado que un compuesto denominado "guaifenesina" es eficaz en el tratamiento del linfedema, su efecto terapéutico todavía es poco claro (Documento de Patente 1).

Se ha informado que VEGF-C, un miembro de la familia VEGF, es un factor peptídico que potencia la linfangiogénesis (Documentos de Patente 2 y 3; Documentos no de Patente 1 y 2). Sin embargo, los otros miembros de la familia VEGF no tienen actividad promotora de la linfangiogénesis. El VEGF-C es el único factor promotor de la linfangiogénesis que se conoce actualmente.

Mientras tanto, VEGF₁₆₅ (que también recibe el nombre de "VEGF-A" o, de forma más simple, "VEGF", en lo sucesivo en el presente documento también denominado "VEGF"), es un miembro de la familia VEGF que, como VEGF-C, también es bien conocido como un factor angiogénico; el factor también se conoce como un factor que potencia la permeabilidad vascular (por ejemplo, véase Senger, D. *et al.* Science 219, 983-6 (1983)). De hecho, se ha informado que VEGF induce edema mediante su actividad potenciadora de la permeabilidad vascular cuando se sobreexpresa en tejidos (por ejemplo, véase Isner, JM., *et al.*, Circ. Res. 89: 389-400 (2001)). De hecho, se ha informado que se observa edema en una frecuencia del 30 % o más, en pacientes humanos con enfermedades isquémicas de las extremidades inferiores cuando el gen VEGF se introduce en las áreas isquémicas de las extremidades inferiores de forma intraarterial o intramuscular, con propósito terapéutico (Baumgartner, I. *et al.*, Ann. Intern. Med. 132: 880-884 (2000)). Además, hay muchos informes de riesgo aumentado de edema adjunto a la terapia génica de VEGF, incluyendo un informe que muestra que se observó edema de las extremidades inferiores en seis de nueve pacientes en los que se administró mediante inyección intramuscular en las áreas isquémicas de las extremidades inferiores, un plásmido que codifica VEGF desnudo (Baumgartner, I. *et al.*, Circulation 97: 1114-1123 (1998)), y otro informe que muestra que apareció edema en tres extremidades, cuando se administró de forma intramuscular un plásmido que codificaba VEGF desnudo, en las áreas isquémicas en siete extremidades de seis pacientes con isquemia de las extremidades inferiores, debida a tromboangiitis obliterante (TAO) (Isner, JM., *et al.*, J. Vasc. Surg. 28: 964-975 (1998)).

Además, VEGF-C es un ligando del receptor de VEGF 3 (RVEGF-3), y se sabe que la señal de RVEGF-3 sola, es suficiente para la linfangiogénesis. VEGF-C también se une al RVEGF-2. Puesto que los ratones deficientes en RVEGF-2 mueren de forma más temprana que los ratones deficientes en VEGF-A, se supone que VEGF-C y otros miembros VEGF son capaces de complementar la actividad de VEGF (Scavelli, C. *et al.*, J. Anat. 433-449 (2004)). VEGF ejerce su función a través de la unión al RVEGF-1 y al RVEGF-2. Por lo tanto, se piensa que la activación del

RVEGF-2 induce la potenciación de la permeabilidad vascular (por ejemplo, véase Issbrucker, K. *et al.*, FASEB J. artículo exprés 10.1096/fj.02-0329fje. Publicado en Internet el 18 de diciembre de 2002).

5 HGF es el factor de crecimiento de hepatocitos, y no solo tiene la actividad promotora del crecimiento de hepatocitos, sino que también tiene otras diversas actividades fisiológicas, incluyendo actividad angiogénica (por ejemplo, véase el Documento no de Patente 3). En el momento presente, los HGF se aplican al tratamiento de la enfermedad isquémica, basándose en su actividad angiogénica (Documentos de Patente 4 y 5; Documento no Patente 4).

10 Kajiya K, *et al.*, Journal of Investigative Dermatology 124 (4), Supl. S, página A1 (2005), informan que el factor de crecimiento de hepatocitos promueve la formación y la función de vasos linfáticos.

El documento WO2006/105511 divulga métodos y composiciones para la modulación de la actividad del factor de crecimiento de hepatocitos para regular el desarrollo y la función de vasos linfáticos.

15 Yoon Young-Sup, *et al.*, J. Clin. Invest. 111(5): 717-725. (2003) informan que la terapia génica de VEGF-C aumenta la linfangiogénesis posnatal y mejora el linfedema secundario.

[Documento de Patente 1] documento WO03/000242

20 [Documento de Patente 2] Patente de Estados Unidos n.º 6.818.220

[Documento de Patente 3] Patente de Estados Unidos n.º 6.689.352

[Documento de Patente 4] documento WO97/07824

[Documento de Patente 5] documento WO01/32220

25 [Documento no de Patente 1] Szuba, A. *et al.*, FASEB J. artículo exprés 10.1096/fj.02-0401 fje. Publicado en Internet el 18 de octubre de 2002

[Documento no de Patente 2] Young-sup, Yoo *et al.*, J. Clin. Invest. 111:717-725 (2003)

[Documento no de Patente 3] Nakamura Y. *et al.*, J Hypertens. Sep; 14(9):1067-72 (1996)

[Documento no de Patente 4] Taniyama Y., *et al.*, Gene Therapy 8, 181-189 (2001)

30 **Divulgación de la invención**

Problemas a resolverse mediante la invención

35 La presente invención se logró a la vista de las circunstancias descritas anteriormente. Un objetivo de la presente invención es proporcionar usos nuevos de los HGF y de los genes que codifican los mismos. De forma más específica, un objetivo de la presente invención es proporcionar agentes terapéuticos y métodos de tratamiento nuevos para el linfedema, una afección para la que no hay disponible en el momento presente agente terapéutico o método de tratamiento eficaces.

40 **Medios para resolver los problemas**

45 Los presentes inventores realizaron dedicados estudios para lograr los objetivos descritos anteriormente. Los presentes inventores buscaron factores que podrían reducir o eliminar el linfedema, y encontraron que los HGF reducían el linfedema de forma significativa. Entonces, los presentes inventores descubrieron que los HGF tenían actividad linfangiogénica para inducir el crecimiento de células endoteliales linfáticas.

50 Como se ha descrito anteriormente, hay muchos informes asociando la terapia génica de VEGF con un riesgo aumentado de inducir edema. Por lo tanto, los presentes inventores consideraron que VEGF no es adecuado para el tratamiento del linfedema. Además, puesto que se sugiere que VEGF-C puede potenciar la permeabilidad celular mediante la unión a receptores VEGF que no son RVEGF-3, los presentes inventores consideraron que la aplicación de VEGF-C al tratamiento del linfedema también constituía un riesgo alto.

55 HGF ha sido conocido como un factor angiogénico. VEGF es también conocido como un factor angiogénico, pero se supone que no tiene ni actividad linfangiogénica (véase, por ejemplo, Dev. Biol. 1997, 188: 96-109), ni el efecto de reducción del linfedema, como se describe anteriormente. En vista de lo anterior, los hallazgos nuevos de los presentes inventores, que los HGF tienen actividad linfangiogénica y el efecto de reducción del linfedema, es un descubrimiento notable.

60 Para confirmar la actividad linfangiogénica de los HGF basándose en su mecanismo de acción, los presentes inventores demostraron que c-met, el receptor HGF, se expresaba en células endoteliales linfáticas, y que también se inducía en células endoteliales linfáticas la fosforilación de MAPK y de Akt, que son proteínas de señalización intracelular cuya fosforilación se sabe inducen los HGF.

65 Estos hallazgos demuestran que los HGF y sus genes, son eficaces como agentes terapéuticos o preventivos del linfedema y como agentes promotores de la linfangiogénesis. De forma específica, la presente invención proporciona un vector según se define en las reivindicaciones, para su uso en la prevención o el tratamiento del linfedema; y el

uso de un vector según se define en las reivindicaciones, para la producción de un agente farmacéutico para la prevención o el tratamiento del linfedema.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La Fig. 1 representa una serie de fotografías mostrando los resultados de la tinción de inmunofluorescencia de células endoteliales linfáticas. Los paneles de la parte superior corresponden a la tinción con anticuerpo anti-c-met; los paneles intermedios corresponden a la tinción nuclear con DAPI; y los paneles de la parte inferior constituyen imágenes fusionadas de los dos. Los resultados confirman que todas las células expresaban c-met.
- 10 La Fig. 2 es un gráfico que representa los resultados de un ensayo de MTS que examina el efecto de un HGF de ser humano recombinante sobre la propiedad de crecimiento. El eje vertical indica los valores medidos. Los resultados demuestran que HGF promueve el crecimiento de las células endoteliales linfáticas en una manera dependiente de la concentración.
- 15 La Fig. 3 es un gráfico que representa los resultados de un ensayo de migración que examina los efectos de un HGF de ser humano recombinante sobre la propiedad migratoria. El eje vertical indica el número de células. Los resultados demuestran que el HGF promueve la migración de las células endoteliales linfáticas.
- 20 La Fig. 4 es un gráfico que representa los resultados de un ensayo de MTS que examina el efecto de la introducción de un plásmido de ADNc desnudo en la propiedad de crecimiento. El eje vertical indica los valores medidos. Los resultados demuestran que la introducción del gen HGF es eficaz para promover el crecimiento de las células endoteliales linfáticas.
- 25 La Fig. 5 es un gráfico que representa los resultados de un ensayo promotor de c-fos que examina el efecto de la introducción de un plásmido de ADNc desnudo en la propiedad de crecimiento. El eje vertical indica los valores medidos para la actividad de luciferasa. Los resultados demuestran que la introducción del gen HGF es eficaz para promover el crecimiento de las células endoteliales linfáticas.
- 30 La Fig. 6 es un gráfico que representa los resultados de un ensayo promotor de c-fos, que examina el efecto de la introducción de un plásmido de ADNc desnudo en la propiedad de crecimiento. El eje vertical indica los valores medidos para la actividad de luciferasa. Estos resultados demuestran que el vector de expresión para ADNc de HGF potencia de forma significativa la actividad promotora de c-fos, mientras que el vector de expresión para ADNc de VEGF no potencia la actividad promotora de c-fos.
- 35 La Fig. 7 es una serie de gráficos que demuestran los efectos de HGF en la actividad de crecimiento y migratoria de las células endoteliales linfáticas de ser humano. La Fig. 7A representa los resultados de un ensayo de MTS que examina el crecimiento celular; y la Fig. 7B representa los resultados de un ensayo de migración que examina la actividad migratoria. Cada ensayo se llevó a cabo después de añadir HGF de ser humano recombinante al medio de cultivo de las células endoteliales linfáticas de ser humano, a una concentración de 0, 2, 10 o 50 ng/ml. En la Fig. 7A, el eje vertical indica la absorbancia a 490 nm; y en la Fig. 7B el eje vertical indica el número de células. Estos resultados demuestran que la adición de HGF promueve la actividad de crecimiento y migratoria. * $p < 0,001$ (con respecto a 0 ng/ml del HGF de ser humano recombinante); † $p < 0,001$ (con respecto a 2 ng/ml del HGF de ser humano recombinante).
- 40 La Fig. 8 es un gráfico que representa el efecto de mejora del linfedema del plásmido de expresión para ADNc de HGF, en modelos de rata de linfedema que tienen linfedema en la base de las colas. El eje horizontal indica el tiempo transcurrido después de la cirugía (días), y el eje vertical indica el grosor de la base de la cola (mm). Se inyectaron los grupos de Venus como un control, el grupo HGF y el grupo VEGF con 0,1 ml de 200 μ g de plásmidos de expresión para GFP, HGF y VEGF, respectivamente. El grupo de solución salina fisiológica se inyectó con 0,1 ml de solución salina fisiológica. Los resultados demuestran que la reducción del grosor de la cola se promueve mediante la introducción de ADNc de HGF desnudo y, así, se mejora el linfedema.
- 45 La Fig. 9 es un gráfico obtenido mediante el cálculo del área bajo la curva del gráfico mostrado en la Fig. 8. Los resultados demuestran que el grosor de la cola se redujo de forma significativa solo en el grupo de ratas en las que se introdujo el gen HGF. El eje vertical indica la proporción de área (%) con respecto al control. ‡ $p < 0,0001$ (con respecto a cada uno de los grupos en los que se introdujo el gen VEGF, el grupo de Venus, el grupo de solución salina fisiológica, y el grupo tratado con cirugía solamente).
- 50 La Fig. 10 es una serie de fotografías y gráficos que representan los resultados de la inspección de la linfangiogénesis en los sitios quirúrgicos, después de la introducción del gen HGF o del gen VEGF en modelos de rata de linfedema. La Fig. 10A está compuesta de micrografías de secciones inmunoteñidas de tejido cerca del sitio de inyección del gen, en cada rata. La inmunotinción se llevó a cabo utilizando anticuerpos contra PECAM-1, LYVE-1, Prox1 y c-Met. Los paneles de la parte superior son de ratas en las que se introdujo el gen HGF; los paneles intermedios son de ratas en las que se introdujo el gen VEGF y los paneles de la parte inferior son de las ratas de control inyectadas con solución salina fisiológica. La Fig. 10B está compuesta de gráficos que representan el número de vasos que eran positivos para la inmunotinción con cada anticuerpo. HGF: ratas en las que se introdujo el gen HGF; VEGF: ratas en las que se introdujo el gen VEGF; control: ratas inyectadas con solución salina fisiológica. El eje vertical indica el número de vasos positivos. Estos resultados demuestran que el número de vasos positivos para los marcadores de células endoteliales linfáticas (LYVE-1 y Prox1) está aumentado de forma significativa solamente en las ratas en las que se introdujo el gen HGF; mientras que el número de vasos positivos para el marcador de células endoteliales PECAM-1 está aumentado en las ratas en las que se introdujo el gen HGF y en las ratas en las que se introdujo el gen VEGF, en comparación con el control, pero no hay diferencia significativa. Además, se muestra que el número de vasos positivos para c-Met, en las ratas en las que se introdujo el gen HGF, está aumentado de forma significativa en comparación con el de
- 55
60
65

las ratas en las que se introdujo el gen VEGF, y tiende a estar aumentado en comparación con el control.

La Fig. 11 es una serie de fotografías que representan la fosforilación de MAPK y de Akt, después de la estimulación con HGF de células endoteliales linfáticas derivadas del conducto torácico canino. Las Figs. 11A y 11B representan los resultados de la transferencia de Western utilizando anticuerpos específicos para MAPK fosforilada y Akt fosforilada, respectivamente (cada panel superior). Los paneles inferiores muestran los resultados de la transferencia de Western utilizando anticuerpos específicos para MAPK y Akt, con independencia de su estado de fosforilación. Estos anticuerpos se utilizaron como controles internos para demostrar que las muestras contienen cantidades casi equivalentes de MAPK o Akt.

10 Mejor modo para llevar a cabo la invención

La presente invención se basa en el anteriormente mencionado hallazgo de los presentes inventores, que los HGF activan el crecimiento y la migración de las células endoteliales linfáticas y de este modo promueven la linfangiogénesis.

Adicionalmente, la presente invención se basa en el hallazgo de que los HGF activan el crecimiento y la migración de las células endoteliales linfáticas aisladas de animales adultos, pero no de las fetales y neonatales, y de este modo promueven la linfangiogénesis. Puesto que las células endoteliales linfáticas se diferencian de las venas fetales en una etapa temprana de la embriogénesis, las proteínas marcadoras de células endoteliales linfáticas también se expresan en células endoteliales venosas en la etapa fetal temprana. También se sabe que las células endoteliales linfáticas, adicionalmente, se diferencian en células endoteliales venosas (Wigle J T y Oliver G. Cell, 98: 769-778 (1999)). Por lo tanto, es altamente probable que las células fetales o neonatales estén en una etapa antes de la diferenciación terminal, incluso cuando expresan marcadores de células endoteliales linfáticas. Por lo tanto, es improbable que las células endoteliales linfáticas fetales o neonatales reflejen de forma precisa a las células endoteliales linfáticas de animales adultos. La presente invención demostró el efecto de los HGF en las células endoteliales linfáticas de animales adultos. Por lo tanto, se observó que los HGF y sus genes son eficaces como agentes terapéuticos para pacientes (más particularmente adultos) que padecen linfedema después de la extracción quirúrgica de tejidos cancerosos y/o nódulos linfáticos, para el tratamiento del cáncer y para otros pacientes de linfedema.

Como se define en las reivindicaciones, el ácido nucleico que codifica HGF, utilizado en la presente invención, comprende un ácido nucleico que codifica un HGF que se ha insertado en un vector plasmídico, es decir, pVAX1HGF/MGB1, descrito en SEC ID N°: 5.

Los ácidos nucleicos de la presente invención que codifican HGF, pueden incorporarse en vectores tales como liposomas catiónicos, complejos ligando-ADN, y pistolas génicas. Los ácidos nucleicos pueden estar, por ejemplo, en una forma que estén empaquetados en vectores HVJ-E obtenidos de envolturas de virus Sendai (Kaneda, Y. *et al.*, Mol. Ther. 6, 219-226 (2002)). De forma alternativa, los ácidos nucleicos pueden estar en una forma desnuda.

En la presente invención, los genes HGF se pueden utilizar solos o en combinación con otros genes y/u otros agentes farmacéuticos, según se necesite. En la presente invención, el gen HGF y los genes utilizados en combinación según se necesite, se incorporan en vectores apropiados que aseguran la expresión *in vivo* de los genes, y después se administran en las áreas afectadas de los pacientes.

Cuando se administran los agentes promotores de la linfangiogénesis que comprenden como ingredientes activos ácidos nucleicos que codifican HGF, los expertos en la materia pueden seleccionar fácilmente una vía de administración y dosis adecuadas. Sin embargo, los agentes se administran preferentemente mediante inyección a, y/o alrededor de, las áreas donde se desea la promoción de la linfangiogénesis, en particular mediante inyección intramuscular en los músculos en y/o alrededor de las áreas. Se pueden utilizar otros métodos de administración, siempre que HGF pueda expresarse a partir de los ácidos nucleicos administrados en, y alrededor de, las áreas donde se desea promover la linfangiogénesis.

Cuando un ingrediente activo es un ácido nucleico descrito anteriormente, se puede seleccionar la dosis única del ácido nucleico que es eficaz para promover la linfangiogénesis, o para prevenir o tratar el linfedema, por ejemplo, a partir del intervalo de 0,001 a 10 mg por kg de peso corporal. De forma alternativa, cuando se administra a pacientes humanos, la dosis del ácido nucleico se puede seleccionar, por ejemplo, a partir del intervalo de 0,001 a 50 mg/cuerpo, y la dosis única del ácido nucleico es preferentemente de aproximadamente 0,5 a 50 mg/cuerpo. Sin embargo, la dosis no se limita a las descritas anteriormente.

En una realización preferente, pVAX1HGF/MGB1 descrito en SEC ID N°: 5 disuelto en un tampón fisiológico o un transportador farmacéuticamente aceptable, se inyecta en un paciente ser humano de forma intramuscular al músculo en y/o alrededor de un área donde se desea promover la linfangiogénesis, a una dosis única de 1 mg a 20 mg, preferentemente 1 mg a 10 mg, y más preferentemente 2 mg a 10 mg (por ejemplo, 3 mg a 6 mg, o 2 mg a 4 mg). El agente se puede administrar dos veces o más, preferentemente tres veces o más, a intervalos de aproximadamente 1 a 10 semanas, preferentemente de aproximadamente de 1 a 8 semanas (por ejemplo, 2 a 6 semanas, o 1 a 4 semanas). Cuando se administra a seres humanos, los agentes se pueden administrar, por

ejemplo, de acuerdo con el método que describe Morishita R. *et al.*, *Hypertension* 44(2):203-9 (2004), o un método modificado de forma apropiada del mismo.

5 Los agentes promotores de la linfangiogénesis de la presente invención se pueden utilizar como agentes farmacéuticos para prevenir o tratar el linfedema. Linfedema se refiere a una afección donde la oclusión de los vasos linfáticos provoca la congestión anormal de los líquidos tisulares, dando como resultado hinchazón, inflamación crónica y/o fibrosis. El linfedema, que es una diana para la prevención o tratamiento mediante los agentes promotores de la linfangiogénesis de la presente invención, incluye todas las afecciones que tienen tales síntomas según se describe anteriormente, independientemente de sus nombres. Los agentes promotores de la linfangiogénesis de la presente invención son útiles para prevenir y tratar enfermedades que involucran tales síntomas.

15 En sujetos con alto riesgo de linfedema (por ejemplo, pacientes cuyos nódulos linfáticos han sido extirpados junto con tumores malignos mediante cirugía), el linfedema se puede prevenir mediante la administración de los agentes promotores de la linfangiogénesis de la presente invención.

20 De acuerdo con las reivindicaciones, la invención proporciona medios para prevenir o tratar el linfedema. El sitio de administración puede ser cualquier sitio donde se desee promover la linfangiogénesis. El linfedema también puede tratarse, por ejemplo, mediante la aplicación de los métodos descritos anteriormente a pacientes con linfedema. De forma más específica, según se describe anteriormente, se puede promover la linfangiogénesis mediante la administración de agentes promotores de la linfangiogénesis.

25 Los expertos en la materia pueden administrar los genes HGF de ser humano en las áreas afectadas de pacientes con linfedema, considerando de forma apropiada el propósito. La administración en las áreas afectadas de los pacientes se puede lograr mediante métodos conocidos para los expertos en la materia.

30 En la presente invención, el vector descrito anteriormente se puede administrar solo o en combinación con genes que codifican otros factores linfangiogénicos, o como composiciones en combinación con transportadores farmacéuticamente aceptables y/o aditivos. Cuando se administran en una forma de composición, las realizaciones específicas de genes que codifican otros factores linfangiogénicos, y transportadores farmacéuticamente aceptables y/o aditivos a utilizar en combinación, son como se describe anteriormente.

35 Las áreas afectadas en las que el vector descrito anteriormente se puede administrar no se limitan de forma particular, mientras sean áreas en las que han aparecido los síntomas de linfedema o se predice que aparezcan. Por ejemplo, se puede considerar la administración local en la región superior del brazo, para linfedema de la extremidad superior, que a menudo se observa después de la cirugía de cáncer de mama y similares; de forma alternativa, se puede considerar la administración local en la región femoral para linfedema de extremidad inferior, que se observa a menudo después de la cirugía de cáncer de útero y similares.

40 La dosis es como se describe anteriormente; sin embargo, se modifica dependiendo del tipo de enfermedad, peso del paciente, edad, sexo, y síntomas, propósitos de administración, forma del gen a introducir, y similares. Los expertos en la materia pueden determinar la dosis de forma apropiada.

45 Los sujetos a los que se administra el vector de la presente invención incluyen cualquier mamífero, tal como un mono, perro, y gato, además de al ser humano.

Ejemplos

50 A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá de forma específica con referencia a los Ejemplos, pero no se consideran como limitando a la misma.

Ejemplo 1 Efectos de los HGF en cultivo primario de células endoteliales linfáticas obtenidas del conducto torácico canino

55 (1) Preparación del cultivo primario de células endoteliales linfáticas obtenidas del conducto torácico canino

60 Se prepararon cultivos primarios de células endoteliales linfáticas obtenidas del conducto torácico canino, mediante un método conocido (*Microcirculation* 6, 75-78 (1999)). Perros adultos mestizos (incluyendo machos y hembras; 6 a 12 kg) se sacrificaron por desangrado por la arteria femoral, bajo anestesia. Después, se aislaron los conductos torácicos (10 a 15 cm), y se pusieron en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) fría (4 °C). Se retiraron los tejidos conectivos y los adipocitos. Las ramificaciones de los conductos torácicos se ligaron con hilo de seda esterilizada, y se lavaron los vasos linfáticos con HBSS frío. A continuación, los conductos torácicos se incubaron en una solución de colagenasa (250 U/ml de HBSS) a 37 °C durante 10 minutos. Los conductos se lavaron con MEM conteniendo suero fetal bovino (SFB) al 10 %, y se recogieron las células. Después de retirar la colagenasa mediante centrifugación, se resuspendieron las células en MEM completo suplementado con SFB al 20 % y un antibiótico, y después se cultivaron en placas de 35 mm recubiertas con colágeno tipo I. Las células se cultivaron en

estado húmedo con CO₂ al 5 % a 37 °C. Cuando las células alcanzaron la confluencia, se desprendieron con tripsina/EDTA y se recogieron. Las células endoteliales linfáticas se subclonaron para preparar clones de células endoteliales linfáticas. Las células clonales pudieron pasarse al menos 10 o más veces.

5 Se confirmó que las células endoteliales linfáticas así obtenidas se inmunoteñían con diferentes tipos de anticuerpos específicos de células endoteliales linfáticas (incluyendo anticuerpo anti-RVEGF-3 y anticuerpo anti-Proxl). Además, mediante inmunotinción se confirmó la expresión en estas células de c-met, un receptor de HGF. Este hallazgo nuevo es atribuible a la presente invención (Fig.1).

10 (2) Potenciación de la propiedad de crecimiento mediante un HGF de ser humano recombinante

Se añadió un HGF de ser humano recombinante a una concentración de 0, 2, 10 o 50 ng/ml al medio que contenía las células endoteliales linfáticas obtenidas del conducto torácico canino (70 % o más de confluencia en placas de 96 pocillos), preparadas anteriormente en (1). Después de tres días, se llevó a cabo el ensayo de MTS utilizando el reactivo CellTiter 96 One Solution (Promega). El ensayo se realizó de forma independiente en nueve pocillos para cada concentración. Los resultados se muestran en la Tabla 1 y en la Figura 2.

15

Tabla 1

	HGF 0 ng/ml	HGF 2 ng/ml	HGF 10 ng/ml	HGF 50 ng/ml
n.º 1	0,22	0,257	0,339	0,285
n.º 2	0,203	0,26	0,291	0,299
n.º 3	0,203	0,279	0,344	0,341
n.º 4	0,183	0,248	0,251	0,25
n.º 5	0,208	0,262	0,3	0,301
n.º 6	0,193	0,247	0,338	0,406
n.º 7	0,26	0,367	0,403	0,477
n.º 8	0,288	0,417	0,499	0,503
n.º 9	0,289	0,387	0,549	0,437
Media	0,227	0,303	0,368	0,367
DE	0,041	0,068	0,099	0,092
EE	0,014	0,023	0,033	0,031

20 Incluso en presencia de HGF 2 ng/ml, los valores medidos aumentaron de forma significativa. Estos resultados sugieren que el HGF promueve fuertemente el crecimiento de células endoteliales linfáticas.

(3) Potenciación de la actividad migratoria mediante un HGF de ser humano recombinante

25 (i) Potenciación de la actividad migratoria mediante un HGF recombinante

Se midió la actividad migratoria de las células mediante un método informado de forma previa, utilizando la cámara de Boyden (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 22: 108-114 (2002)). Se recubrió una membrana de policarbonato sin polivinilpirrolidona (PVP), con un tamaño de poro de 8 µm (Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD), con gelatina al 0,1 % y el exceso de gelatina se eliminó utilizando solución salina tamponada con fosfato (PBS). La membrana descrita anteriormente se puso sobre la cámara superior de la cámara de Boyden, que contenía 28 µl de medio EBM2 suplementado con SFB al 1 %, y se añadió a la cámara superior 50 µl del medio conteniendo 10⁶ células endoteliales linfáticas obtenidas del conducto torácico canino, preparadas anteriormente en (1). Se añadió al medio un HGF de ser humano recombinante, a una concentración de 0, 10 o 50 ng/ml. Se cultivaron las células en un estado húmedo con CO₂ al 5 %, a 37 °C durante cuatro horas. Se retiró la membrana, y se desprendieron las células de la superficie superior de la membrana. Se tiñeron las células de la superficie superior de la membrana con el Diff-Quick (Sysmex, Hyogo, Japón) y se contaron. Este ensayo se realizó de forma independiente en tres pocillos para cada concentración de HGF. Los resultados se muestran en la Tabla 2 y en la Fig. 3.

40

Tabla2

	HGF (-)	HGF 10 ng/ml	HGF 50 ng/ml
n.º 1	3	224	271
n.º 2	4	238	307
n.º 3	6	222	254
Media	4,33	228,00	277,33
DE	1,53	8,72	27,06
EE	0,0882	5,033	15,624

La Tabla 2 mostrada anteriormente y la Fig. 3 sugieren que, incluso en presencia de 10 ng/ml de HGF, los valores medidos aumentan de forma significativa y, así, el HGF promueve la migración de las células endoteliales linfáticas.

Los resultados anteriores sugieren que los HGF promueven la linfangiogénesis mediante la promoción del crecimiento y la migración de las células endoteliales linfáticas.

(ii) Potenciación de la actividad migratoria mediante un HGF recombinante paracrina

5 Un plásmido de expresión para ADNc de HGF de ser humano, pVAX1HGF/MGB1 (SEC ID N°: 5), se empaquetó en el vector HVJ-E mediante un método informado de forma previa (Kaneda, Y. *et al.*, Mol. Ther. 6, 219-226 (2002)).

10 Se cultivaron células BHK hasta que alcanzaron la confluencia en placas de 100 mm. Se añadieron al medio de cultivo de las células BHK, 50 HAU del vector que contenía el plásmido y después se introdujeron en las células. Después de 24 horas de cultivo, las células se transfirieron a insertos para placas de 24 pocillos y se cultivaron hasta que estuvieron casi en confluencia.

15 Entre tanto, las células endoteliales linfáticas obtenidas del conducto torácico canino, descritas anteriormente en (1), se cultivaron hasta el 70 % o más de confluencia en placas de 24 pocillos, y se colocaron en los pocillos los insertos que contenían las anteriormente descritas células BHK, en las que se introdujo el plásmido de expresión para ADNc de HGF de ser humano pVAX1HGF/MGB1. Después de 48 horas de cultivo, del mismo modo que se describe anteriormente, las células se sometieron al ensayo de MTS. El ensayo se realizó de forma independiente en seis pocillos para cada muestra. Se utilizaron como un control negativo células tratadas del mismo modo, utilizando un
20 plásmido de expresión de GFP en lugar de un plásmido de expresión para ADNc de HGF de ser humano pVAX1HGF/MGB1. Los resultados se muestran en la Tabla 3 y en la Fig. 4.

Tabla 3

	GFP	HGF
n.º 1	0,260	0,497
n.º 2	0,320	0,451
n.º 3	0,338	0,397
n.º 4	0,272	0,414
n.º 5	0,306	0,440
n.º 6	0,307	0,400
Media	0,301	0,433
DE	0,029	0,038
EE	0,012	0,016

25 Cuando se cocultivaron las células con las células en las que se había introducido el ADNc de HGF, los valores medidos en el ensayo de MTS aumentaron de forma significativa en comparación con el control negativo. Estos resultados demuestran que la introducción del gen HGF es eficaz para promover el crecimiento de células endoteliales linfáticas.

30 Para confirmar adicionalmente la promoción del crecimiento de las células endoteliales linfáticas mediante el HGF, se midió la actividad promotora de c-fos mediante un método informado de forma previa (Hypertension 37(2); 581-586 (2001)).

35 El ensayo se realizó de forma independiente en seis pocillos para cada muestra. Como un control negativo se utilizaron las células tratadas utilizando un plásmido de expresión de GFP, del mismo modo según se describe anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 4 y en la Fig. 5.

Tabla 4

	GFP	HGF
n.º 1	231101	317234
n.º 2	210645	344423
n.º 3	143101	303133
n.º 4	141224	319125
n.º 5	195948	384934
n.º 6	189940	270410
Media	185326,50	323209,83
DE	36327,55	38738,02
EE	14830,66	15814,73

40 Se sabe que la actividad promotora de c-fos correlaciona de forma positiva con la propiedad del crecimiento celular. Por lo tanto, habida cuenta de que el HGF aumenta la actividad promotora de c-fos, es evidente que la introducción del gen HGF es eficaz para promover el crecimiento de las células endoteliales linfáticas.

(5) Comparación de los efectos promotores del crecimiento entre un ADNc de HGF de ser humano y un ADNc de

VEGF en un sistema autocrino

Utilizando Lipofectamina Plus (GIBCO-BRL), para el ensayo promotor de c-fos se introdujo un plásmido de expresión para un ADNc de HGF de ser humano desnudo, pVAX1HGF/MGB1, y un plásmido del gen indicador de luciferasa c-fos (p2FTL), en las células endoteliales linfáticas descritas anteriormente, cultivadas hasta subconfluencia en placas de 6 pocillos (J. Hypertens. 16: 993-1000 (1998)). Después de 24 horas de cultivo, las células se cultivaron en medio de cultivo sin suero durante 24 horas. Después, se determinó la actividad luciferasa mediante un método convencional, y se observó que estaba aumentada. A continuación, utilizando el ADNc de VEGF de ser humano en lugar del ADNc de HGF de ser humano, se llevaron a cabo los mismos experimentos según se describe anteriormente en (4) para comparar los efectos del ADNc de HGF de ser humano y del ADNc de VEGF sobre la actividad promotora de c-fos. El ensayo se realizó de forma independiente en cuatro pocillos para cada muestra. Los resultados se muestran en la Tabla 5 y en la Fig. 6.

Tabla 5

	GFP	VEGF	HGF
n.º 1	28135	9213	120035
n.º 2	19431	14273	80231
n.º 3	6789	3728	46335
n.º 4	9085	2936	39688
Media	15860,00	7537,50	71572,25
DE	9859,20	5287,10	36865,23
EE	4929,599	2643,551	18432,617

Estos resultados sugieren que la introducción del plásmido de expresión para ADNc de HGF aumenta de forma significativa la actividad promotora de c-fos a través de un sistema autocrino de HGF, mientras que el plásmido de expresión para ADNc de VEGF no aumenta la actividad promotora de c-fos y por lo tanto no promueve el crecimiento de las células endoteliales linfáticas.

Los resultados de los experimentos utilizando el sistema de cultivo celular primario descrito anteriormente sugieren que la linfangiogénesis se promueve mediante los HGF, que la linfangiogénesis se puede promover mediante la introducción del gen HGF, y que la introducción de un plásmido de expresión para un ADNc de HGF desnudo, es decir la introducción de un ácido nucleico que codifica un HGF, es eficaz para la promoción.

Además, se utilizaron en el presente Ejemplo células endoteliales linfáticas aisladas de perros adultos, y por lo tanto se ha demostrado que los HGF tienen la actividad descrita anteriormente sobre células endoteliales linfáticas de animales adultos. Esto sugiere que los HGF son útiles como agentes terapéuticos para el linfedema.

Además, para confirmar que la actividad promotora de la linfangiogénesis de HGF de ser humano no era específica para células endoteliales linfáticas caninas, se investigó la actividad promotora del crecimiento de HGF sobre cultivos primarios de células endoteliales aórticas y venosas de perros adultos mestizos, del mismo modo que se describe anteriormente. Como un resultado, se observó que el HGF de ser humano tenía actividad promotora del crecimiento sobre estas células. Además, esta actividad promotora del crecimiento era comparable a la que tiene sobre células de ser humano equivalentes (datos no mostrados). De forma consecuente, los HGF de ser humano también actúan sobre células endoteliales vasculares caninas del mismo modo que sobre las células endoteliales vasculares de ser humano. Estos hallazgos sugieren que la actividad promotora de la linfangiogénesis de los HGF de ser humano, no es específica para células endoteliales linfáticas caninas.

(6) Confirmación de la actividad de HGF sobre células endoteliales linfáticas de ser humano

Se postuló que las células endoteliales linfáticas de ser humano darían los mismos resultados que los obtenidos utilizando las células endoteliales linfáticas aisladas de perros adultos. Para confirmar esta previsión, se ensayó el efecto de HGF sobre las propiedades de crecimiento y migratoria de células endoteliales linfáticas de ser humano (AngioBio Co. (Del Mar, CA)).

Se utilizaron en los experimentos células de los pasajes 5 a 8. Mediante inmunotinción se confirmó que el factor de von Willebrand, el receptor de VEGF-3, Prox1, y c-Met, que son marcadores de células endoteliales linfáticas, se expresaron también en las células (datos no mostrados). Se llevaron a cabo el ensayo de MTS y el ensayo de migración, del mismo modo que los experimentos utilizando células endoteliales linfáticas caninas.

Los resultados del ensayo de MTS y del ensayo de migración se muestran en las Figs. 7A y 7B, respectivamente. La propiedad de crecimiento y migratoria de la célula se aumentaron mediante la adición de HGF de ser humano recombinante. Aumentaron de forma significativa a concentraciones de 10 ng/ml o mayor en comparación con las células sin HGF.

Los resultados confirman el pronóstico inicial de que un HGF promovería la linfangiogénesis de las células

endoteliales linfáticas de ser humano así como la de las células endoteliales linfáticas de perros adultos descritas anteriormente en (1) a (5).

5 Los resultados anteriores sugieren que los HGF tienen actividad promotora de la linfangiogénesis no solo en perros, sino también en otros mamíferos (incluyendo seres humanos).

Ejemplo 2 Efecto de los HGF en modelos de rata de linfedema

10 Basándose en los hallazgos descritos anteriormente, se ensayó el efecto de un HGF en el linfedema utilizando modelos de rata para demostrar el efecto *in vivo*.

(1) Preparación de los modelos de rata de linfedema

15 Los modelos de rata de linfedema se prepararon de acuerdo con Slavin SA *et al.* (Anals of Surgery 229, 421-427 (1999)). Para confirmar la presencia de linfedema en la cola de los modelos de rata, inmediatamente antes de la cirugía se inyectó solución salina fisiológica que contenía colorante Patent Blue al 0,5 %, en una posición apartada varios centímetros de la base de la cola. El día siguiente a la cirugía se diseccionó la región de la cola, y se observó el colorante azul en los vasos linfáticos (datos no mostrados). Además, la base de la cola estaba engrosada de forma evidente en comparación con las ratas de control, y por lo tanto se demostró que las ratas anteriores son
20 útiles como modelos de linfedema.

(2) Efecto mejorador del linfedema de un plásmido de expresión para ADNc de HGF en modelos de rata de linfedema

25 Utilizando los modelos de rata preparados como se describe anteriormente, se investigó el efecto de la introducción del gen HGF de ser humano sobre el linfedema.

Se administraron de forma intramuscular 200 µg (/100 µl) de un plásmido de expresión para un ADNc de HGF de ser humano desnudo, pVAX1HGF/MGB1, y 200 µg (/100 µl) de un plásmido de expresión para un ADNc de VEGF
30 desnudo, y como un control, 200 µg (/100 µl) de un plásmido de la expresión de GFP desnudo (plásmido Venus), uno, siete, y 14 días después de la cirugía. En el grupo con solo cirugía, solo se llevó a cabo cirugía, sin inyección. En el grupo sin cirugía no se llevó a cabo cirugía. En el grupo de solución salina fisiológica, se inyectó de forma intramuscular 100 µl de solución salina fisiológica, uno, siete y 14 días después de la cirugía. Cada siete días hasta el día 35 después de la cirugía, se midió en cada grupo el grosor de la cola. Se probaron cinco ratas en cada grupo y
35 se determinó la media, lo que se muestra en la Fig. 8.

En todos los grupos, después de la cirugía el grosor de la cola aumentó de forma transitoria. Sin embargo, en comparación con los otros grupos, el grosor de la cola disminuyó de forma más rápida y el grado fue mayor
40 solamente en el grupo donde se introdujo ADNc de HGF. Esta diferencia fue significativa después del día 21. Por lo tanto, se observó que el linfedema mejoró mediante la introducción de plásmido de ADNc de HGF desnudo.

Se determinaron las áreas bajo las curvas mostradas en la Fig. 8. El resultado se muestra en la Fig. 9. No hubo diferencia entre las ratas en las que se introdujo el gen VEGF y las ratas en el grupo de control de Venus; sin embargo, se observó que el grosor de la cola disminuía de forma significativa en las ratas en las que se introdujo el
45 gen HGF. Esta disminución en el grosor de la cola afectada con linfedema implica el alivio o la cura del linfedema. Por lo tanto, se demostró claramente que el linfedema se aliviaba o curaba mediante la introducción de un ácido nucleico que codifica un HGF (el gen HGF).

En los días 4, 10 y 17 después de la cirugía, se recogieron muestras de tejido de los sitios quirúrgicos en las colas de las ratas descritos anteriormente, y se determinó el nivel de ARNm de HGF de ser humano mediante RT-PCR en tiempo, real utilizando un método convencional. Como resultado, la expresión de HGF de ser humano se confirmó hasta el día 17 después de la cirugía solamente en el grupo en el que se introdujo el gen HGF de ser humano (datos no mostrados).

55 Además, el día 35 después de la cirugía se detectó mediante inmunotinción en los sitios de inyección, la expresión del marcador de células endoteliales (PECAM-1), de los marcadores de células endoteliales linfáticas (LYVE-1 y Prox1), y de c-met, en las ratas en las que se introdujo el gen HGF, en las ratas en las que se introdujo el gen VEGF, y en las ratas de control inyectadas con solución salina fisiológica. En la Fig. 10 (Fig. 10A), se muestran imágenes de tinción normales. Además, el nivel de expresión de cada marcador se determinó mediante el recuento del número de vasos positivos para inmunotinción en campos microscópicos seleccionados de forma aleatoria, utilizando un
60 método conocido (Yoon YS, *et al.*, J. Clin. Invest. 111: 717-725 (2003)) (Fig. 10B). Este resultado mostró que no había diferencia en el número de vasos positivos para un marcador de células endoteliales, PECAM-1, en las ratas en las que se introdujo el gen HGF y las ratas en las que se introdujo el gen VEGF, en comparación con el control. Por otro lado, los números de vasos positivos para los marcadores de células endoteliales linfáticas, LYVE-1 y Prox1, aumentaron de forma significativa en las ratas en las que se introdujo el gen HGF, mientras que no hubo
65 diferencia entre el control y las ratas en las que se introdujo el gen VEGF. Además, en comparación con el control, el

número de vasos positivos para c-met también tendió a aumentar solo en las ratas en las que se introdujo el gen HGF. Estos resultados confirman que el gen HGF promueve la linfangiogénesis pero que el gen VEGF no lo hace.

Los resultados obtenidos con los modelos de rata de linfedema demostraron que cuando un ácido nucleico que codifica un HGF se inyecta y expresa cerca de sitios afectados con linfedema, se generan vasos linfáticos alrededor de los sitios de inyección. Los modelos de rata pueden reflejar cualquier tipo de linfedema. Por lo tanto, los hallazgos obtenidos en el presente documento con los modelos de rata, que el síntoma de linfedema se alivia o se cura *in vivo* mediante la administración del gen HGF, sugiere que los HGF y sus genes son útiles como agentes terapéuticos para linfedema en mamíferos, incluyendo seres humanos.

Ejemplo 3 Confirmación de la señalización de HGF en células endoteliales linfáticas

Para confirmar el mecanismo de la acción de los HGF anteriormente descrito, se demostró que la fosforilación de MAPK y de Akt, que se sabe que se induce mediante los HGF en células endoteliales vasculares, también se indujo en células endoteliales linfáticas mediante estimulación con HGF. Se sabe que la fosforilación de MAPK y de Akt es imprescindible para el crecimiento de las células endoteliales vasculares, promovido mediante los HGF (Nakagami H., Hypertension 37 [parte 2]: 581-586 (2001)).

Se cambió el medio de cultivo de las células endoteliales linfáticas descritas anteriormente, obtenidas del conducto torácico canino, con MEM conteniendo SFT al 0,5 % o MEM sin SFT, 12 horas o más antes de la adición de un HGF. Se añadió un HGF de ser humano recombinante, en una concentración de 100 ng/ml, y después de 0 a 15 minutos se eliminó el medio y las células se lisaron con tampón de lisis (Tris-Cl 50 mM, EGTA 2,5 mM, EDTA 1 mM, NaF 10 nM, desoxicorticosterona al 1 %, Triton X-100 al 1 %, PMSF 1 nM y vanadato de sodio 2 mM (pH 7,5)). Las moléculas genómicas se rompieron mediante tratamiento por ultrasonido. De acuerdo con un método convencional, se sometieron muestras conteniendo 20 µg de proteínas a SDS-PAGE al 10 %. Después de transferir a membrana de nitrocelulosa se llevó a cabo una transferencia de Western, utilizando un anticuerpo anti-MAPK/ERK, un anticuerpo específico para MAPK/ERK fosforilada (fosfoespecífico; Tyr705 o Ser727), un anticuerpo anti-Akt, y un anticuerpo específico para Akt fosforilada. Los anticuerpos primarios utilizados estaban disponibles de Cell Signaling Technology y otros. La detección hizo utilizando el kit ECL (Amersham).

Los resultados se muestran en la Fig. 11. La Fig. 11A muestra un resultado de la transferencia de Western para MAPK. El resultado demuestra que la fosforilación de las MAPK p44 y p42 está potenciada dentro de los cinco minutos después de la estimulación con HGF. El resultado de Akt se muestra en la Fig. 11B. Del mismo modo, dentro de los cinco minutos después de la estimulación con HGF se potencia la fosforilación de Akt. Cada panel de la parte inferior representa la detección de las MAPK p44 y p42, o de Akt como un control interno.

En las células endoteliales linfáticas también se potenció la fosforilación de MAPK y de Akt, en respuesta a la estimulación con HGF, como se describe anteriormente. Esto sugiere que, en células endoteliales linfáticas, los HGF también inducen, a través de c-met, la misma cascada de fosforilación que en las células endoteliales vasculares. Por lo tanto, se supone que la fosforilación de MAPK y de Akt es una señal imprescindible para el crecimiento de las células endoteliales linfáticas.

Además, se observó que la actividad promotora del crecimiento de las células endoteliales linfáticas de los HGF se reducía mediante los inhibidores MEK U0126 (50 µM) y PD9805 (30 µM), y los inhibidores de PI3 quinasa Ly294002 (50 µM) y wortmanina (100 nM) (datos no mostrados). Este hallazgo también sugiere que la actividad linfangiogénica de los HGF se basa en la inducción a través de c-met de la misma cascada de señales que en las células endoteliales vasculares mediante los HGF.

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona agentes promotores de la linfangiogénesis nuevos. Los agentes promotores de la linfangiogénesis que proporciona la presente invención, comprenden los HGF de ser humano como ingredientes activos.

VEGF-C es un factor peptídico conocido que promueve la linfangiogénesis. Sin embargo, otros miembros VEGF que pertenecen a la familia VEGF no tienen actividad promotora de linfangiogénesis. Solo se sabía que VEGF-C tiene actividad promotora de la linfangiogénesis.

Entre tanto, los HGF, que se ha descubierto en el presente documento que tienen actividad promotora de la linfangiogénesis, son conocidos como factores angiogénicos, como VEGF. Puesto que VEGF no tiene actividad promotora de la linfangiogénesis, los expertos en la materia han supuesto que los HGF tampoco tienen actividad promotora de la linfangiogénesis. Por consiguiente, los hallazgos de la presente invención, que los HGF tienen actividad a linfangiogénica, se consideran un hecho notable.

Además, VEGF-C puede inducir edema a través del entrecruzamiento con RVEGF2; sin embargo, los HGF no tienen tal riesgo. Esta también es una característica notable de los agentes promotores de la linfangiogénesis de la

presente invención. Los agentes promotores de la linfangiogénesis son eficaces para prevenir o tratar el linfedema.

Además, los HGF activan el crecimiento y la migración de células endoteliales linfáticas no aisladas de sistemas fetales o neonatales sino de animales adultos y, de este modo, promueven la linfangiogénesis. La mayoría de los
 5 pacientes que padecen linfedema después de la extracción quirúrgica de tejidos cancerosos y/o de nódulos linfáticos para el tratamiento de cáncer son adultos. Por lo tanto, los agentes de la presente invención son particularmente útiles como agentes terapéuticos para adultos que padecen linfedema después de la extracción quirúrgica de tejidos cancerosos y/o de nódulos linfáticos para el tratamiento del cáncer.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ANGES MG, INC. OSAKA UNIVERSITY

<120> Promotor de la linfangiogénesis

<130> MED-X0501Y1P

<150> JP 2005-219410

<151> 28-07-2005

<150> JP 2006-148970

<151> 29-05-2006

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 2187

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcattcctc 60
ctgctcccca tcgcatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120
gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa 180
accaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt 240
ccattcactt gcaaggcttt tgttttgat 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
agctttttgc cttcgagcta tcggggtaaa gacctacagg aaaactactg tcgaaatcct 540
cgaggggaag aagggggacc ctggtgtttc acaagcaatc cagaggtacg ctacgaagtc 600
    
```

35

tgtgacattc ctcagtgttc agaagttgaa tgcattgacct gcaatgggga gagttatcga 660
 ggtctcatgg atcatacaga atcaggcaag atttgtcagc gctgggatca tcagacacca 720
 caccggcaca aattcttgcc tgaagatat cccgacaagg gctttgatga taattattgc 780
 cgcaatcccc atggccagcc gaggccatgg tgctatactc ttgaccctca caccggctgg 840
 gactactgtg caattaaaac atgcgctgac aatactatga atgacactga tgttcctttg 900
 gaaacaactg aatgcatcca aggtcaagga gaaggctaca ggggcaactgt caataccatt 960
 tggaaatggaa ttccatgtca gcgttgggat tctcagtatc ctcacgagca tgacatgact 1020
 cctgaaaatt tcaagtgcaa ggacctacga gaaaattact gccgaaatcc agatgggtct 1080
 gaatcacctt ggtgttttac cactgatcca aacatccgag ttggctactg ctcccaaatt 1140
 ccaaactgtg atatgtcaca tggacaagat tgttatcgtg ggaatggcaa aaattatag 1200
 ggcaacttat cccaacaag atctggacta acatgttcaa tgtgggacaa gaacatggaa 1260
 gacttacatc gtcatatctt ctgggaacca gatgcaagta agctgaatga gaattactgc 1320
 cgaaatccag atgatgatgc tcattggacc ttgggtctaca cgggaaatcc actcattcct 1380
 tgggattatt gccctatttc tegtgtgaa ggtgatacca cacctacaat agtcaattta 1440
 gaccatcccc taatatcttg tgccaaaacg aaacaattgc gagttgtaaa tgggattcca 1500
 acacgaacaa acataggatg gatggttagt ttgagataca gaaataaaca tatctgcgga 1560
 ggatcattga taaaggagag ttgggttctt actgcacgac agtgtttccc ttctcgagac 1620
 ttgaaagatt atgaagcttg gcttggaaat catgatgtcc acggaagagg agatgagaaa 1680
 tgcaaacagg ttctcaatgt ttcccagctg gtatatggcc ctgaaggatc agatctggtt 1740
 ttaatgaagc ttgccaggcc tgcgtcctg gatgattttg ttagtacgat tgatttacct 1800
 aattatggat gcacaattcc tgaaaagacc agttgcagtg tttatggctg ggctacaact 1860
 ggattgatca actatgatgg cctattacga gggcacatc tctatataat gggaaatgag 1920
 aatgcagcc agcatcatcg agggaagggt actctgaatg agtctgaaat atgtctggtg 1980

ES 2 561 155 T3

gctgaaaaga ttggatcagg accatgtgag ggggattatg gtggcccact tgtttgtgag 2040
 caacataaaa tgagaatggt tcttgggtgc attgttcctg gtcgtggatg tgccattcca 2100
 aatcgtcctg gtatttttgt ccgagtagca tattatgcaa aatggataca caaaattatt 2160
 ttaacatata aggtaccaca gtcatag 2187

<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

10

ES 2 561 155 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp
 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> 4173
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

atgaaggccc ccgctgtgct tgcacctgga atcctcgtgc tctgtttac cttgggtgcag 60

aggagcaatg gggagtgtaa agaggcacta gcaaagtccg agatgaatgt gaatatgaag 120

tatcagcttc ccaacttcac cgcggaaaca cccatccaga atgtcattct acatgagcat 180

cacatittcc ttggtgccac taactacatt tatgttttaa atgaggaaga ccttcagaag 240

gttgctgagt acaagactgg gcctgtgctg gaacaccag attgtttecc atgtcaggac 300

tgcagcagca aagccaattt atcaggaggt gtttggaag ataacatcaa catggctcta 360

gttgctgaca cctactatga tgatcaactc attagctgtg gcagcgtcaa cagagggacc 420

tgccagcgac atgtetticc ccacaatcat actgctgaca tacagtcgga ggttcaactgc 480

atattctccc cacagataga agagcccagc cagtgtcctg actgtgtggt gagcgcctg 540

ggagccaaag tcctttcacc tgtaaaggac cggttcatca acttctttgt aggcaatacc 600

10

ES 2 561 155 T3

ataaattctt cttatttccc agatcatcca ttgcattcga tatcagtggag aaggctaaag 660
 gaaacgaaag atggttttat gtttttgacg gaccagtcct acattgatgt tttacctgag 720
 ttcagagatt cttaccccat taagtatgtc catgcctttg aaagcaacaa ttttatttac 780
 ttcttgacgg tccaaaggga aactctagat gctcagactt ttacacaaag aataatcagg 840
 ttctgttcca taaactctgg attgcattcc tacatggaaa tgcctctgga gtgtattctc 900
 acagaaaaga gaaaaaagag atccacaaag aaggaagtgt ttaatatact tcaggctgag 960
 tatgtcagca agcctggggc ccagcttgct agacaaatag gagccagcct gaatgatgac 1020
 attcttttcg ggggtgttcg acaaagcaag ccagattctg ccgaaccaat ggatgatctc 1080
 gccatgtgtg cattccctat caaatatgtc aacgacttct tcaacaagat cgtcaacaaa 1140
 aacaatgtga gatgtctcca gcatttttac ggaccaaatc atgagcactg ctttaatagg 1200
 acacttctga gaaattcatc aggctgtgaa gcgcgccgtg atgaatatcg aacagagttt 1260
 accacagctt tgcagcgcgt tgacttattc atgggtcaat tcagcgaagt cctcttaaca 1320
 tctatatcca ctttcattaa aggagacctc accatagcta atcttgggac atcagagggt 1380
 cgcttcatgc aggttgtggt ttctcgatca ggaccatcaa ccctcatgt gaattttctc 1440
 ctggactccc atccagtgtc tccagaagtg attgtggagc atacattaaa ccaaaatggc 1500
 tacacactgg ttatcactgg gaagaagatc acgaagatcc cattgaatgg cttgggctgc 1560
 agacatttcc agtctgcag tcaatgecte tctgccccac ctttgttca gtgtggctgg 1620
 tgccacgaca aatgtgtgag atcggaggaa tgctgagcgg ggacatggac tcaacagatc 1680
 tgtctgcctg caatctacaa ggttttccca aatagtgcac cccttgaagg agggacaagg 1740
 ctgaccatat gtggctggga ctttggattt cggaggaata ataaatttga tttaaagaaa 1800
 actagagttc tccttgaaa tgagagctgc accttgactt taagtgagag cacgatgaat 1860
 acattgaaat gcacagttgg tcctgcatg aataagcatt tcaatatgtc cataattatt 1920

ES 2 561 155 T3

tcaaatggcc acgggacaac acaatacagt acattctcct atgtggatcc tgtaataaca 1980
 agtatttcgc cgaaatacgg tcctatggct ggtggcactt tacttacttt aactggaaat 2040
 tacctaaca gtgggaattc tagacacatt tcaattgggtg gaaaaacatg tactttaaaa 2100
 agtgtgtcaa acagtattct tgaatgttat accccagccc aaaccatttc aactgagttt 2160
 gctgttaaat tgaaaattga cttagccaac cgagagacaa gcatcttcag ttaccgtgaa 2220
 gatcccattg tctatgaaat tcatccaacc aaatcttita ttagtggtgg gagcacaata 2280
 acaggtgttg ggaaaaacct gaattcagtt agtgtcccga gaatggatcat aaatgtgcat 2340
 gaagcaggaa ggaactttac agtggcatgt caacatcgct ctaattcaga gataatctgt 2400
 tgtaccactc cticcctgca acagctgaat ctgcaactcc ccttgaaaac caaagccttt 2460
 ttcatgttag atgggatcct ttccaaatac tttgatctca tttatgtaca taatcctgtg 2520
 tttaaacctt ttgaaaagcc agtgatgatc tcaatgggca atgaaaatgt actggaaatt 2580
 aagggaaatg atattgaccc tgaagcagtt aaaggtgaag tgttaaaagt tggaaataag 2640
 agctgtgaga atatacactt acattctgaa gccgttttat gcacggctcc caatgacctg 2700
 ctgaaattga acagcgagct aaatatagag tggaagcaag caatttcttc aaccgtcctt 2760
 ggaaaagtaa tagttcaacc agatcagaat ttacacaggat tgattgctgg tgttgtctca 2820
 atatcaacag cactgttatt actactiggg ttttctctgt ggctgaaaaa gagaaagcaa 2880
 attaaagatc tgggcagtga attagttcgc tacgatgcaa gaggacacac tcctcatttg 2940
 gataggcttg taagtgcccg aagtgtaagc ccaactacag aaatggtttc aatgaaatc 3000
 gtagactacc gagctacttt tccagaagat cagtttctta attcatctca gaacggttca 3060
 tgccgacaag tgcagtatcc tctgacagac atgtcccca tcctaactag tggggactct 3120
 gatatatcca gtccattact gcaaaaatact gtccacattg acctcagtgc tctaaatcca 3180
 gagctggctc aggcagtgca gcatgtagtg attgggcca gtagcctgat tgtgcatttc 3240
 aatgaagtca taggaagagg gcattttggt tgtgtatata atgggacttt gttggacaat 3300

ES 2 561 155 T3

gatggcaaga aaattcactg tgctgtgaaa tccttgaaca gaatcactga cataggagaa 3360
 gtttcccaat ttctgaccga gggaatcatc atgaaagatt ttagtcatcc caatgtcctc 3420
 tcgctcctgg gaatctgcct gcgaagtgaa gggctctccg tggtggctct accatacatg 3480
 aaacaiggag atcttcgaaa ttctattcga aatgagactc ataatccaac tgtaaaagat 3540
 cttattggct ttggtcttca agtagccaaa ggcatgaaat atcttgcaag caaaaagttt 3600
 gtccacagag acttggtgc aagaaactgt atgctggatg aaaaattcac agtcaaggtt 3660
 gctgattttg gtcttgccag agacatgtat gataaagaat actatagtgt acacaacaaa 3720
 acaggtgcaa agctgccagt gaagtggatg gctttgaaa gtctgcaaac tcaaaagttt 3780
 accaccaagt cagatgtgtg gtctttggc gtgctcctct gggagctgat gacaagagga 3840
 gccccacctt atcctgacgt aaacaccttt gatataactg ttactttgtt gcaagggaga 3900
 agactcctac aaccggaata ctgccagac cccttatatg aagtaatgct aaaatgctgg 3960
 caccctaaag cegaaatgcg cccatccttt tctgaactgg tgtcccggat atcagcgatc 4020
 ttctctactt tcattgggga gcactatgtc catgtgaacg ctacttatgt gaacgtaaaa 4080
 tgtgtcgtc cgtatccttc tctgttgca tcagaagata acgctgatga tgaggtggac 4140
 acacgaccag cctccttctg ggagacatca tag 4173

<210> 4
 <211> 1390
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe
 1 5 10 15
 Thr Leu Val Gln Arg Ser Asn Gly Glu Cys Lys Glu Ala Leu Ala Lys
 20 25 30
 Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala

5

10

ES 2 561 155 T3

	35		40		45														
Glu	Thr	Pro	Ile	Gln	Asn	Val	Ile	Leu	His	Glu	His	His	Ile	Phe	Leu				
	50					55					60								
Gly	Ala	Thr	Asn	Tyr	Ile	Tyr	Val	Leu	Asn	Glu	Glu	Asp	Leu	Gln	Lys				
65					70					75					80				
Val	Ala	Glu	Tyr	Lys	Thr	Gly	Pro	Val	Leu	Glu	His	Pro	Asp	Cys	Phe				
				85					90					95					
Pro	Cys	Gln	Asp	Cys	Ser	Ser	Lys	Ala	Asn	Leu	Ser	Gly	Gly	Val	Trp				
			100					105					110						
Lys	Asp	Asn	Ile	Asn	Met	Ala	Leu	Val	Val	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Asp				
	115						120					125							
Gln	Leu	Ile	Ser	Cys	Gly	Ser	Val	Asn	Arg	Gly	Thr	Cys	Gln	Arg	His				
	130					135					140								
Val	Phe	Pro	His	Asn	His	Thr	Ala	Asp	Ile	Gln	Ser	Glu	Val	His	Cys				
145					150					155					160				
Ile	Phe	Ser	Pro	Gln	Ile	Glu	Glu	Pro	Ser	Gln	Cys	Pro	Asp	Cys	Val				
				165					170					175					
Val	Ser	Ala	Leu	Gly	Ala	Lys	Val	Leu	Ser	Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe				
			180					185					190						
Ile	Asn	Phe	Phe	Val	Gly	Asn	Thr	Ile	Asn	Ser	Ser	Tyr	Phe	Pro	Asp				
	195						200					205							
His	Pro	Leu	His	Ser	Ile	Ser	Val	Arg	Arg	Leu	Lys	Glu	Thr	Lys	Asp				
	210					215					220								
Gly	Phe	Met	Phe	Leu	Thr	Asp	Gln	Ser	Tyr	Ile	Asp	Val	Leu	Pro	Glu				
225					230					235				240					
Phe	Arg	Asp	Ser	Tyr	Pro	Ile	Lys	Tyr	Val	His	Ala	Phe	Glu	Ser	Asn				
			245						250					255					
Asn	Phe	Ile	Tyr	Phe	Leu	Thr	Val	Gln	Arg	Glu	Thr	Leu	Asp	Ala	Gln				
		260						265					270						
Thr	Phe	His	Thr	Arg	Ile	Ile	Arg	Phe	Cys	Ser	Ile	Asn	Ser	Gly	Leu				

ES 2 561 155 T3

275					280					285					
His	Ser	Tyr	Met	Glu	Met	Pro	Leu	Glu	Cys	Ile	Leu	Thr	Glu	Lys	Arg
	290					295					300				
Lys	Lys	Arg	Ser	Thr	Lys	Lys	Glu	Val	Phe	Asn	Ile	Leu	Gln	Ala	Ala
305					310					315					320
Tyr	Val	Ser	Lys	Pro	Gly	Ala	Gln	Leu	Ala	Arg	Gln	Ile	Gly	Ala	Ser
				325					330					335	
Leu	Asn	Asp	Asp	Ile	Leu	Phe	Gly	Val	Phe	Ala	Gln	Ser	Lys	Pro	Asp
			340					345					350		
Ser	Ala	Glu	Pro	Met	Asp	Arg	Ser	Ala	Met	Cys	Ala	Phe	Pro	Ile	Lys
		355					360					365			
Tyr	Val	Asn	Asp	Phe	Phe	Asn	Lys	Ile	Val	Asn	Lys	Asn	Asn	Val	Arg
	370					375					380				
Cys	Leu	Gln	His	Phe	Tyr	Gly	Pro	Asn	His	Glu	His	Cys	Phe	Asn	Arg
385					390					395					400
Thr	Leu	Leu	Arg	Asn	Ser	Ser	Gly	Cys	Glu	Ala	Arg	Arg	Asp	Glu	Tyr
				405					410					415	
Arg	Thr	Glu	Phe	Thr	Thr	Ala	Leu	Gln	Arg	Val	Asp	Leu	Phe	Met	Gly
			420					425					430		
Gln	Phe	Ser	Glu	Val	Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Phe	Ile	Lys	Gly
		435					440					445			
Asp	Leu	Thr	Ile	Ala	Asn	Leu	Gly	Thr	Ser	Glu	Gly	Arg	Phe	Met	Gln
	450					455					460				
Val	Val	Val	Ser	Arg	Ser	Gly	Pro	Ser	Thr	Pro	His	Val	Asn	Phe	Leu
465					470					475					480
Leu	Asp	Ser	His	Pro	Val	Ser	Pro	Glu	Val	Ile	Val	Glu	His	Thr	Leu
				485				490					495		
Asn	Gln	Asn	Gly	Tyr	Thr	Leu	Val	Ile	Thr	Gly	Lys	Lys	Ile	Thr	Lys
			500				505						510		
Ile	Pro	Leu	Asn	Gly	Leu	Gly	Cys	Arg	His	Phe	Gln	Ser	Cys	Ser	Gln

515	520	525
Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys		
530	535	540
Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile		
545	550	555
Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu		
565	570	575
Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg		
580	585	590
Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu		
595	600	605
Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys		
610	615	620
Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile		
625	630	635
Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp		
645	650	655
Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly		
660	665	670
Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg		
675	680	685
His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn		
690	695	700
Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe		
705	710	715
Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe		
725	730	735
Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser		
740	745	750
Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn		

755	760	765																			
Ser	Val	Ser	Val	Pro	Arg	Met	Val	Ile	Asn	Val	His	Glu	Ala	Gly	Arg						
770						775					780										
Asn	Phe	Thr	Val	Ala	Cys	Gln	His	Arg	Ser	Asn	Ser	Glu	Ile	Ile	Cys						
785					790					795					800						
Cys	Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Gln	Gln	Leu	Asn	Leu	Gln	Leu	Pro	Leu	Lys						
				805					810						815						
Thr	Lys	Ala	Phe	Phe	Met	Leu	Asp	Gly	Ile	Leu	Ser	Lys	Tyr	Phe	Asp						
			820					825						830							
Leu	Ile	Tyr	Val	His	Asn	Pro	Val	Phe	Lys	Pro	Phe	Glu	Lys	Pro	Val						
		835					840							845							
Met	Ile	Ser	Met	Gly	Asn	Glu	Asn	Val	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Asn	Asp						
850						855						860									
Ile	Asp	Pro	Glu	Ala	Val	Lys	Gly	Glu	Val	Leu	Lys	Val	Gly	Asn	Lys						
865					870					875					880						
Ser	Cys	Glu	Asn	Ile	His	Leu	His	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Cys	Thr	Val						
				885					890						895						
Pro	Asn	Asp	Leu	Leu	Lys	Leu	Asn	Ser	Glu	Leu	Asn	Ile	Glu	Trp	Lys						
			900					905							910						
Gln	Ala	Ile	Ser	Ser	Thr	Val	Leu	Gly	Lys	Val	Ile	Val	Gln	Pro	Asp						
		915					920						925								
Gln	Asn	Phe	Thr	Gly	Leu	Ile	Ala	Gly	Val	Val	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala						
		930				935						940									
Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Phe	Phe	Leu	Trp	Leu	Lys	Lys	Arg	Lys	Gln						
945					950					955					960						
Ile	Lys	Asp	Leu	Gly	Ser	Glu	Leu	Val	Arg	Tyr	Asp	Ala	Arg	Val	His						
				965					970					975							
Thr	Pro	His	Leu	Asp	Arg	Leu	Val	Ser	Ala	Arg	Ser	Val	Ser	Pro	Thr						
			980					985						990							
Thr	Glu	Met	Val	Ser	Asn	Glu	Ser	Val	Asp	Tyr	Arg	Ala	Thr	Phe	Pro						

995				1000				1005						
Glu	Asp	Gln	Phe	Pro	Asn	Ser	Ser	Gln	Asn	Gly	Ser	Cys	Arg	Gln
	1010					1015					1020			
Val	Gln	Tyr	Pro	Leu	Thr	Asp	Met	Ser	Pro	Ile	Leu	Thr	Ser	Gly
	1025					1030					1035			
Asp	Ser	Asp	Ile	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Asn	Thr	Val	His	Ile
	1040					1045					1050			
Asp	Leu	Ser	Ala	Leu	Asn	Pro	Glu	Leu	Val	Gln	Ala	Val	Gln	His
	1055					1060					1065			
Val	Val	Ile	Gly	Pro	Ser	Ser	Leu	Ile	Val	His	Phe	Asn	Glu	Val
	1070					1075					1080			
Ile	Gly	Arg	Gly	His	Phe	Gly	Cys	Val	Tyr	His	Gly	Thr	Leu	Leu
	1085					1090					1095			
Asp	Asn	Asp	Gly	Lys	Lys	Ile	His	Cys	Ala	Val	Lys	Ser	Leu	Asn
	1100					1105					1110			
Arg	Ile	Thr	Asp	Ile	Gly	Glu	Val	Ser	Gln	Phe	Leu	Thr	Glu	Gly
	1115					1120					1125			
Ile	Ile	Met	Lys	Asp	Phe	Ser	His	Pro	Asn	Val	Leu	Ser	Leu	Leu
	1130					1135					1140			
Gly	Ile	Cys	Leu	Arg	Ser	Glu	Gly	Ser	Pro	Leu	Val	Val	Leu	Pro
	1145					1150					1155			
Tyr	Met	Lys	His	Gly	Asp	Leu	Arg	Asn	Phe	Ile	Arg	Asn	Glu	Thr
	1160					1165					1170			
His	Asn	Pro	Thr	Val	Lys	Asp	Leu	Ile	Gly	Phe	Gly	Leu	Gln	Val
	1175					1180					1185			
Ala	Lys	Gly	Met	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ser	Lys	Lys	Phe	Val	His	Arg
	1190					1195					1200			
Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Cys	Met	Leu	Asp	Glu	Lys	Phe	Thr	Val
	1205					1210					1215			
Lys	Val	Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	Asp	Met	Tyr	Asp	Lys	Glu

ES 2 561 155 T3

1220		1225		1230
Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu Pro Val Lys				
1235		1240		1245
Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe Thr Thr Lys				
1250		1255		1260
Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Met Thr				
1265		1270		1275
Arg Gly Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe Asp Ile Thr				
1280		1285		1290
Val Tyr Leu Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro Glu Tyr Cys				
1295		1300		1305
Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp His Pro Lys				
1310		1315		1320
Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser Arg Ile Ser				
1325		1330		1335
Ala Ile Phe Ser Thr Phe Ile Gly Glu His Tyr Val His Val Asn				
1340		1345		1350
Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys Val Ala Pro Tyr Pro Ser Leu				
1355		1360		1365
Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp Asp Glu Val Asp Thr Arg Pro				
1370		1375		1380
Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser				
1385		1390		

<210> 5
 <211> 5181
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: pVAX1HGF/MGB1

10

<400> 5

ES 2 561 155 T3

gctgcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta 60
 atagtaatca attacgggt cattagtcca tagccatat atggagtcc gcgttacata 120
 acttacggta aatggccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgccat tgacgtcaat 180
 aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggacttcc cattgacgtc aatgggtgga 240
 gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc 300
 ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgccagc acatgacctt 360
 atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgtattta ccatgggtgat 420
 gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag 480
 tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc 540
 aaaatgtcgt aacaactccg ccccatgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacgggtgga 600
 ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaaccc actgcttact ggcttatcga 660
 aattaatcg actcactata gggagaccca agctggctag cgtttaact taagcttggc 720
 accgagctcg gatcogccag cccgtccagc agcaacctgt gggtgacca actcctgcca 780
 gcctgctgc tgcagcatgt cctcctgcat ctcctcctgc tccccatgc catcccctat 840
 gcagaggac aaaggaaaag aagaaataca attcatgaat tcaaaaaatc agcaaagact 900
 accctaatca aatagatcc agcactgaag ataaaaacca aaaaagtga tactgcagac 960
 caatgtgcta atagatgtac taggaataaa ggacttccat tcacttgcaa ggcttttgtt 1020
 ttigataaag caagaaaaca atgcctctgg ttccccttca atagcatgtc aagtggagtg 1080
 aaaaaagaat ttggccatga atttgacctc tatgaaaaca aagactacat tagaaactgc 1140
 atcattggta aaggacgcag ctacaaggga acagtatcta tcactaagag tggcatcaaa 1200
 tgtcagccct ggagttccat gataccacac gaacacagct tttgccttc gagctatcgg 1260
 ggtaaagacc tacaggaaaa ctactgtcga aatcctcgag ggaagaagg gggaccctgg 1320
 tgtttcacaa gcaatccaga ggtacgctac gaagtctgtg acattcctca gtgttcagaa 1380

ES 2 561 155 T3

gttgaatgca tgacctgcaa tggggagagt tatcgaggtc tcatggatca tacagaatca 1440
 ggcaagattt gtcagcgtg ggatcatcag acaccacacc ggcacaaatt cttgectgaa 1500
 agatatcccg acaagggctt tgatgataat tattgccgca atccccgatgg ccagccgagg 1560
 ccatgggtgt atactcttga cccacacacc cgctgggagt actgtgcaat taaaacatgc 1620
 gctgacaata ctatgaatga cactgatggt cctttggaaa caactgaatg catccaaggt 1680
 caaggagaag gctacagggg cactgtcaat accatttga atggaattcc atgtcagcgt 1740
 tgggattctc agtatcctca cgagcatgac atgactcctg aaaatttcaa gtgcaaggac 1800
 ctacgagaaa attactgccg aaatccagat gggcttgaat caccctgggtg tttaccact 1860
 gatccaaaca tccgagttgg ctactgctcc caaattccaa actgtgatat gtcacatgga 1920
 caagattgtt atcgtgggaa tggcaaaaat tatatgggca acttatccca aacaagatct 1980
 ggactaacat gttcaatgtg ggacaagaac atggaagact tacatcgtca tatcttctgg 2040
 gaaccagatg caagtaagct gaatgagaat tactgccgaa atccagatga tgatgctcat 2100
 ggaccctggg gctacacggg aaatccactc attccttggg attattgccc tatttctcgt 2160
 tgtgaagggtg ataccacacc tacaatagtc aatttagacc atccccgtaat atcttgtgcc 2220
 aaaacgaaac aattgcgagt tgtaaatggg attccaacac gaacaaacat aggatggatg 2280
 gttagtttga gatacagaaa taaacatatc tgcggaggat cattgataaa ggagagttgg 2340
 gttcttactg caccacagtg tttcccttct cgagacttga aagattatga agcttggctt 2400
 ggaattcatg atgtccacgg aagaggagat gagaaatgca aacaggttct caatgtttcc 2460
 cagctggtat atggccctga aggatcagat ctggttttaa tgaagcttgc caggcctgct 2520
 gtcttggatg attttgttag tacgattgat ttacctaat atggatgcac aattcctgaa 2580
 aagaccagtt gcagtgttga tggctggggc tacactggat tgatcaacta tgatggccta 2640
 ttacgagtgg cacatctcta tataatggga aatgagaaat gcagccagca tcatcgaggg 2700

ES 2 561 155 T3

aaggtgactc tgaatgagtc tgaatatgt gctggggctg aaaagattgg atcaggacca 2760
tgtgaggggg attatggtgg cccacttgtt tgtgagcaac ataaaatgag aatggttctt 2820
gggtgcattg ttcttggtcg tggatgtgcc attccaaatc gtccctggat ttttgtccga 2880
gtagcatatt atgcaaatg gatacacaaa attatthta catataaggt accacagtca 2940
tagctgttaa cccgggtoga agcggccgct cgagtctaga gggcccgttt aaaccgctg 3000
atcagcctcg actgtgcctt ctagttgcca gccatctgtt gtttcccct cccccgtgcc 3060
ttccttgacc ctggaagggtg cactcccac tgcctttcc taataaatg aggaaattgc 3120
atgcattgt ctgagtaggt gtcattctat tctgggggtt ggggtggggc aggacagcaa 3180
gggggaggat tgggaagaca atagcaggca tgctggggat gcggtgggct ctatggcttc 3240
tactgggagg ttttatggac agcaagcga ccggaattgc cagctggggc gccctctggt 3300
aaggttggga agccctgcaa agtaaaactgg atggctttct tgccccaag gatctgatgg 3360
cgcaggggat caagctctga tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgcac gattgaacaa 3420
gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg 3480
gcacaacaga caatcggtg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggc 3540
ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca agacgaggca 3600
gcgcggctat cgtggctggc caccagggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgc 3660
actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcaagtgc cggggcagga tctcctgtca 3720
tctcacctg ctctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggtgcat 3780
acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca 3840
cgtactcggg tggagccgg tcttgcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg 3900
ctcgcgccag ccgaactgtt cggcaggctc aaggcgagca tgcccagcg cgaggatctc 3960
gtcgtgacce atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgctttct 4020
ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggt 4080

ES 2 561 155 T3

acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctc cgtgctttac 4140
 ggatcgcgcg ctcccgattc gcagcgcacg gccttctatc gccttcttga cgagttcttc 4200
 tgaattatta acgcttaca tttcctgatg cggatatttc tccttacgca tctgtgcggt 4260
 attcacacc gcatcagggt gcacttttcg gggaaatgtg cgeggaacct ctatttgttt 4320
 atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataacct gataaatgct 4380
 tcaataatag cacgtgctaa aacttcattt ttaatttaa aggatctagg tgaagatcct 4440
 tttgataat ctcgatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga 4500
 ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg 4560
 ctgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggiggittgt ttgccggatc aagagctacc 4620
 aactctttt cegaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgttcttct 4680
 agtgtagccg tagttaggcc accaattcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc 4740
 tctgctaate ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt 4800
 ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctc ggctgaacgg ggggttcgtg 4860
 cacacagccc agcttggagc gaacgacct caccgaactg agatacctac agcgtgagct 4920
 atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag 4980
 ggtcggaaaca ggagagcgcg cgagggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag 5040
 tcctgtcggg tttgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg 5100
 gcgagccta tggaaaaacg ccagcaacgc gcccttttta cggttcctgg ccttttgctg 5160
 gccttttgct cacatgttct t 5181

<210> 6
 <211> 7681
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia pcADN3.1(-)HGF

<400>6

5

10

ES 2 561 155 T3

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtgcactct cagtacaate tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggtag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300
tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggcccggc tggctgaccg cccaacgacc 360
cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttccatagt aacgccaata gggactttcc 420
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 480
atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
atgccagta catgacctta tgggactttc ctactiggca gtacatctac gtattagtca 600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg tttggcacc 720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcactatag ggagacccaa gctggctagc 900
gtttaaacgg gccctctaga ctcgagcggc cgetctagaa ctagctggat cctgccagcc 960
cgtccagcag caccatgtgg gtgaccaaac tctgccagc cctgctgctg cagcatgtcc 1020
tctgcatct cctctgctc cccatcgcca tcccctatgc agagggacaa aggaaaagaa 1080
gaaatacaat tcatgaattc aaaaaatcag caaagactac cctaatacaa atagatccag 1140
cactgaagat aaaaaccaa aaagtgaata ctgcagacca atgtgctaata agatgtacta 1200
ggaataaagg acttcattc acttgcaagg cttttgtttt tgataaagca agaaaacaat 1260

ES 2 561 155 T3

gcctctggtt ccccttcaat agcatgtcaa gtggagttaa aaaagaattt ggccatgaat 1320
 ttgacctcta tgaaaacaaa gactacatta gaaactgcat cattggtaaa ggacgcagct 1380
 acaagggaac agtatctatc actaagagtg gcatcaaatg tcagccctgg agttccatga 1440
 taccacacga acacagcttt ttgccttcga gctatcgggg taaagaccta caggaaaact 1500
 actgtcgaaa tcctcgaggg gaagaagggg gaccctggtg tttcacaagc aatccagagg 1560
 tacgctacga agtctgtgac attcctcagt gttcagaagt tgaatgcatg acctgcaatg 1620
 gggagagtta tcgaggtctc atggatcata cagaatcagg caagatttgt cagcgctggg 1680
 atcatcagac accacaccgg cacaaattct tgccitgaaag atatcccagc aagggccttg 1740
 atgataatta ttgccgcaat cccgatggcc agccgaggcc atggtgctat actcttgacc 1800
 ctcacaccgg ctgggagtac tgtgcaatta aaacatgccc tgacaatact atgaatgaca 1860
 ctgatgttc tttggaaca actgaatgca tccaaggtca aggagaagge tacaggggca 1920
 ctgtcaatac catttggaaat ggaattccat gtcagcgttg ggattctcag tctctcagc 1980
 agcatgacat gactcctgaa aatttcaagt gcaaggacct acgagaaaat tactgccgaa 2040
 atccagatgg gtctgaaatc ccctggtgtt ttaccactga tccaaacatc cgagttggct 2100
 actgtcctca aattccaaac tgtgatatgt cacatggaca agattgttat cgtgggaatg 2160
 gcaaaaatta tatgggcaac ttatcccaa caagatctgg actaacatgt tcaatgtggg 2220
 acaagaacat ggaagactta catcgtcata tcttctggga accagatgca agtaagctga 2280
 atgagaatta ctgccgaaat ccagatgatg atgctcatgg acctgggtgc tacacgggaa 2340
 atccactcat tccttgggat tattgcccta tttctcgttg tgaaggatgat accacaccta 2400
 caatagtcaa tttagacat cccgtaatat cttgtgcca aacgaaacaa ttgagagttg 2460
 taaatgggat tccaacacga acaaacatag gatggatggt tagtttgaga tacagaaata 2520
 aacatatctg cggaggatca ttgataaagg agagttgggt tcttactgca cgacagtgtt 2580

ES 2 561 155 T3

tcccttctcg agacttgaaa gattatgaag cttggcttgg aattcatgat gtccacggaa 2640
 gaggagatga gaaatgcaaa caggttctca atgttttcca gctggtatat ggccctgaag 2700
 gatcagatct ggttttaatg aagcttgcca ggccctgctgt cdtggatgat tttgtagta 2760
 cgattgattt accttaattat ggatgcacaa ttcctgaaaa gaccagttgc agtgtttatg 2820
 gctggggcta cactggattg atcaactatg atggcctatt acgagtggca catctctata 2880
 taatgggaaa tgagaaatgc agccagcatc atcgagggaa ggtgactctg aatgagctg 2940
 aaatatgtgc tggggctgaa aagattggat caggaccatg tgagggggat tatggtggcc 3000
 cacttgtttg tgagcaacat aaaatgagaa tggttcttgg tgcattggt cctggtcgtg 3060
 gatgtgcat tccaaatcgt cctggatatt ttgtccgagt agcatattat gcaaaatgga 3120
 tacacaaaat tattttaaca tataaggtae cacagtcata gctgttaacc cgggtcgaag 3180
 cggccgccac tgtgctggat atctgcagaa ttcaccaca ctggactagt ggatccgagc 3240
 tcggtacca gcttaagttt aaaccgctga tcagcctega ctgtgecttc tagttgccag 3300
 ccactctgtt tttgccctc ccccgctcct tcttgacce tggagggtgc cactcccact 3360
 gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc tgagtaggtg tcattctatt 3420
 ctggggggtg ggggtgggca ggacagcaag ggggaggatt ggaagacaa tagcaggcat 3480
 gctggggatg cgggtgggctc tatggcttct gaggcggaaa gaaccagctg gggctctagg 3540
 gggtatcccc acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt ggttacgcgc 3600
 agcgtgaccg ctacacttgc cagcgccta gcgccectc ctttcgcttt ctteccctcc 3660
 ttctcgcca cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct cccttaggg 3720
 ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac cccaaaaaac ttgattaggg tgatggttca 3780
 cgtagtgggc catcgccctg atagacgggt ttctgcctt tgacgttga gtccacgttc 3840
 tttaatagt gactcttgtt ccaaactgga acaacactca accctatctc ggtctattct 3900
 tttgatttat aagggtttt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga gctgatttaa 3960

ES 2 561 155 T3

caaaaattta acgcgaatta attctgtgga atgtgtgtca gttaggggtg ggaaagtccc 4020
caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatct caattagtca gcaaccaggt 4080
gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt 4140
cagcaacat agtccccccc ctaactccgc ccataccgcc cctaactccg cccagttccg 4200
cccattctcc gccccatggc tgactaattt tttttattta tgcagaggcc gaggccgcct 4260
ctgcctctga gtattccag aagtagtgag gaggcttttt tggaggccta ggcttttgca 4320
aaaagctccc gggagcttgt atatccattt tggatctga tcaagagaca ggatgaggat 4380
cgtttcgcat gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga 4440
ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc 4500
ggctgtcagc gcaggggccc ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga 4560
atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat cgtggctggc cagcagggc gttccttgcg 4620
cagctgtgct cgacgttgic actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcaagtgc 4680
cggggcagga tctcctgtca tctcacttg ctctgccga gaaaglatcc atcatggctg 4740
atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga 4800
aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga tggaaagcgg tcttgtgat caggatgatc 4860
tggacgaaga gcatcagggg ctgcgccag ccgaactggt cgccaggctc aaggcgcgca 4920
tgcccagcgg cgaggatctc gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgccc aatatcatgg 4980
tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct 5040
atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg 5100
accgcttct cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcate gccttctate 5160
gccttcttga cgagttcttc tgagcgggac tctggggttc gaaatgaccg accaagcgac 5220
gcccacctg ccatcacgag atttcgatte caccgccgcc ttctatgaaa ggttgggctt 5280

ES 2 561 155 T3

eggaatcgtt ttccgggacg ccggctggat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga 5340
 gttcttcgcc caccccaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat aaagcaatag 5400
 catcacaat ttcacaaata aagcattttt ttactgcat tctagttgtg gtttgtccaa 5460
 actcatcaat gtatcttate atgtctgtat accgtcgacc tctagctaga gcttggcgta 5520
 atcatggtea tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctacacaattc cacacaacat 5580
 acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagtggact aactcacatt 5640
 aattgcgttg cgtcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta 5700
 atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg ttgctgtatt gggcgtcttt ccgcttctc 5760
 gctcactgac tcgctgcgct cggctgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaaa 5820
 ggcgtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 5880
 aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa gcccgcgttg ctggcgtttt tccataggct 5940
 ccgccccct gacgagcacc acaaaaaatcg acgtcaagt cagaggtggc gaaacccgac 6000
 aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaaactcc ctctgtcgtc ctctgttcc 6060
 gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc 6120
 tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg 6180
 tgtgcaegaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccgtaact atcgtcttga 6240
 gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag 6300
 cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggtgacct actacggcta 6360
 cactagaaga acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag 6420
 agttggtagc tcttgatccg gcaaacaac caccgctggg agcggttttt ttgtttgcaa 6480
 gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat ctttgatct tttctacggg 6540
 gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa 6600
 aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaatcaa tctaaagtat 6660

ES 2 561 155 T3

atatgagtaa acttggctctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc 6720
 gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat 6780
 acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc 6840
 ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgggcc 6900
 tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag 6960
 ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtcaccg 7020
 ctgctggtt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaagge gagttacatg 7080
 atccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctctctcggt cctccgatcg ttgicagaag 7140
 taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt 7200
 catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga 7260
 atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgtoa atacgggata ataccgcgcc 7320
 acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaagt tcttcggggc gaaaactctc 7380
 aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaacct actcgtgcac ccaactgatc 7440
 ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc 7500
 cgcaaaaaag ggaataaggc cgacacggaa atgttgaata ctcatctct tctttttca 7560
 atattattga agcatttacc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat 7620
 ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt 7680
 c 7681

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector para uso en la prevención o el tratamiento del linfedema, el cual es un vector de expresión de mamíferos en el que se ha insertado un ácido nucleico que codifica un HGF, donde el vector comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 5.
- 10 2. Uso de un vector de expresión de mamíferos en el que se ha insertado un ácido nucleico que codifica un HGF, en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento del linfedema, donde el vector comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 5.
- 15 3. El vector para uso de la reivindicación 1, donde el vector es para administración mediante inyección intramuscular a, o alrededor de, un área afectada en un sujeto.
4. El uso de la reivindicación 2, donde el vector es para administración mediante inyección intramuscular a, o alrededor de, un área afectada en un sujeto.
5. El vector para uso de la reivindicación 1, donde el linfedema es linfedema secundario.
- 20 6. El vector para uso de la reivindicación 5, donde el linfedema es posterior a la extracción quirúrgica de tejidos cancerosos y/o nódulos linfáticos para el tratamiento del cáncer.
7. El uso de la reivindicación 2, donde el linfedema es linfedema secundario.
- 25 8. El uso de la reivindicación 7, donde el linfedema es posterior a la extracción quirúrgica de tejidos cancerosos y/o nódulos linfáticos para el tratamiento del cáncer.

FIG. 1

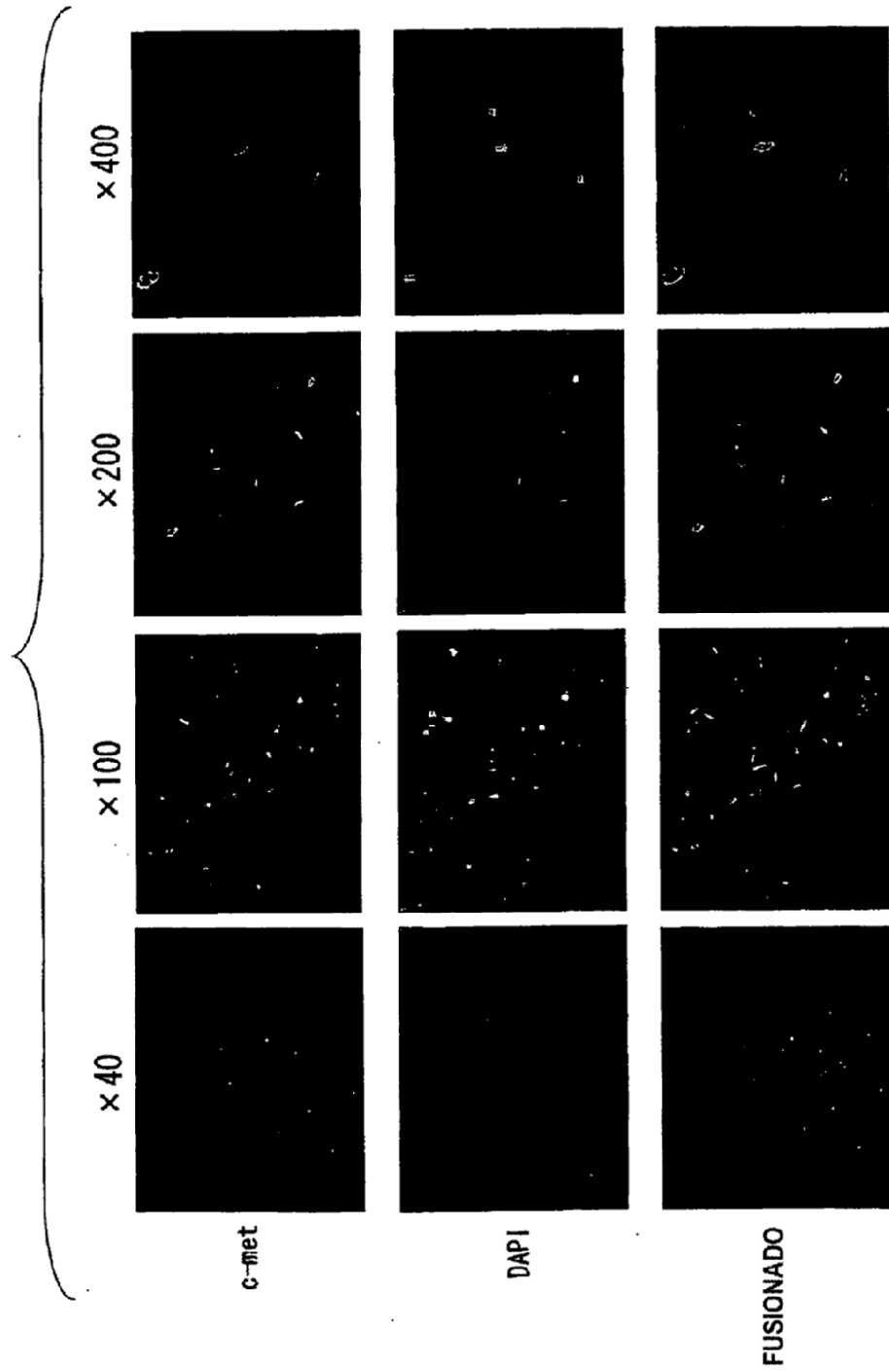


FIG. 2

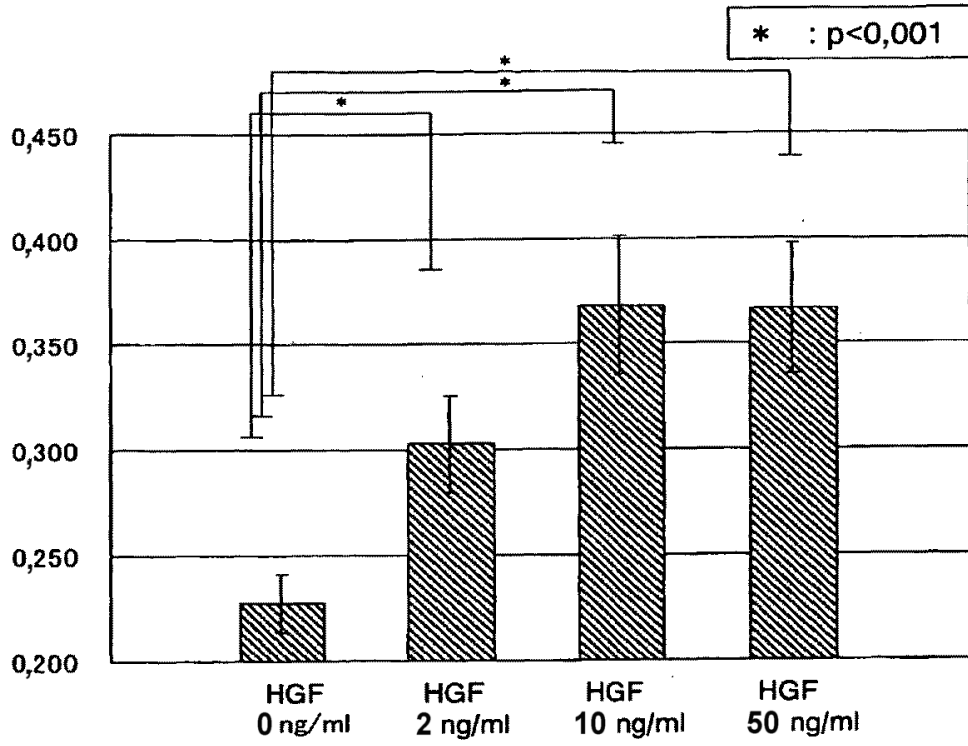


FIG. 3

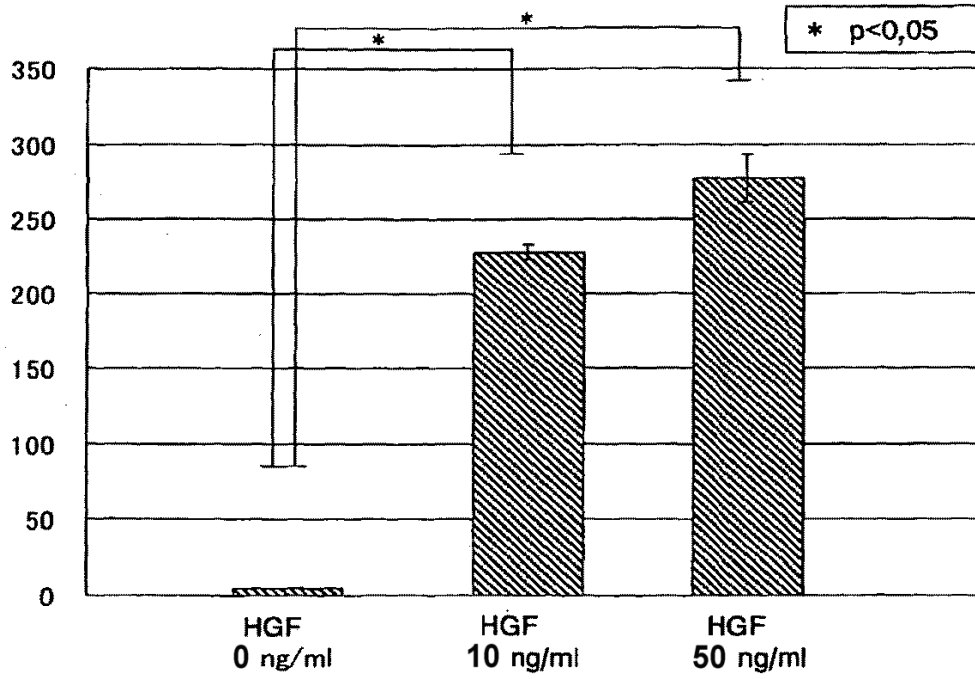


FIG. 4

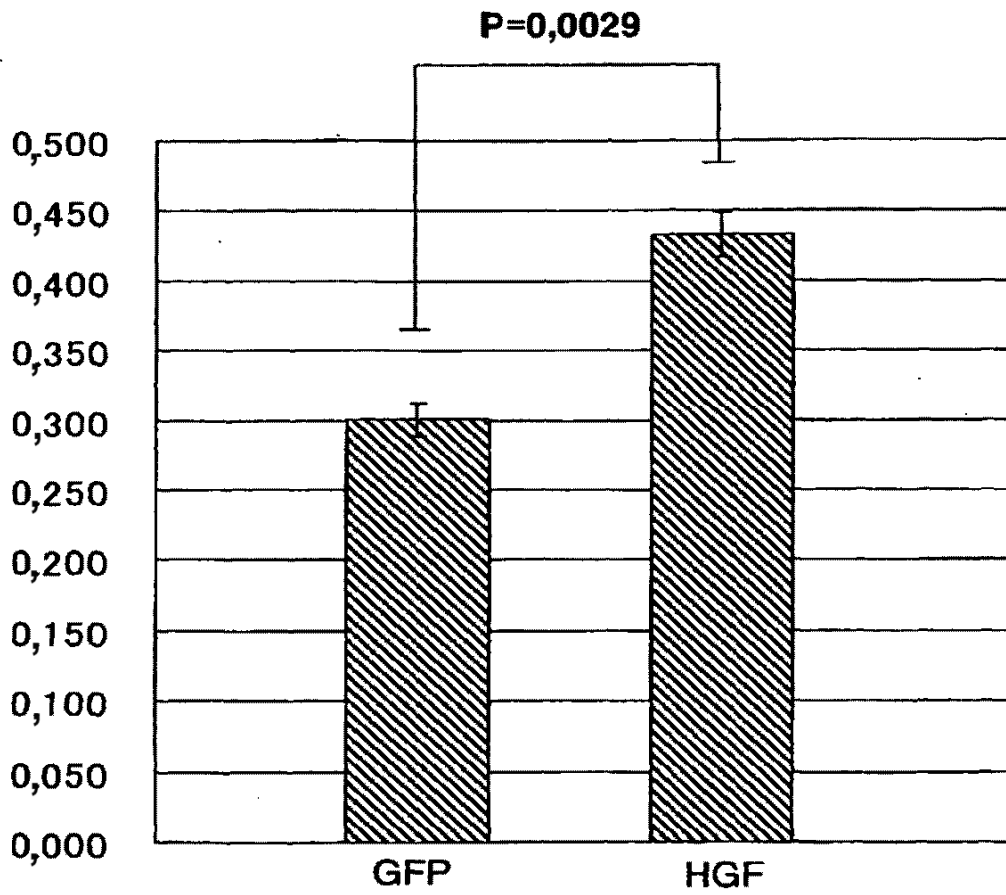


FIG. 5

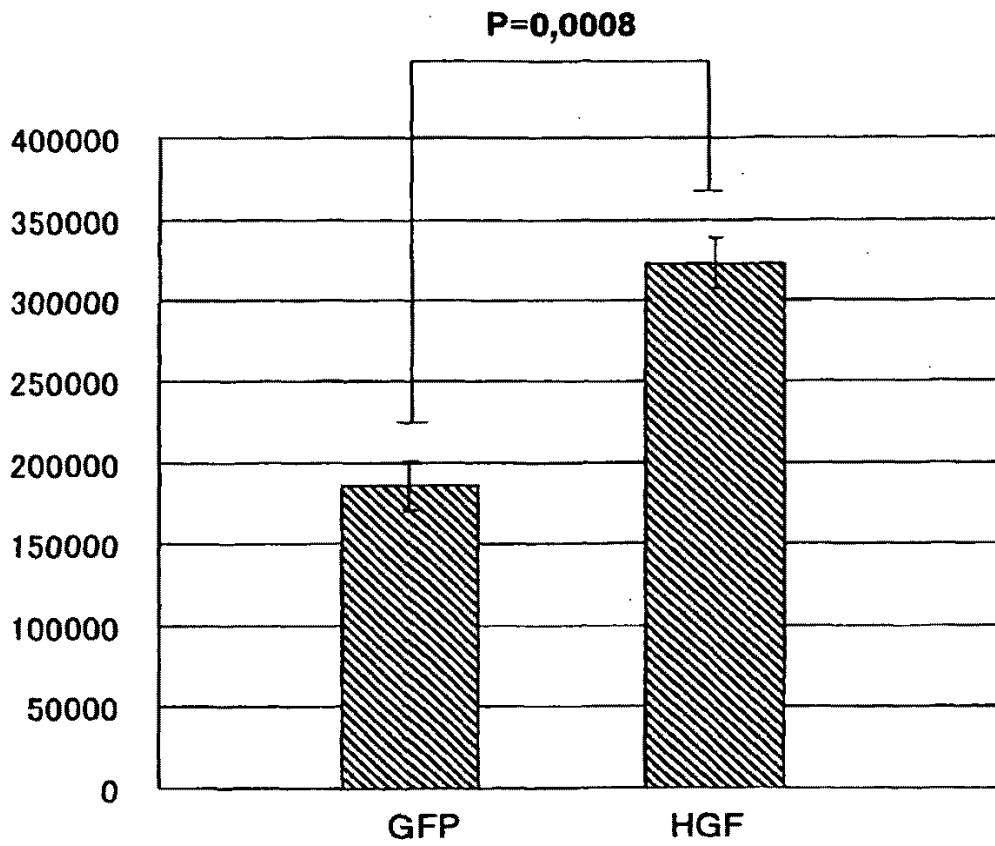


FIG. 6

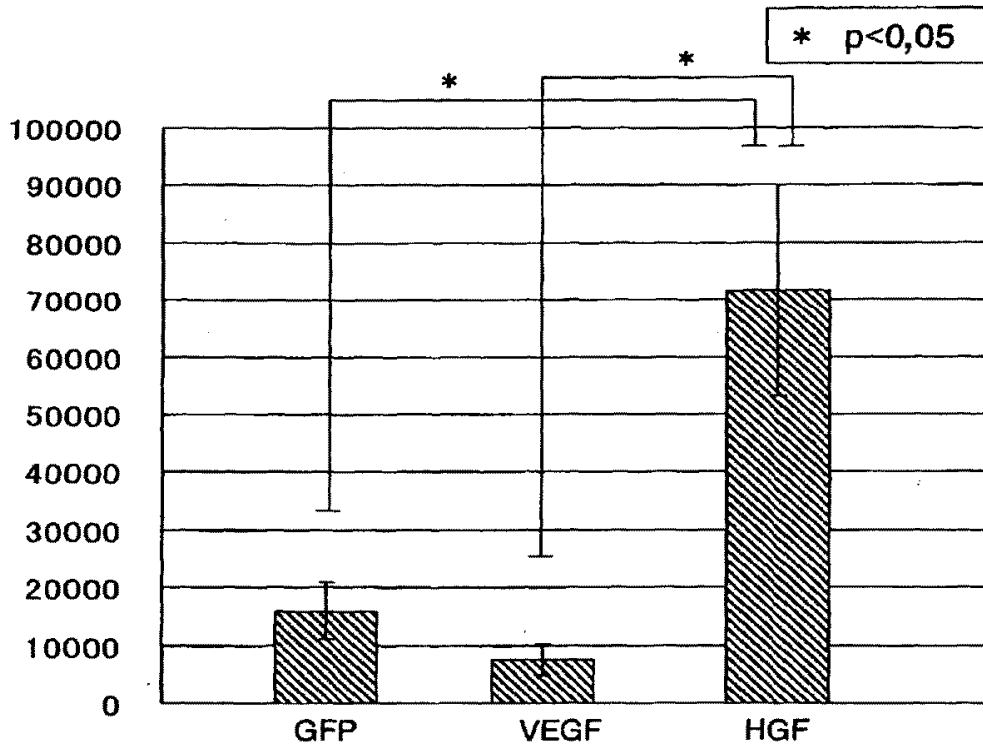


FIG. 7

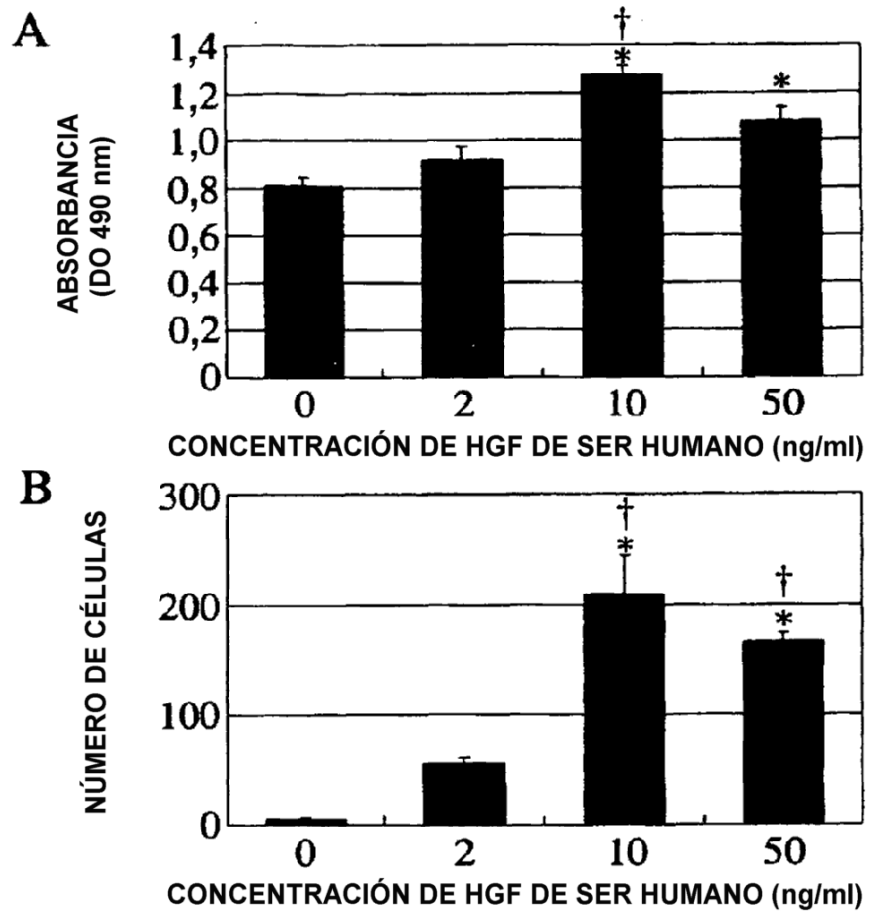


FIG. 8

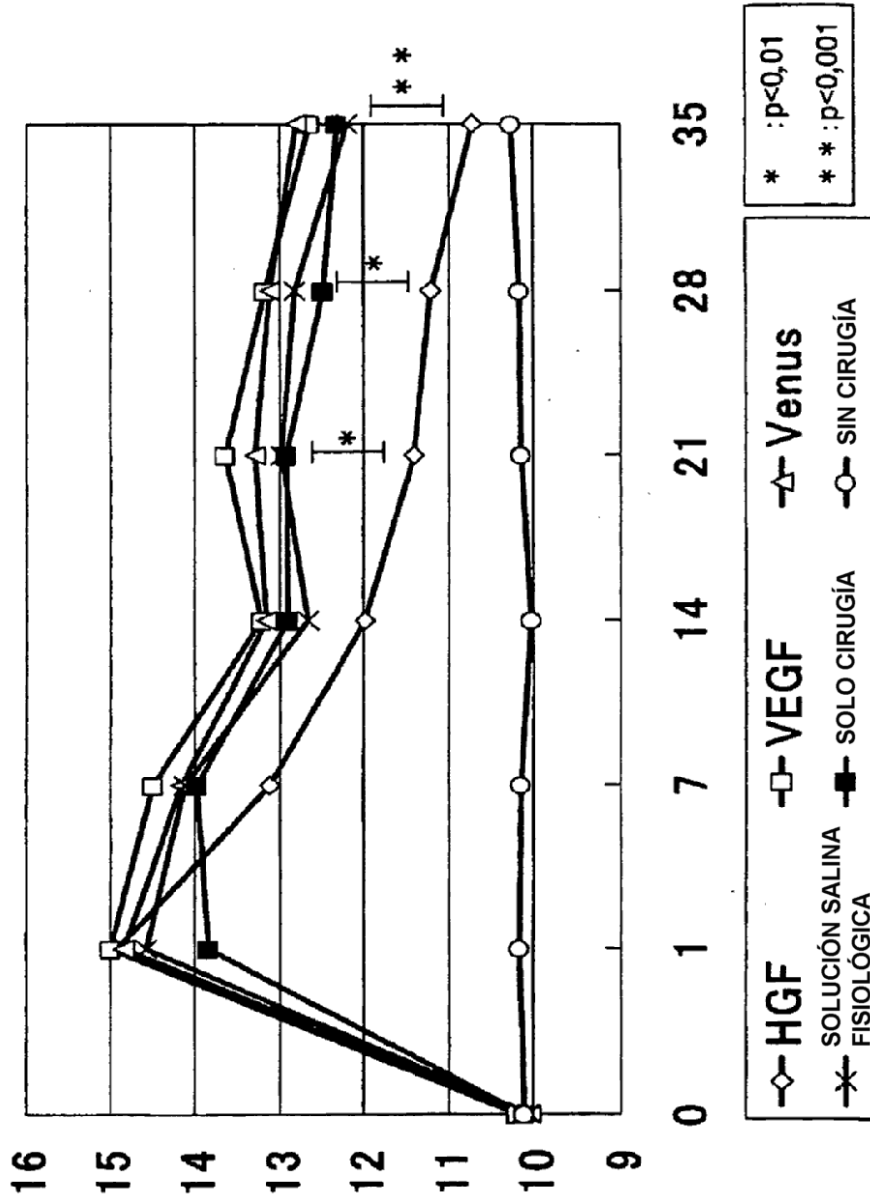


FIG. 9

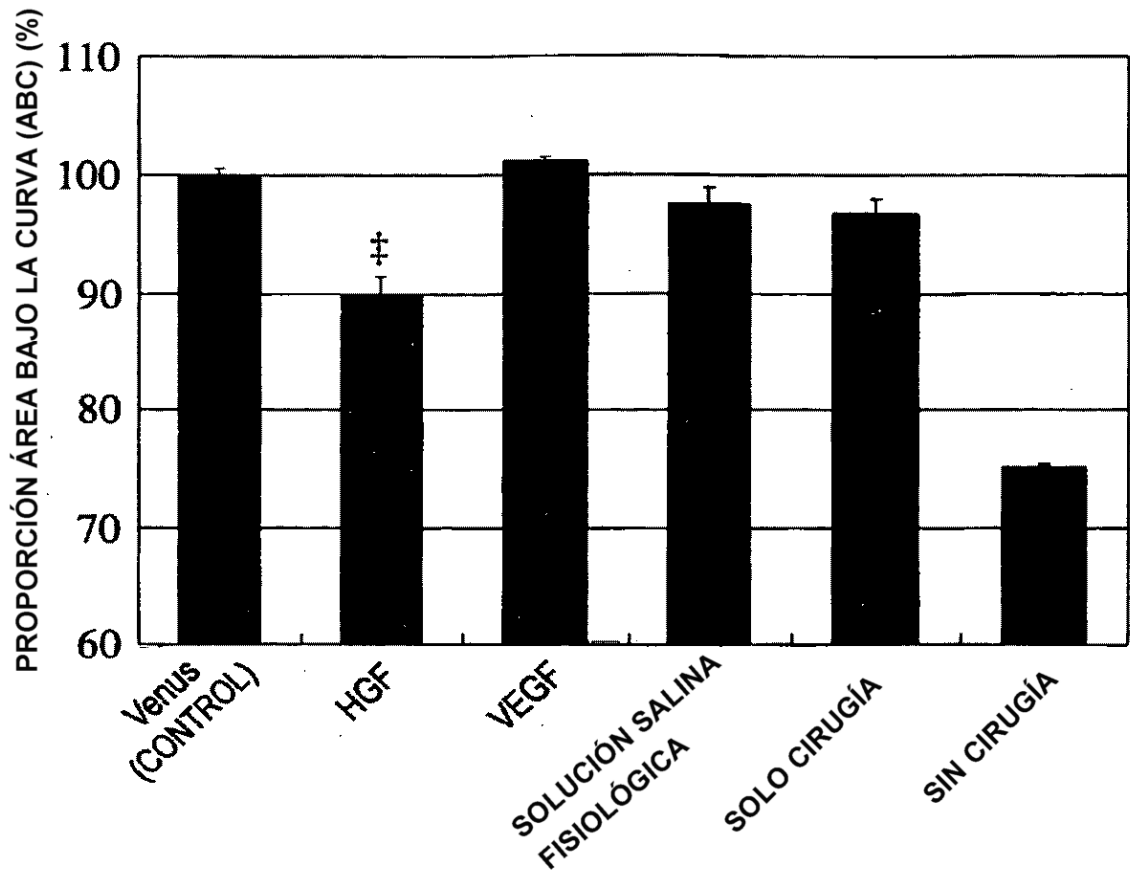


FIG. 10

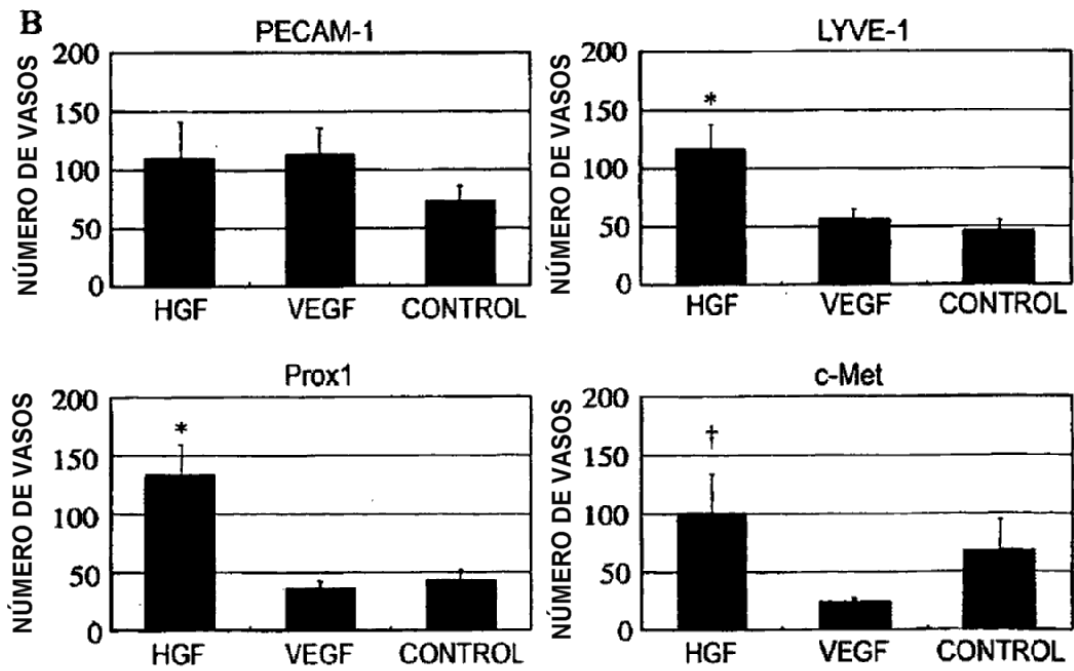
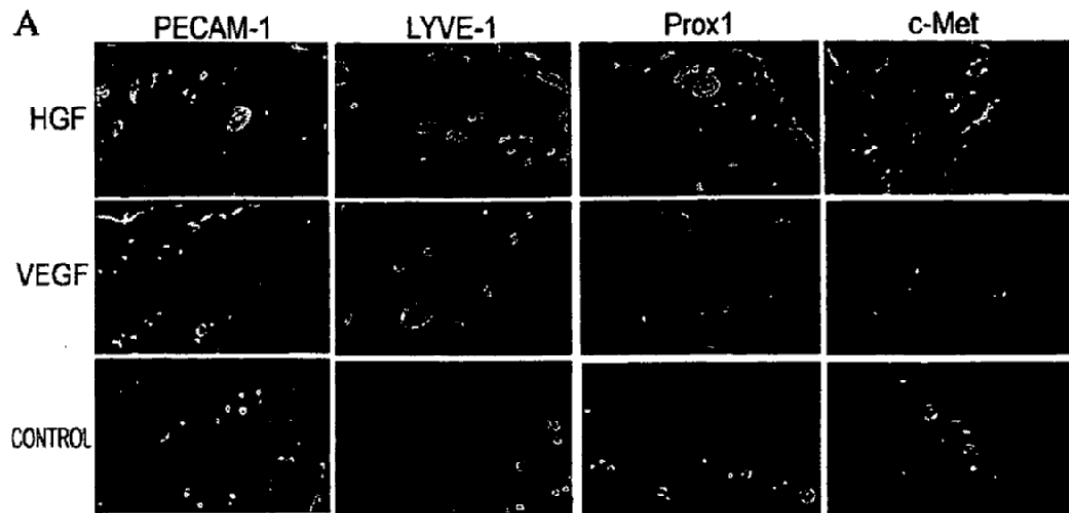


FIG. 11

