

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 305**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2014 PCT/KR2014/009971**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2015 WO15060650**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2014 E 14856385 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2020 EP 3061457**

54 Título: **Composición para la prevención o tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica que utiliza dos o más isoformas del factor de crecimiento de hepatocitos**

30 Prioridad:

22.10.2013 KR 20130126216

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

10.07.2020

73 Titular/es:

**HELIXMITH CO., LTD (100.0%)
203dong, 1, Gwanak-ro
Gwanak-gu, Seoul 08826, KR**

72 Inventor/es:

JEONG, JAE-GYUN

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 773 305 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición para la prevención o tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica que utiliza dos o más isoformas del factor de crecimiento de hepatocitos

Campo técnico

5 La presente solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Coreana N.º: 10-2013-0126216 presentada en la Oficina de Propiedad Intelectual Coreana el 22 de octubre de 2013 y la Solicitud de Patente Coreana N.º: 10-2014-0143377 presentada en la Oficina de Propiedad Intelectual Coreana el 22 de octubre de 2014.

10 La presente invención se refiere a una composición, que contiene, como principio activo, dos o más isoformas del factor de crecimiento de hepatocitos o un polinucleótido que codifique las isoformas, para la prevención o el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica.

Técnica antecedente

15 La esclerosis lateral amiotrófica (ELA), que es una enfermedad de la neurona motora, fue presentada por primera vez en 1869 por el médico francés Jean-Martin Charcot. La ELA fue conocida por la población desde que Lou Gehrig, un famoso jugador de baloncesto de los Estados Unidos sufrió esta enfermedad en 1939, y desde este momento, la ELA se denominó enfermedad de Lou Gehrig.

El pronóstico de la ELA se basa en las características clínicas, los ensayos de diagnóstico con electricidad, y la exclusión de otros estados de salud asociados con los síntomas. El ensayo genético molecular, que se puede utilizar en los ensayos clínicos asociados con algunos genes implicados en la ELA tiene un papel importante en la determinación del genotipo y terapia genética.

20 La ELA puede heredarse de una manera autosómica dominante, autosómica recesiva, o unida a X. La terapia genética y evaluación del riesgo depende del diagnóstico preciso de genes particulares.

25 Se conoce el Riluzol como un fármaco utilizado para retrasar el progreso de la ELA. Se sabe que el riluzol puede disminuir la velocidad de progreso de la ELA inhibiendo el exceso de ácido glutámico que se considera una de las causas de la destrucción de la neurona motora. Sin embargo, los efectos clínicos del Riluzol no alivian los síntomas de la ELA, y los resultados del mismo tampoco son obvios en la extensión de la supervivencia libre de traqueotomía de los pacientes de ELA a los que no se les practica la traqueotomía. Como se ha descrito anteriormente, se ha publicado que los efectos clínicos genuinos del Riluzol, que son útiles para los pacientes con ELA, están muy restringidos y opacos (Stewart y col, 2001). No obstante, no existe un agente preventivo o terapéutico que sea eficaz para la ELA, excluyendo el Riluzol, que tenga una eficacia clínica aunque sea ambigua, y por lo tanto, es necesario el desarrollo de fármacos que presenten efectos de prevención o tratamiento de la ELA.

30 Por otra parte, se conocen vectores de expresión como sistema de suministro genético para la terapia genética en la técnica convencional. Las descripciones detalladas del vector pCK que se utiliza en un ejemplo de la presente invención se desvelan en el documento PCT/KR1999/000855. Además, el documento PCT/KR2003/000548 desvela una composición que contiene un vector recombinante pCK-HGFX7 que se utiliza en la presente invención, para el tratamiento o prevención de enfermedades isquémicas o trastornos hepáticos.

Los documentos WO 02/22162 A1 y US 2003/0176347 A1 desvelan el uso del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y/o sus genes como remedio en el tratamiento de la ELA.

Los documentos WO 2013/037521 y WO 2013/037520 desvelan un factor de crecimiento de hepatocitos modificado (HGF)-1K1-polipéptido y su uso en el tratamiento de varias enfermedades.

40 A lo largo de toda la memoria descriptiva, se hace referencia a muchos papeles y documentos de patente y su cita está representada.

Descripción detallada de la invención

Problema técnico

45 Los presentes inventores han investigado y se han esforzado en desarrollar fármacos que sean capaces de la prevención o el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Como resultado, los presentes inventores establecieron que la ELA se puede tratar utilizando una composición de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, conteniendo dicha composición, como principio activo, dos o más isoformas del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) o un polinucleótido que codifique las isoformas, y así han completado la presente invención.

50 Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para la prevención o tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica.

También se desvela un procedimiento para la prevención o tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica.

Otros fines y ventajas de la presente divulgación serán más obvios con la siguiente descripción detallada de la invención, reivindicaciones, y dibujos.

Solución técnica

5 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de prevención o tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica, conteniendo la composición, como principio activo, dos o más isoformas del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) o un polinucleótido que codifique las isoformas, de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

10 Los presentes inventores han investigado y se han esforzado en desarrollar fármacos que sean capaces de la prevención o el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica. Como resultado, los presentes inventores establecieron que la ELA podría tratarse utilizando una composición que contenga, como principio activo, dos o más isoformas del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) o un polinucleótido que codifique las isoformas, de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

15 La estrategia terapéutica de la presente invención puede clasificarse sobre todo en dos tipos: terapia proteica y terapia genética. De acuerdo con la estrategia con el agente terapéutico proteico de la presente invención, se utilizan dos proteínas isoméricas del HGF. Por otra parte, de acuerdo con la estrategia con el agente terapéutico genético de la presente invención, se utiliza al menos una secuencia de nucleótidos que codifica uno o más tipos de isómeros del HGF. Se puede proporcionar una secuencia de polinucleótido que codifique dos o más isoformas del HGF mediante un polinucleótido o polinucleótidos diferentes. Preferentemente, la secuencia de polinucleótido que codifica las dos o más isoformas de HGF se proporciona mediante un polinucleótido.

20 De aquí en adelante, la presente invención se describirá en detalle.

25 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "isoforma HGF (o isoforma de HGF)" se refiere a un HGF polipeptídico que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del HGF de origen natural en un animal, incluyendo todas las variantes alélicas. Por ejemplo, la isoforma del HGF significa que incluye todas las formas normales o de tipo silvestre del HGF y distintas variantes del HGF (por ejemplo, variantes por corte y empalme y variantes de eliminación).

En una realización de la presente invención, las dos o más isoformas de HGF incluyen el HGF de longitud completa (flHGF) y variante de eliminación del HGF (dHGF). El uso de una composición que contenga tanto la variante del HGF de longitud completa como la variante del HGF de eliminación pueden prevenir o tratar la ELA muy eficazmente.

30 Como se utiliza en el presente documento, el término "flHGF" se refiere a una secuencia de aminoácidos 1-728 del HGF proteico de un animal, preferentemente un mamífero, y más preferentemente un ser humano.

35 Como se utiliza en el presente documento, el término "dHGF" se refiere a una variante de eliminación del HGF proteico producido por un corte y empalme alternativo del gen del HGF de un animal, preferentemente un mamífero, y más preferentemente se refiere a un HGF humano que consiste en 723 aminoácidos, con una eliminación de cinco aminoácidos (F, L, P, S, y S) en el primer dominio kringle de la cadena alfa de la secuencia del HGF de longitud completa.

De acuerdo con la presente invención, el HGF de longitud completa de la presente invención incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y la variante de eliminación del HGF de la presente invención incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

40 En una realización de la presente invención, las isoformas del HGF de la presente invención son codificadas por secuencias de nucleótidos diferentes o por una única secuencia de polinucleótido. En el presente documento, la composición farmacéutica de la presente invención incluye dos o más polinucleótidos cuando los diferentes tipos de isoformas del HGF son codificados por polinucleótidos diferentes, e incluye al menos un polinucleótido que incluye el único polinucleótido cuando los diferentes tipos de isoformas del HGF son codificados por la única secuencia de polinucleótido. El polinucleótido de la presente invención puede estar unido operativamente al menos a una secuencia reguladora (por ejemplo, un promotor o un amplificador) que regula la expresión de las isoformas del HGF.

45 Cuando los dos o más tipos de isoformas del HGF están codificadas por polinucleótidos diferentes, se puede construir un casete de expresión de dos maneras. De acuerdo con una primera manera, el casete de expresión se construye uniendo una secuencia reguladora de la expresión a una secuencia codificante (CDS) de cada isoforma. De acuerdo con una segunda manera, el casete de expresión se construye utilizando un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y péptidos 2A, tal como "secuencia reguladora de la expresión - primera CDS de isómero - IRES - segunda CDS de isómero - secuencia de terminación de la transcripción". El IRES permite que se inicie la traducción genética en la secuencia IRES, expresando de esta manera dos o más genes de interés en la misma construcción.

50 Cuando se codifican dos o más tipos de isoformas del HGF por un único polinucleótido, el polinucleótido que codifica los dos tipos de isoformas está unido operativamente a una única secuencia reguladora de la expresión.

En la presente invención, las isoformas del HGF puede codificarse por un gen de HGF híbrido que exprese simultáneamente dos o más tipos diferentes de isoformas del HGF, por ejemplo el fHGF y el dHGF.

De acuerdo con una realización preferible de la presente invención, el gen de HGF híbrido incluye los exones 1 a 18 del ADNc que se corresponde con el HGF humano y el intrón 4 del gen del HGF humano o un fragmento del mismo, que se inserta entre el exón 4 y el exón 5 del ADNc.

De acuerdo con una realización más preferible de la presente invención, el gen híbrido del HGF incluye una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 10.

El gen híbrido de HGF que incluye el intrón 4 tiene 7113 pb de longitud e incluye las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 3. El gen híbrido de HGF puede incluir selectivamente un fragmento del intrón 4 entre el exón 4 y el exón 5 del ADNc del HGF.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la secuencia insertada adicionalmente entre el exón 4 y el exón 5 incluye: el intrón 4 del gen HGF humano, los nucleótidos 392-2247, nucleótidos 392-727, nucleótidos 2229-5471, nucleótidos 5117-5471, nucleótidos 3167-5471, nucleótidos 4167-5471, o una combinación de los mismos de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3.

Más preferentemente, la secuencia insertada adicionalmente entre el exón 4 y el exón 5 de la secuencia de nucleótidos terapéutica que se utiliza en la presente invención es (i) los nucleótidos 392-2247 y los nucleótidos 2229-5471 de SEQ ID NO: 3; (ii) los nucleótidos 392-2247 y los nucleótidos 5117-5471 de SEQ ID NO: 3; (iii) los nucleótidos 392-2247 y los nucleótidos 3167-5471 de SEQ ID NO: 3; (iv) los nucleótidos 392-2247 y los nucleótidos 4167-5471 de SEQ ID NO: 3; (v) los nucleótidos 392-727 y los nucleótidos 2229-5471 de SEQ ID NO: 3; (vi) los nucleótidos 392-727 y los nucleótidos 5117-5471 de SEQ ID NO: 3; (vii) los nucleótidos 392-727 y los nucleótidos 3167-5471 de SEQ ID NO: 3; (viii) los nucleótidos 392-727 y los nucleótidos 4167-5471 de SEQ ID NO: 3.

La secuencia de nucleótidos terapéutica de la presente invención de acuerdo con la secuencia insertada adicionalmente entre el exón 4 y el exón 5 se resume de la siguiente manera: (i) (exón 1 a exón 4)-(nucleótidos 392-2247 - nucleótidos 2297-5471 de SEQ ID NO: 3) (exón 5 a exón 18); (ii) (exón 1 a exón 4)-(nucleótidos 392-2247 - nucleótidos 5117-5471 de SEQ ID NO: 3)-(exón 5 a exón 18); (iii) (exón 1 a exón 4)-(nucleótidos 392-2247 - nucleótidos 392-5471 de SEQ ID NO: 3)-(exón 5 a exón 18); (iv) (exón 1 a exón 4)-(nucleótidos 392-2247 - nucleótidos 4167-5471 de SEQ ID NO: 3)-(exón 5 a exón 18); (v) (exón 1 a exón 4)-(nucleótidos 392-727 - nucleótidos 2229-5471 de SEQ ID NO: 3)-(exón 5 a exón 18); (vi) (exón 1 a exón 4)-(nucleótidos 392-727 - nucleótidos 5117-5471 de SEQ ID NO: 3)-(exón 5 a exón 18); (vii) (exón 1 a exón 4)-(nucleótidos 392-727 - nucleótidos 3167-5471 de SEQ ID NO: 3)-(exón 5 a exón 18); (viii) (exón 1 a exón 4)-(nucleótidos 392-727 - nucleótidos 4167-5471 de SEQ ID NO: 3)-(exón 5 a exón 18).

En el presente documento, el gen híbrido de HGF que incluye el fragmento de intrón 4 se denomina "HGF-X", y el HGF-X incluye el HGF-X2, HGF-X3, HGF-X4, HGF-X5, HGF-X6, HGF-X7, y HGF-X8, que tienen las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 4 a 10. En la presente invención se utiliza preferentemente el HGF-X7. La "isoforma del HGF", "HGF-X", y "HGF-X7" de la presente invención se ha publicado en el documento PCT/KR2003/000548.

Las secuencias de aminoácidos o nucleótidos de las isoformas del HGF que se pueden utilizar en la presente invención, se considera que incluyen secuencias de aminoácidos o nucleótidos que tienen una identidad sustancial con las secuencias de las isoformas del HGF humano de tipo silvestre. La expresión "identidad sustancial" significa que, cuando la secuencia de aminoácidos o nucleótidos de la isoforma del HGF humano de tipo silvestre y otra secuencia de nucleótidos se alinean para que se correspondan entre ellas tanto como sea posible y las secuencias alineadas se analizan utilizando un algoritmo que se utiliza normalmente en la técnica, la secuencia de aminoácidos o nucleótidos de la isoforma del HGF humano de tipo silvestre muestra al menos un 80 % de identidad, preferentemente al menos un 90 % de identidad, y más preferentemente al menos un 95 % de identidad. Los procedimientos para la comparación de secuencias se conocen bien en la técnica. Se desvelan distintos procedimientos y algoritmos para el alineamiento en Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981); Needleman y Wunsch, J. Mol. Bio. 48:443 (1970); Pearson y Lipman, Methods in Mol. Biol. 24:307-31 (1988); Higgins y Sharp, Gene 73:237-44 (1988); Higgins y Sharp, CABIOS 5:151-3 (1989); Corpet y col., Nuc. Acids Res. 16:10881-90 (1988); Huang y col., Comp. Appl. BioSci. 8:155-65 (1992); y Pearson y col., Meth. Mol. Biol. 24:307-31 (1994). La herramienta de búsqueda del alineamiento local básico del NCBI (BLAST) (Altschul y col., J. Mol. Biol. 215:403-10 (1990)) está disponible a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y, en internet, se puede utilizar en conexión con programas de análisis de secuencia, tales como blastp, blastm, blastx, tblastn y tblastx. Se puede acceder a BLSAT a través de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. El procedimiento de identidad de secuencia que utiliza dicho programa puede confirmarse en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html.

Como se utiliza en el presente documento, el término "prevención" se refiere a todas las acciones para suprimir la esclerosis lateral amiotrófica o retrasar el progreso de la esclerosis lateral amiotrófica mediante la administración de la composición de la presente invención.

El término "tratamiento" que se utiliza en el presente documento se refiere a (a) la supresión del progreso de la esclerosis lateral amiotrófica, (b) el alivio de la esclerosis lateral amiotrófica, o (c) la eliminación de la esclerosis lateral

amiotrófica.

La composición de la presente invención puede prevenir o tratar la esclerosis lateral amiotrófica mediante el brote y crecimiento de neuritas así como el crecimiento y anti-apoptosis de neuronas motoras.

5 La composición de la presente invención se puede aplicar *in vivo* mediante distintos procedimientos de suministro que se conocen de manera convencional en el campo de la terapia genética.

En una realización de la presente invención, el polinucleótido de la presente invención es un ADN desnudo o está contenido en un sistema de suministro genético. Ejemplos del sistema de suministro genético incluyen un plásmido un vector, y un vector vírico.

(i) Plásmido (vector)

10 Un plásmido (vector) se puede utilizar como un sistema de suministro que suministra el polinucleótido de la presente invención. El polinucleótido incluido en el vector se encuentra preferentemente en un casete de expresión apropiado. Preferentemente, el polinucleótido está unido operativamente a un promotor en el casete de expresión.

15 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "unido operativamente" se refiere a una unión funcional entre una secuencia reguladora de la expresión del ácido nucleico (por ejemplo, un promotor, una secuencia de señal, o una matriz en el sitio de unión de un factor de regulación de la transcripción) y otra secuencia de ácido nucleico, y mediante la unión, la secuencia reguladora regula la transcripción y/o la traducción de otra secuencia de ácido nucleico.

20 En la presente invención, la unión del promotor a la secuencia de polinucleótido es la que pueda regular la transcripción de la secuencia de nucleótidos mediante la operación en células animales, preferentemente células de mamífero, y más preferentemente células humanas, e incluye, por ejemplo, promotores derivados de virus de mamífero y promotores derivados de genomas celulares de mamífero. Ejemplos de los mismos pueden incluir el promotor de citomegalovirus (CMV), promotor tardío de adenovirus, promotor 7.5K de virus vaccinia, promotor SV40, promotor tk de HSV, promotor de RSV, promotor alfa EF1, promotor de metalotioneína, promotor de beta actina, promotor genético de IL-2 humana, promotor del gen del IFN humano, promotor del gen de la IL-4 humana, promotor del gen de linfotóxina humana, y promotor genético de GM-CSF humano, pero no se limita a estos. Más preferentemente, el promotor que se utiliza en la presente invención es un promotor derivado del gen inmediatamente temprano (IE) del CMV humano (hCMV), o un promotor EF1 alfa, y más preferentemente, una región 5' no traducida (UTR) que incluye el promotor/amplificador y la secuencia completa del exón 1 inmediatamente hacia el codón de inicio ATG del exón 2 del gen IE del hCMV.

30 El casete de expresión que se utiliza en la presente invención puede incluir una secuencia de poliadenilación, por ejemplo, un terminador de la hormona de crecimiento bovina (Gimmi, E. R., y col., Nucleic Acids Res. 17:6983-6998 (1989)), secuencia de poliadenilación derivada del SV40 (Schek, N, y col., Mol. Cell Biol. 12:5386-5393 (1992)), HIV-1 polyA (Klasens, B. I. F., y col., Nucleic Acids Res. 26:1870-1876 (1998)), β -globina poliA (Gil, A., y col, Cell 49:399-406 (1987)), HSV TK poliA (Cole, C. N. y T. P. Stacy, Mol. Cell. Biol. 5:2104-2113 (1985)) o poli A del virus del poliovirus (Batt, D. B y G. G. Carmichael, Mol. Cell. Biol. 15:4783-4790 (1995)), pero no se limita a estos.

35 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, se puede utilizar un vector pCK, pCP, pVAX1, o pCY como sistema de suministro del polinucleótido, y más preferentemente, se puede utilizar el vector pCK. El vector pCK se desvela con detalle en el documento WO 2000/040737.

(ii) Retrovirus

40 Los retrovirus pueden introducir un gen del mismo en el genoma de un huésped para suministrar un montón de materiales genéticos exóticos, y tiene un amplio espectro de células que puede infectar, así que la mayoría de los retrovirus se utilizan como vector de suministro genético.

45 Con el fin de construir el vector retroviral, la secuencia de polinucleótido de la presente invención se inserta en el genoma retroviral pero no la secuencia retroviral, produciendo de esta manera virus deficientes en replicación. Para la producción de viriones, se construye una línea celular de empaquetamiento que contiene los genes gag, pol, y env pero no tienen secuencias de repeticiones terminales largas (LTR) ni secuencia ψ (Mann y col., Cell, 33:153-159 (1983)). Cuando el plásmido recombinante que contiene la secuencia de polinucleótido de la presente invención, la secuencia LTR y la secuencia ψ se introduce en la línea celular, la secuencia ψ permite la producción de transcripciones ARN del plásmido recombinante, y estas transcripciones se empaquetan con virus, que se descargan en el medio (Nicolas y Rubinstein "Retroviral vectors," en: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Rodriguez y Denhardt (eds.), Stoneham: Butterworth, 494-513 (1988)). Los medios que contienen los retrovirus recombinantes se recolectan y concentran y entonces se utilizan como sistema de suministro genético.

55 Se ha publicado el suministro genético que utiliza vectores retrovirales de segunda generación. Kasahara y col., fabricaron una variante del virus de leucemia murina de moloney, y produjo una proteína quimérica que tenía nuevas características de unión insertando la secuencia de eritropoyetina (EPO) en el sitio de envoltura de la misma (Science, 266:1373-1376 (1994)). La secuencia de polinucleótido de la presente invención también se puede introducir en el

retrovirus de acuerdo con la estrategia de construcción del vector retrovítico de segunda generación.

(iii) Adenovirus

5 El adenovirus se ha empleado habitualmente como un vector de suministro genético debido al genoma de tamaño medio, facilidad de modificación, título alto, amplio intervalo de células diana, y alta infectividad. Ambos extremos del genoma contienen repeticiones terminales invertidas (ITR) de 100-200 pb, que son elementos cis necesarios para la replicación y empaquetamiento de ADN. La región E1 (E1A, y E1B) del genoma codifica proteínas responsables para la regulación de la transcripción del genoma vírico y la transcripción de los genes de la célula huésped. La región E2 (E2A, y E2B) codifica las proteínas implicadas en la replicación del ADN vírico.

10 Entre los vectores desarrollados hasta ahora, se utilizan habitualmente los adenovirus deficientes en replicación que tienen eliminada la región E1. Por otra parte, la región E3 eliminada en los vectores adenovíricos normales puede proporcionar un sitio de inserción para genes exóticos (Thimmappaya, B. y col., *Cell*, 31:543-551 (1982); y Riordan, J. R. y col., *Science*, 245:1066-1073 (1989)). Por lo tanto, la secuencia de polinucleótido de la presente invención se inserta preferentemente en la región E1 eliminada (región E1A y/o región E1B) o la región E3 eliminada. Además, la secuencia de polinucleótido también se puede insertar en la región E4 eliminada. En el presente documento, el término "eliminación" que se utiliza con referencia a secuencias del genoma vírico engloba la eliminación completa de la secuencia correspondiente así como la eliminación parcial de la misma. Además, el adenovirus puede empaquetar aproximadamente un 105 % del genoma de tipo silvestre, proporcionando la capacidad de aproximadamente 2 kb adicionales de ADN (Ghosh-Choudhury y col., *EMBO J.*, 6:1733-1739 (1987)). Por lo tanto, las secuencias exóticas anteriores que se insertan en el adenovirus se pueden acoplar con el genoma adenovírico.

20 El adenovirus puede ser de cualquiera de los 42 serotipos diferentes y los subgrupos A-F. De estos, el adenovirus tipo 5 que pertenece al subgrupo C es el material de partida más preferible para la obtención del vector adenovírico de la presente invención. La información bioquímica y genética sobre los adenovirus tipo 5 es bien conocida. Los genes exóticos suministrados mediante el adenovirus se replican de la misma manera que en el episoma, y por lo tanto tiene baja genotoxicidad para las células huésped. Por lo tanto, se determina que la terapia genética que utiliza el sistema de suministro genético adenovírico es segura.

(iv) vector AAV

30 Los virus adenoasociados (AAV) son capaces de infectar células que no se dividen y tienen la capacidad de infectar distintos tipos de células y por lo tanto son adecuados como sistema de suministro genético de la presente invención. Las descripciones detalladas para el uso y preparación del vector AAV se desvelan en las Pat. de EE. UU. N.º 5.139.941 y 4.797.368.

Los resultados de la investigación de los AAV como sistema de suministro genético se desvelan en LaFace y col., *Virology*, 162:483486 (1988), Zhou y col., *Exp. Hematol. (NY)*, 21:928-933 (1993), WELAh y col., *J. Clin. Invest.*, 94:1440-1448 (1994), y Flotte y col., *Gene Therapy*, 2:29-37 (1995). Recientemente, el vector AAV se ha aprobado para ensayos con seres humanos en Fase I para el tratamiento de la fibrosis quística.

35 Normalmente, el virus AAV se fabrica co-transfectando un plásmido que contiene una secuencia genética diana flanqueada por dos repeticiones terminales del AAV (McLaughlin y col., *J. Virol.*, 62:1963-1973 (1988); y Samulski y col., *J. Virol.*, 63:3822-3828 (1989)) y un plásmido de expresión que contienen una secuencia codificante del AAV de tipo silvestre sin repeticiones terminales (McCarty y col., *J. Virol.*, 65:2936-2945 (1991)).

(v) Otros vectores víricos

40 Se pueden utilizar otros vectores víricos para el suministro de la secuencia de polinucleótido de la presente invención en el cuerpo biológico. También se pueden utilizar vectores derivados de virus, tales como los virus vaccinia (Puhlmann M. y col., *Human Gene Therapy* 10:649-657 (1999); Ridgeway, "Mammalian expression vectors," en: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*. Rodriguez y Denhardt, eds. Stoneham: Butterworth, 467-492 (1988); Baichwal y Sugden, "Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes," In: Kucherlapati R, ed. *Gene transfer*. New York: Plenum Press, 117-148 (1986) y Coupar y col., *Gene*, 68:1-10 (1988)), lentivirus (Wang G. y col., *J. Clin. Invest.* 104(11):R55-62 (1999)), o herpes simplex virus (Chamber R., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92:1411-1415 (1995)) como sistema de suministro capaz de suministrar el polinucleótido en las células.

(vi) Liposomas

50 Los liposomas se forman espontáneamente por los fosfolípidos suspendidos en un medio acuoso. El suministro de moléculas de ADN exótico mediado por liposomas ha sido muy satisfactorio como se describe en Nicolau y Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190 (1982) y Nicolau y col., *Methods Enzymol.*, 149:157-176 (1987). Los liposomas que atrapan la secuencia de polinucleótido de la presente invención suministran la secuencia de polinucleótido en las células interactuando con las células mediante mecanismos tales como la endocitosis, adsorción en las superficies celulares y fusión con las membranas plasmáticas celulares.

- En los casos en los que la secuencia de polinucleótido de la presente invención se introduce en una molécula de ADN recombinante desnuda o un plásmido (vector), la secuencia de polinucleótido se puede introducir en las células mediante microinyección (Capecchi, M.R., *Cell*, 22:479 (1980); y Harland & Weintraub, *J. Cell Biol.* 101:1094-1099 (1985)), precipitación en fosfato cálcico (Graham, F.L. y col., *Virology*, 52:456 (1973); y Chen & Okayama, *Mol. Cell Biol.* 7:2745-2752 (1987)), electroporación (Neumann, E. y col., *EMBO J.*, 1:841 (1982); y Tur-Kaspa y col., *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718 (1986)), transfección mediada por liposomas (Wong, T.K. y col., *Gene*, 10:87 (1980); Nicolau & Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190 (1982); y Nicolau y col., *Methods Enzymol.*, 149:157-176 (1987)), DEAE-dextran treatment (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190 (1985)) y bombardeo genético (Yang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572 (1990)).
- 5
- 10 Cuando la secuencia de polinucleótido de la presente invención se construye basándose en el vector vírico, la secuencia de polinucleótido puede suministrarse en las células mediante distintos procedimientos de infección vírica conocidos en la técnica. La infección de las células huésped utilizando vectores víricos se describen en los documentos citados que se mencionan anteriormente.
- 15 En una realización preferida de la presente invención, el sistema de suministro genético de la presente invención es un vector.
- En una realización de la presente invención, el vector de la presente invención es un plásmido y más preferentemente se puede utilizar el vector pCK. Un ejemplo del vector recombinante que incluye un único polinucleótido que expresa dos o más isómeros del HGF que utiliza un vector pCK puede ser pCK-HGFX7, cuyo contenido se describe con detalle en los documentos PCT/KR1999/000855 y PCT/KR2003/000548, como se ha descrito anteriormente.
- 20 La composición de la presente invención puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable contenido en la composición de la presente invención se utiliza convencionalmente para la formulación, y los ejemplos del mismo pueden incluir, pero no se limitan a, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábica, fosfato cálcico, alginato, gelatina, silicato cálcico, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metil celulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato magnésico, y aceite mineral. La composición farmacéutica de la presente invención puede contener
- 25 adicionalmente un lubricante, un agente humectante, un agente edulcorante, un agente saborizante, un emulsionante, un agente de suspensión, un conservante, y similares, además del ingrediente anterior. Los vehículos y los agentes farmacéuticamente aceptables adecuados se describen con detalle en Remington's Pharmaceutical Sciences (19ª ed., 1995).
- 30 Preferentemente, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por vía parenteral, y por ejemplo, se puede emplear la administración intravenosa, administración intraperitoneal, administración subcutánea, administración intradérmica, administración intraespinal, administración intratecal, administración intraventricular, administración parenquimática, administración intracraneal, administración intramuscular, o administración local. Más preferentemente, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por vía intramuscular,
- 35 espinal, intratecal, intraventricular, parenquimática, o intracraneal.
- La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular y administrar como una inyección. La dosis apropiada de la composición farmacéutica de la presente invención varía dependiendo de factores tales como el procedimiento de formulación, la manera de administración, la edad del paciente, el peso corporal, género, y gravedad de la enfermedad, momento de la administración, vía de administración, velocidad de excreción y sensibilidad de la
- 40 respuesta, y el experto habituado puede juzgar y prescribir fácilmente la dosis eficaz para el tratamiento o prevención deseados.
- De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, las isoformas del HGF de la presente invención se administran a una dosis de 1 µg a 2.500 mg para cada uno, y el polinucleótido que codifica las isoformas se administra a una dosis de 1 µg a 2.500 mg. Cuando las isoformas del HGF o el polinucleótido que codifica las isoformas se
- 45 administra de manera repetida una vez o más, la dosis puede ser igual o diferente en cada administración.
- La composición farmacéutica de la presente invención se formula utilizando un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con el procedimiento que sea llevado a cabo fácilmente por un experto habituado en la técnica a la que pertenece la presente invención, y se puede preparar la composición farmacéutica en una forma de dosificación unitaria o se puede insertar en un envase multidosis. Aquí, la forma de dosificación puede
- 50 ser una solución en un medio oleoso o acuoso, una suspensión, una emulsión, un extracto, un polvo, gránulos, un comprimido, una cápsula, y puede contener adicionalmente un dispersante o un estabilizante.
- También se desvela un procedimiento para la prevención o tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica, incluyendo el procedimiento la administración a un mamífero de una composición que contenga como principio activo, dos o más isómeros del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) o un polinucleótido que codifique los isómeros.
- 55 En una realización de la presente invención, las dos o más isoformas de HGF de la presente invención incluyen el HGF de longitud completa (fHGF) y variante de eliminación del HGF (dHGF).
- De acuerdo con la presente invención, el HGF de longitud completa de la presente invención incluye la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y la variante de eliminación del HGF de la presente invención incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

5 Como el procedimiento de prevención o tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica incluye la etapa de administración de la composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica, que es un aspecto de la presente invención, las descripciones que se solapan entre ellas se han omitido para evitar una complicación excesiva de la memoria descriptiva debido a descripciones repetitivas del mismo.

Efectos ventajosos

Las características y ventajas de la presente invención se resumen de la siguiente manera:

- 10 (a) La presente invención proporciona: una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento para la prevención o el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica.
 (b) También se desvela, pero no forma parte de la presente invención, un procedimiento para la prevención o tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica.
 15 (c) La composición de la presente invención se puede utilizar para prevenir o tratar la esclerosis lateral amiotrófica mediante el brote y crecimiento de células neurales embrionarias así como el crecimiento y anti-apoptosis de las neuronas motoras.

Breve descripción de los dibujos

- 20 La FIG. 1 representa un efecto del pCK-HGFX7 sobre el brote de neuritas en células ENC de acuerdo con una realización de la presente invención.
 La FIG. 2 representa un efecto del pCK-HGFX7 sobre el crecimiento de las células ENC de acuerdo con una realización de la presente invención.
 La FIG. 3 representa un efecto del pCK-HGFX7 sobre el crecimiento de las células NSC-34 de acuerdo con una realización de la presente invención.
 La FIG. 4 representa un efecto del pCK-HGFX7 sobre la apoptosis de las células NSC-34 de acuerdo con una realización de la presente invención.
 25 La FIG. 5 representa un efecto del pCK-HGFX7 sobre la supervivencia de las células NSC-34 en condiciones de cultivo oxidativo de acuerdo con una realización de la presente invención.
 La FIG. 6 representa un efecto del pCK-HGFX7 sobre la apoptosis de las células NSC-34 en condiciones de cultivo oxidativo de acuerdo con una realización de la presente invención.
 La FIG. 7 representa un efecto del pCK-HGFX7 sobre el crecimiento de las células a las que se suministró hSOD1 con la mutación G93A de acuerdo con una realización de la presente invención.
 30 La FIG. 8 representa un efecto del pCK-HGFX7 sobre la fuerza de sujeción de los ratones ELA de acuerdo con una realización de la presente invención.

Modo para llevar a cabo la invención

35 De aquí en adelante, la presente invención se describirá en detalle con referencia a ejemplos. Estos ejemplos son solamente para ilustrar la presente invención más específicamente, y será evidente para los expertos en la técnica que el ámbito de la presente invención no está limitado por estos ejemplos, sino por las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Verificación del efecto de pCK-HGFX7 sobre la maduración de las células neuronales embrionarias (ENC)

40 Solo se tomó una parte de la corteza cerebral del embrión de ratón para convertirla en células únicas, y luego se añadieron 10 μ M de Ara-C 10 al medio de cultivo para cultivar solo las células neuronales. Con el fin de verificar el efecto de pCK-HGFX7 sobre la maduración de las ENC, se sembraron 2×10^4 células, y al día siguiente, se trataron las células con 1,25 ng/ml de la proteína obtenida de las células 293F (Life Technologies, USA) transfectadas con pCK-HGFX7, verificando de esta manera el grado de brote de neuritas que se muestra en la maduración celular. El
 45 grado de brote de neuritas se confirmó mediante inmunocitoquímica sobre la expresión de TUJ-1 que es una tubulina proteica que se expresa específicamente en las células neuronales.

Los resultados confirmaron que, como se muestra en la FIG. 1, la longitud de la neurita aumentaba significativamente en el grupo de tratamiento con pCK-HGFX7 más que en el grupo de tratamiento pCK de control.

Ejemplo 2: Verificación el efecto de pCK-HGFX7 sobre el crecimiento celular después de la maduración de las ENC

50 Se verificó el efecto de pCK-HGFX7 sobre el crecimiento celular después de la maduración de las ENC. Para este fin, se sembraron 5×10^4 ENC, seguido por un periodo de maduración de 6 días. Después de los 6 días, se trataron las células con 1,25 ng/ml de la proteína obtenida de células 293F transfectadas con el pCK-HGFX7, verificando de esta manera el efecto del pCK-HGFX7 sobre el crecimiento celular. Después de 3 días del tratamiento con el pCK-HGFX7,

se llevó a cabo un ensayo MTT para medir el crecimiento celular.

Los resultados confirmaron que, como se muestra en la FIG. 2, la longitud de la neurita aumentaba significativamente aproximadamente un 40 % en el grupo de tratamiento con pCK-HGFX7 más que en el grupo de tratamiento pCK de control.

5 **Ejemplo 3: Verificación del efecto del pCK-HGFX7 sobre el crecimiento celular y la apoptosis en las células neuronales motoras del ratón (NSC-34)**

3-1. Línea celular y cultivo celular

10 Las células NSC-34 (Cellution Biosystem, Vancouver, CA) que se utilizan en el presente ensayo son células neuronales motoras derivadas del ratón. Las células NSC-34 se corresponden con una línea celular en la que las células neuronales motoras derivadas del nervio espinal del embrión de ratón se mezclan con células de neuroblastoma, y se utilizan ampliamente en estudios asociados con el nervio motor. Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino y un material antibiótico (Gibco BRL, USA) en condiciones de 37 °C y un 5 % CO₂. El medio, reactivo y suero para el cultivo celular se adquirieron en Gibco y Sigma Aldrich.

15 3-2. Producción y cuantificación del HGF proteico expresado en el sobrenadante

Se utilizó una transfección de ADN para producir el HGF proteico expresado en el sobrenadante. La transfección se llevó a cabo utilizando un sistema de transfección FuGene HD (Promega, USA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se sembraron las células 293T a 1×10^6 células, y al día siguiente se transfectaron las células con 3 µg de ADN pCK, pCK-HGF728 (pCK-cHGF en el documento PCT/KR03/000548), pCK-HGF723 (pCK-dHGF en el documento PCT/KR03/000548), y pCK-HGFX7. Después del cultivo durante 48 h, se recolectaron los respectivos sobrenadantes y luego se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm. El nivel de expresión del HGF proteico contenido en cada sobrenadante se midió utilizando el inmunoensayo de HGF humano. Cada sobrenadante se diluyó de nuevo a 1 µg/ml para su uso en los ensayos. El HGF proteico recombinante humano utilizado en el inmunoensayo de HGF humano se adquirió en R&D (R&D Systems, Inc., MSP, USA) para su uso.

25 3-3. Efecto del pCK-HGFX7 humano sobre el crecimiento celular en células NSC-34

Con el fin de verificar el efecto del pCK-HGFX7 sobre el crecimiento de células neuronales motoras, las células NSC-34 se trataron con pCK-HGFX7 y luego se evaluó el grado de proliferación celular. Las células se cultivaron en medio de cultivo suplementado con un 10 % de suero bovino fetal, y luego, para su uso en los ensayos, el cultivo se suspendió utilizando medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma) suplementado con un 1 % de suero bovino fetal. Las células se sembraron en una placa de 6 pocillos de manera que estaban contenidas 3×10^4 de las células en 2 ml de un medio que contenía un 1 % de suero. Después de 2 h de la siembra, se añadieron los sobrenadantes respectivos obtenidos de las células 293T transfectadas con pCK-HGF728, pCK-HGF723, y pCK-HGFX7 a una placa de 6 pocillos a 100 µl por pocillo de manera que la concentración del HGF proteico era de 50 ng/ml. El sobrenadante obtenido mediante transfección de las células 293T con el vector pCK se utilizó como control. Después de 48 h de cultivo, el medio de la placa de 6 pocillos se intercambié. Después, se añadieron 2 ml de un medio que contenía un 1 % de suero bovino en cada pocillo, se añadió cada uno de los sobrenadantes obtenidos de las células 293T transfectadas con pCK-HGF728, pCK-HGF723, y pCK-HGFX7 de manera que la concentración del HGF proteico era de 50 ng/ml, seguido por un cultivo de 48 h. El sobrenadante obtenido mediante transfección de las células 293T con el vector pCK se utilizó como control. Las células cultivadas se recolectaron y contaron. El vector pCK se utilizó como control.

45 Como resultado del cultivo durante 5 días después de la siembra celular, cuando los grupos tratados con los respectivos sobrenadantes obtenidos de las células 293T transfectadas con pCK, pCK-HGF728, pCK-HGF723, y pCK-HGFX7 se compararon con el grupo de tratamiento con pCK, la proliferación se indujo aproximadamente un 20 % en el grupo de tratamiento con pCK-HGF728 o pCK-HGF723 y el crecimiento celular aumentó aproximadamente un 48 % en el grupo de tratamiento con pCK-HGFX7. Mediante estos resultados, se pudo verificar que el pCK-HGFX7 puede aumentar significativamente el crecimiento celular de las células neuronales motoras en comparación con el pCK-HGF728 o pCK-HGF723.

3-4. Efecto del pCK-HGFX7 sobre la apoptosis en las células NSC-34

50 Las células NSC-34 se suspendieron a 3×10^4 en medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con un 1 % de suero bovino fetal, y entonces se sembró en una placa de 6 pocillos. Después de la siembra de las células se estabilizaron durante 2 h y luego se añadió cada uno de los sobrenadantes obtenidos de las células 293T transfectadas con pCK-HGF728, pCK-HGF723, y pCK-HGFX7 de manera que la concentración del HGF proteico era de 50 ng/ml. El sobrenadante obtenido mediante transfección de las células 293T con el vector pCK se utilizó como control. Las células se cultivaron durante 5 días mientras el medio y cada uno de los sobrenadantes se intercambiaba a intervalos de 2-3 días.

55 Se extrajo el ARN de las células, que se cultivaron durante 5 días, utilizando el reactivo Trizol (Life Technologies,

USA), y se utilizó el ARN extraído para sintetizar un ADNc utilizando el kit First Strand cDNA (Roche, USA). Se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real utilizando el ADNc sintetizado como matriz y como cebadores los nucleótidos de SEQ ID NO: 11 y 12 para el gen Bax o los nucleótidos de SEQ ID NO: 13 y 14 para el gen Bcl-2. Se llevó a cabo la PCR en tiempo real mezclando 1 μ l de la matriz de ADNc, 1 μ l de cada cebador a 10 pmol/ μ l, 12,5 de mezcla maestra de PCR SYBR Green (Life Technologies, USA), y 9,5 μ l de agua destilada terciaria esterilizada para preparar un total de 25 μ l de una mezcla líquida y luego se lleva a cabo la reacción en condiciones de 2 min a 50 °C y 10 min a 95 °C, y luego 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Aquí, con el fin de corregir cada valor de reacción, se llevó a cabo una PCR en tiempo real utilizando, como cebadores, los nucleótidos de SEQ ID NO: 15 y 16 para GAPDH como un gen constitutivo. Como resultados del ensayo, la expresión del gen Bax asociado con la apoptosis se redujo en cada uno de los sobrenadantes con HGF de los grupos de tratamiento más que en el grupo de tratamiento con pCK, y especialmente, aumentó la expresión de Bcl-2 asociada con anti-apoptosis en 1,3 veces en el grupo de tratamiento con pCK-HGFX7 más que en el grupo de tratamiento con pCK (véase la FIG. 4a). Mediante este ensayo, se confirmó que, en el medio que contenía un 1 % de suero bovino fetal, el pCK-HGFX7 inhibía la apoptosis aproximadamente un 40 %, en comparación con el grupo de tratamiento con pCK como control (véase la FIG. 4b).

Ejemplo 4: Verificación del efecto de pCK-HGFX7 sobre la supervivencia de las células NSC-34 en condiciones de cultivo de estrés oxidativo

4-1. Selección de la concentración de la solución de peróxido de hidrógeno que induce la apoptosis de las células NSC-34 por estrés oxidativo

Antes de la verificación del efecto del pCK-HGFX7 sobre la apoptosis de las células NSC-34 inducida por una solución de peróxido de hidrógeno, se seleccionaron la concentración de siembra celular que es adecuada para validar la apoptosis de células NSC-34, y la concentración de solución de peróxido de hidrógeno para la inducción de apoptosis.

Las células cultivadas en un medio de cultivo suplementado con un 10 % de suero bovino fetal se recolectaron, y entonces se suspendieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con un 1 % de suero bovino fetal, seguido por el recuento celular. Las células ya contadas se sembraron en una placa de 96 pocillos con una concentración celular de 1×10^4 , y luego se tratan al día siguiente con soluciones de peróxido de hidrógeno de 10, 20, 30, 50 y 100 μ M. Se añadió la solución salina tampón fosfato a un pocillo que no se trató con la solución de peróxido de hidrógeno, y el pocillo se utilizó como control. Después de 24 h, se midió el grado de apoptosis utilizando el procedimiento de ensayo XTT (Roche, USA). Se verificó que los grupos de ensayo tratados con diferentes concentraciones de la solución de peróxido inducían un 0, 10, 30, 70 y 85 % de apoptosis en comparación con el control. Basándose en estos resultados, la concentración adecuada de solución de peróxido de hidrógeno para la inducción de apoptosis de las células NSC-34 se seleccionó en 30 μ M.

Adicionalmente, con el fin de llevar a cabo el ensayo de apoptosis en una placa de 6 pocillos, las células se sembraron en la placa de 6 pocillos de manera que las células estaban contenidas a $1,5 \times 10^5$, 3×10^5 , y 1×10^6 en 2 ml de medio que contenía un 1 % de suero bovino fetal. Al día siguiente, las células NSC-34 se trataron con la solución de peróxido de hidrógeno de 30 μ M, y se llevó a cabo el recuento celular los días 1, 4 y 7. Como resultado de la confirmación del recuento celular del día 7, las células del pocillo en el que se sembraron las células a $1,5 \times 10^5$ estaban todas muertas, y por lo tanto no se pudieron seleccionar para el ensayo, y no se indujo apoptosis en el pocillo en el que se sembraron las células a 1×10^6 . Basándose en estos resultados del ensayo, el recuento celular, y la concentración de la solución de peróxido de hidrógeno se seleccionaron para el ensayo de apoptosis en 3×10^5 y 30 μ M, respectivamente.

4-2. Verificación del efecto de pCK-HGFX7 sobre la supervivencia de las células NSC-34 en condiciones de cultivo de estrés oxidativo

Las células NSC-34 se cultivaron en medio de cultivo suplementado con un 10 % de suero bovino fetal, y, para su uso en los ensayos de inhibición de la apoptosis, el cultivo se suspendió utilizando medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con un 1 % de suero bovino fetal. Las células se sembraron en una placa de 6 pocillos de manera que estaban contenidas 3×10^5 de las células en 2 ml de un medio que contenía un 1 % de suero. Al día siguiente, se trataron los pocillos respectivos con la solución de peróxido de hidrógeno 30 μ M seleccionada en el ensayo anterior, y luego se trataron con los sobrenadantes respectivos obtenidos de las células 293T transfectadas con pCK-HGF728, pCK-HGF723, y pCK-HGFX7 de manera que la concentración del HGF proteico era de 50 ng/ml. Se utilizó como control un medio de cultivo obtenido mediante la transfección de las células con el vector pCK se utilizó como control. Mientras las células se cultivaban durante 7 días, se observó el grado de apoptosis. Después de 7 días desde la siembra celular, las células se recolectaron y se contaron. Como resultado del recuento celular, se verificó que, solo aproximadamente un 60-70 % de las células sobrevivían en comparación con las células sembradas originalmente en los grupos de ensayo tratados con pCK, pCK-HGF728, y pCK-HGF723, mientras que las células NSC-34 tratadas con pCK-HGFX7 presentaba aproximadamente un 92 % de supervivencia, indicando una inhibición de apoptosis excelente en comparación con los grupos tratados con los otros materiales de ensayo. Estos resultados confirmaron que el HGFX7 proteico inhibía eficazmente la apoptosis de la neurona motora inducida por estrés oxidativo debido a la solución de peróxido de hidrógeno (véase la FIG. 5).

4-3. Verificación del efecto de pCK-HGFX7 sobre la apoptosis de las células NSC-34 en condiciones de cultivo de

estrés oxidativo

Las células NSC-34 se suspendieron a 3×10^5 en medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con un 1 % de suero bovino fetal, y entonces se sembró en una placa de 6 pocillos. Al día siguiente, se trataron los pocillos respectivos con la solución de peróxido de hidrógeno $30 \mu\text{M}$ seleccionada en el ensayo anterior, y luego se trataron con los sobrenadantes respectivos obtenidos de las células 293T que se habían transfectado con pCK-HGF728, pCK-HGF723, y pCK-HGF7X de manera que la concentración del HGF proteico era de 50 ng/ml , seguido por el cultivo durante 7 días. El sobrenadante obtenido mediante transfección de células con el vector pCK se utilizó como control.

Se extrajo el ARN de las células, que se cultivaron durante 7 días, utilizando el reactivo Trizol, y se utilizó el ARN extraído para sintetizar un ADNc utilizando el kit First Strand cDNA. Se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real utilizando el ADNc sintetizado como matriz y como cebadores los nucleótidos de SEQ ID NO: 11 y 12 para el gen Bax o los nucleótidos de SEQ ID NO: 13 y 14 para el gen Bcl-2. Se llevó a cabo la PCR en tiempo real mezclando $1 \mu\text{l}$ de la matriz de ADNc, $1 \mu\text{l}$ de cada cebador a $10 \text{ pmol}/\mu\text{l}$, $12,5$ de mezcla maestra de PCR SYBR Green (Life Technologies, USA), y $9,5 \mu\text{l}$ de agua destilada terciaria esterilizada para preparar un total de $25 \mu\text{l}$ de una mezcla líquida y luego se lleva a cabo la reacción en condiciones de 2 min a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ y 10 min a $95 \text{ }^\circ\text{C}$, y luego 40 ciclos de 15 s a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ y 1 min a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Aquí, con el fin de corregir cada valor de reacción, se llevó a cabo una PCR en tiempo real utilizando, como cebadores, los nucleótidos de SEQ ID NO: 15 y 16 para GAPDH como un gen constitutivo. Los resultados del ensayo confirmaron que la expresión del gen Bax asociado con inducción de apoptosis estaba disminuida y la expresión de Bcl-2 asociado con anti-apoptosis estaba aumentada en cada uno de los grupos de tratamiento con sobrenadante de HGF más que con el grupo de tratamiento con el pCK. Especialmente, se redujo la expresión del gen Bax aproximadamente un 70 % (véase la FIG. 6a), y la relación Bax/Bcl-2 disminuyó aproximadamente un 75 %, indicando un efecto apoptótico excelente (véase la FIG. 6b), en el grupo de tratamiento con pCK-HGF7X más que el grupo de tratamiento con pCK.

Ejemplo 5: Verificación el efecto de pCK-HGF7X sobre el crecimiento celular en células a las que se suministró hSOD1 mutante G93A

El ensayo *in vitro* que utiliza la forma mutante G93A de la superóxido dismutasa 1 (SOD1), que es una de las causas de ELA, ha sido desarrollado por muchos investigadores. Especialmente se ha publicado que el suministro de la forma mutante G93A de la hSOD1 en las células NSC-34, que se ha utilizado ampliamente en la investigación de la neurona motora, puede inducir apoptosis (Cheema y col., 2005). Por lo tanto, en el presente ensayo, se fabricaron un pCK-hSOD1 de tipo silvestre y pCK-hSOD-G93A insertando el gen de la SOD1 de tipo silvestre humana (tipo silvestre; WT) (NM_000454) y el gen de la SOD1 humana, en la que el resto de aminoácido 93^o se sustituyó de glicina a alanina, en el sitio de BamHI del vector pCK, respectivamente. Se llevó a cabo el siguiente ensayo para investigar el efecto de pCK-HGF7X en las células NSC-34 en las que se había suministrado hSOD1-G93A utilizando el plásmido preparado.

Las células NSC-34 se sembraron en una placa de 96 pocillos de manera que las células se suspendieron a 1×10^4 en medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con un 10 % de suero bovino fetal. Al día siguiente, las células se transfectaron con pCK, pCK-hSOD1 de tipo silvestre (WT), y el mutante pCK-hSOD1-G93A (G93A) utilizando el reactivo lipofectamina LTX (Life Technologies, USA). Inmediatamente antes de la transfección, las células transfectadas con G93A se trataron con los sobrenadantes obtenidos de las células 293T que se transfectaron con pCK-HGF728 y pCK-HGF7X de manera que la concentración del HGF proteico era de 50 ng/ml . El sobrenadante obtenido mediante transfección de células con el vector pCK se utilizó como control.

Después del cultivo durante 3 días, el crecimiento celular se confirmó mediante el tratamiento con el reactivo XTT. Los resultados confirmaron que las células a las que se suministró la hSOD1 de tipo silvestre y las células a las que se suministró el vector pCK presentaban un crecimiento celular similar. Sin embargo, las células a las que se suministró la hSOD1 mutante en G93A presentaban aproximadamente un 85,8 % de crecimiento celular, en comparación con las células a las que se suministró pCK, que presentaban un deterioro en el crecimiento celular en comparación con las células a las que se suministró la hSOD1 de tipo silvestre. Sin embargo, el grupo de tratamiento con pCK-HGF7X presenta aproximadamente un 92,9 % de crecimiento celular, indicando el efecto de inhibición del deterioro del crecimiento celular, que está causado por el suministro de la hSOD1 mutante en G93A (véase la FIG. 7).

[Secuencias genéticas]

SEQ ID NO: 11: GGC AGA CAG TGA CCA TCT TT
 SEQ ID NO: 12: AGT GGA CCT GAG GTT TAT TG
 SEQ ID NO: 13: CCA TCA ATC AAA GCC AAG CA
 SEQ ID NO: 14: AGC CTT CAC GCA AGT TCA GG
 SEQ ID NO: 15: CCA TCA CTG CCA CTC AGA C
 SEQ ID NO: 16: TCA TAC TTG GCA GGT TTC TCC

Ejemplo 6: Verificación de pCK-HGF7X sobre la fuerza de agarre en ratones Tg con SOD1-G93A mutante humana (de aquí en adelante, ratón ELA)

Se ha descubierto que la mutación de la superóxido dismutasa 1 (SOD1) es una de las causas de ELA, se desarrolló el modelo de ratón ELA utilizando este gen, y actualmente, los investigadores de la ELA en todo el mundo han llevado

a cabo distintas investigaciones utilizando este modelo animal. Entre estos, se seleccionó el B65JL-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J (002726), y se utilizó para los ensayos. La producción del modelo de ratón ELA se encargó a Woo Jung BSC (Corea), y se utilizó el modelo de ratón para el presente ensayo después de verificar si se expresaba el gen SOD1 de tipo silvestre, mediante genotipado.

5 Se dividieron los ratones ELA de 10 semanas de edad en 4 ratones por grupo: Grupos de administración Tg-pCK, Tg-pCK-HGF728 (pCK-cHGF en el documento PCT/KR03/00548), y Tg-pCK-HGFX7. Se seleccionaron seis ratones sin Tg y se establecieron como un control negativo (de aquí en adelante no Tg). Después de dos semanas, se administró a los ratones de los tres grupos de ensayo, excluyendo el control negativo, el plásmido correspondiente mediante inyección intramuscular. En el presente documento, se administraron 50 µl del plásmido correspondiente a 2 µg/µl en
10 el músculo tríceps braquial, músculo tibial, músculo recto femoral, y músculo gastrocnemio izquierdos y derechos, respectivamente. Después de dos semanas de la administración (con 14 semanas de edad), se investigó la fuerza de agarre de cada ratón mediante el ensayo de comportamiento. Para el ensayo de comportamiento, se llevó a cabo un ensayo de fuerza de agarre sobre malla. Se utilizó el ensayo de fuerza de agarre sobre malla colocando un ratón sobre una malla que tenía un entramado a intervalos predeterminados, dando la vuelta a la malla, y midiendo el tiempo en
15 el que el ratón está suspendido de la malla. Este es uno de los procedimientos representativos para la evaluación de la fuerza muscular del ratón (Crawley JN, 2008).

Como resultado del ensayo, los ratones no Tg se voltearon durante una media de aproximadamente 9 min, pero entre los individuos Tg, los ratones que recibieron el pCK estaban suspendidos y se volteaban durante una media de aproximadamente 30 s. El individuo que recibió el plásmido pCK-HGF728 presentaba un ligero aumento del tiempo
20 medio de duración en comparación con el grupo de administración de pCK, y la duración tenía una media de 49 s. Mientras que los ratones que recibieron el pCK-HGFX7 se suspendieron y voltearon durante un mayor tiempo en comparación con los ratones que recibieron pCK o pCK-HGF728, y el tiempo medio de duración era de 3 min (véase la FIG. 8). Esto demuestra que el pCK-HGFX7 mejoraba significativamente la función muscular, incluyendo la fuerza de agarre, de los ratones ELA en comparación con pCK y pCK-HGF728.

25 Aunque la presente invención se ha descrito en detalle con referencia a características específicas, será evidente para los expertos en la técnica que esta descripción solo es para una realización preferida y no limita el ámbito de la presente invención. Por lo tanto, el ámbito sustancial de la presente invención se definirá por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

30 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Viomed Co., Ltd.

<120> Composición para la prevención o tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica que utiliza dos o más isoformas del factor de crecimiento de hepatocitos

35 <130> PN130609P

<150> 10-2013-0126216

<151> 22-10-2013

<160> 16

40 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 728

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de fIHGF

<400> 1

ES 2 773 305 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

ES 2 773 305 T3

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 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

ES 2 773 305 T3

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> 2
- <211> 723
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Secuencia de aminoácidos de dHGF
- <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 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
 Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln

ES 2 773 305 T3

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

ES 2 773 305 T3

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> 3
<211> 7113
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos de HGF híbrido

<400> 3

```

atgtgggtga ccaaactct gccagccctg ctgctgcagc atgtctctcl gcctctctc 60
ctgtcccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120
gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaalag atccagcact gaagataaaa 180
acaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatalag gtactaggaa taaaggactt 240
ccattcacti gcaaggctll tgttttggat aaagcaagaa aacaatgctt ctggttcccc 300
ttcaalagca tgcgaagtg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaattga cctctatgaa 360
aacaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctacaa ggaacagta 420
tctatcacta agagtgcat caaatgicag cctggagtt ccatgatacc acacgaacac 480
aggtaagaac agtatgaaga aaagagatga agcctctgtc tttttacat gttaacagtc 540
tcatallagt cctcagaal aattctcaa tctaaaata acttagccaa ctgctgaal 600
tgtattacgg caaggtllat atgaattcat gactgatatt tagcaaatga ttaattaata 660
tgttaataaa atgtagccaa aacaatatct taccitaatg cctcaattg tagatctgg 720
tatttgtaa ataataacgt aaactcgtt taaaaggatt ctctctctg tcttgagaa 780
agtacggcac tgtcagggg gagaggtga ttgtgaaaa tcagaggtag atgagaatct 840
tactaggggc tgagggtct taaacttgg tggatctcaa cattggtgc acattaaaat 900
cacctgtctc aagccctga cgaatctac ttagaagatg acaacacaga acaallaaat 960
cagaatctct ggggagaata gggcaccagt atttttgag ctcccacat gatccaaag 1020
tgcagccaaa ttgagaacc actgctaaaa gctcaagctt cagattgacc agctttcca 1080
tctcacctat cgcclaaaga ccaattgga taaatgtgt cactacgaca gatgggtact 1140
alltaagal gaglaaacac aatatactta ggctcgtcag actgagagtt ttaatcatca 1200
ctgaggaaaa acatagatat ctaatactga ctggagtatt agtcaaggct fattcacac 1260
acaatttat cagaaaccaa aglagttta aacagctctc ccttattag taatgcatg 1320
gaggglltac ttaccatgt acctgtctga gcactgtacc ttgttaatct catttactg 1380
taatgagaac cacacagcgg gtagtttat tggttctatt ttacctacat gacaaaactg 1440
aagcalaaaa acactagta agtttcagt gtcatgcaca actaggaagl gacatggcca 1500
gaalalaagc ccagtcacca tcactctata acctgcgctt ttaacaact cagggcatga 1560
cacatttggc cggtcagtag aacctatgct gtgatttgt ttgcagtgg tggtaigac 1620
tgcttgtg aatccactt ttacttatt ccaatttggg gacacaattc tgcaagatga 1680
ttctcatta ggaacagag atgagttat gaccaacaca gaaagaaaa gagttgtg 1740

```

ES 2 773 305 T3

ctccacactg ggatlaaacc tatgatctg gcttaataa cactagctag taagtgcca 1800
 agcigatcal ctctacaaca ttcaataac agaaaacaac aatttcaaa atlagttact 1860
 tacaaitatg lagaaatgcc tctaaaacac agtatttcc ttatallaca aaaacaaaaa 1920
 ttataatgg ttltgctc ttltgagagt ttgatggg ttactccctg cataggaag 1980
 aaaaacattt attlaagtag atggatctaa gtitticatg aacaaaggaa tgacattga 2040
 aatcaalctt acctagctc aggagaatgc atlagattaa cclagtagag gtcttattc 2100
 acctgaggt ttctatgac gtgattctd gctggaggag taatlgtaa atagatctt 2160
 ctgggaactg gcttctagt ccaatcagct ctftaccaaa tgaacacttc ctgtgat 2220
 agatgtttt ggccgagagg atccagtata ttaataaaat cccttttgt atcaatgag 2280
 ggaacacat aatttcaic aattagcagc ttattggaat atctgcaiga tgglttaaca 2340
 ctftaagtg ttgactaaag attaatttia cagaaaatag aaaaagaaa atgttctgt 2400
 ctggaggaat gattattgt tgaccctaa atgaaalat ttactagtg gctlaalgga 2460
 aagatgaga aagatgaga aattaatga gaagctaac tagaaaatca ggtgacctga 2520
 tatctacat tgtatcttc atggccacc cagcatcat taatgaatca gatgaggaa 2580
 tagatcaagl ttctaggaa cacagtgaal atlaaaagaa aacaaagga gcttagcacc 2640
 tagaagacct agttatatt tcaaagata ttggatgta acctaatft aaacatttc 2700
 tcaattgct ctctaaagc ctgccaaca gcaaggacag agaaccaaaa atagtgata 2760
 tatgaataaa tgcatttac agaactgcl gactggcaca tgcfttgtl glaalggtt 2820
 ctataaaca ctgttgaat gaacacacat aagtgaaga gcatggctag gctcatccc 2880
 ttgtcaaat atgggtgct aaagaaaagc aggggaata cattgggaca ctaacaaaa 2940
 aaaacagtt aittagglaa aagataaaat acaccacaga atgaagaaa gagatgacc 3000
 agactgctt ttaacctca tgtctagag aggttttga tatgaattgc atcagaatt 3060
 gtgaaagga gccatctt tctctcatl ttgatttat taactcaat ggggaattt 3120
 tattcgtgt ttggccat ctactttga ttctacatt atctctctt ccttctacc 3180
 tgtattgtc ctataaatt gttgactat taatcacta ctctcaca gctttttt 3240
 ggcttcaaa atccactga aaggatgat ggtgatcac ttgtglatl lcggtgtgca 3300
 tgttagagg ggacaaaaat cctctcaaa actataata ttgagtatt gtgattgaa 3360
 cattgctat aactactagg ttcttaaa atcttaata talaaaaatga tatagaaaa 3420
 gggaaatat agtctgatt atcatctaa gtgaagagat taaaccag ggagtaata 3480
 aattgctaa ggactaagg tgtataclat ttaggata gataggggc aaccgatgg 3540
 gtttatgat laacaaataa actctcacc actlaccat atcaacttt ccataaaga 3600
 gagctatag atcttctt taaataaatt tgattagtc atgactctt gaaaacatat 3660
 aaagcaaaag tcacattga ttctatcaga aaagttagta agccatggcc caaacaaaag 3720
 atgcataaa atattctgga atgatgggc taaaagtaag aaaaatgact tttaaaaaa 3780
 gttfactgt aggaatgig aaattatgct gaatttagt tgcattataa ttltgtcag 3840
 tcatcgggc tgacaacctg tctatttct atttcccat atgaggaatg ctagttaagt 3900
 atgatatta actattacta cttagatgca tgaagttgc ataatagga taacttca 3960
 ctggttccct gaaaatgitt agttaglaat aagtcttca cactattgt ttgtccat 4020

ES 2 773 305 T3

aalltatatt ttctgaagac ttaactctag aatacacitca tgcataaatg aaagaatttc 4080
 attgcaaaa attgctgtg acatgacgca tacctgtatt tglttgtg cacaacatga 4140
 aaaatgatgg ttattagaa gtttcattgg gtaggaaaca caattgaatg gtattfacta 4200
 agalactaaa atcctggac ttactctaa tttagtgcc atttagaact caaggctca 4260
 gtaaaagtag aaataaagcc tgltaacaaa acacaagctg aatattaaaa atgtaactgg 4320
 atttcaaag aaatgttac tggattacc ttagatgta tattcttat tatgatctt 4380
 tggtaaatg ctggcagaca aaigcaatat ctaattgtg agtccaatat cacaagcagt 4440
 acaaaagfat aaaaaagact tggccttlic taatgtgta aaalactta tgcgtgta 4500
 aacactaaga gtagggcact agaaattta agtgaagata atgtgtgca gttactgcac 4560
 tcaatggctt actattataa accaaaactg gtagcactaa gctccagtca gcaaaaatga 4620
 tcaaaatfat tgaagagaat aagcaattct gttcttatt aggacacagt agatacagac 4680
 tacaagtggt agtgtgctta ataagagga gcaattgta agtgcactt actctattat 4740
 ccttggagc ttctcaaaa aaccatataa ggtgtaagat gttaaagggt atggttacac 4800
 tcagtcaca ggtaagctaa taggctgaga gaagctaat tacttactgg ggtctcacag 4860
 taagaaagtg agctgaagt tcagcccaga tttaactgga ttctgggctc ttattcatg 4920
 ttactcatg aatctgttc tcaattgic agaaaaaagg gggctatla taagaaaagc 4980
 aataacaaa caagtaatga tctcaataa gtaatgcaag aaalagtag atttcaaaa 5040
 cagtgccagc gatttctcag ttctgtccia agtggcctg ctcaatcacc tgcctctt 5100
 tagtggagct tgaattat gttcagaca acttcgattc agtctagaa tglttgactc 5160
 agcaaatca caggctcacc ttctaaact gatgtgtaat atggaaatc agctaaatgg 5220
 atgtaataa aatcaaacg tttaaggac agatgaaaat gacagaattt taaggtaaaa 5280
 tataigaagg aatataagat aaaggatttt tctacctca gcaaaaacat acccactaat 5340
 tagtaaatf aataggcaa aaaaagttc atgctctat actgtaatga ttatcttt 5400
 aaaactagct ttfgcttc gagctatcgg ggtaaagacc tacaggaaa ctactgtca 5460
 aatctcgag ggaagaagg gggacctgg tglttcaaa gcaatccaga ggtacgctac 5520
 gaagctgtg acallctca gttcagaa gttgaatga tgacctgcaa tggggagagt 5580
 tatcaggtc tcatgatca tacagaatca ggcaagattt gtcagcgtg ggtatcatg 5640
 acaccaccc gccacaaat ctgctctgaa agatctccc acaagggtt ttagataat 5700
 tatgcccga atcccgatgg ccagccgagg ccatgggtct atactctga cctcacacc 5760
 cgtcgggagt actgtgcaat taaaacatgc gctgacaata ctatgaatga cactgatgt 5820
 ccttggaaa caactgaatg catccaaggt caaggagaag gctacagggg cactgtcaat 5880
 accatttga atggaatcc atgtcaggt tggattctc agtatctca ctagcatgac 5940
 atgactcctg aaaattcaa gtgcaaggac ctacgagaaa attactgccg aatccagat 6000
 gggctgaa caccctgtg ttatccact gatccaaaca tccgagttg ctactgtcc 6060
 caaattcaa actgtalat gtcacatgga caagattgt atcgtgggaa tggcaaaaat 6120
 tatagggca acttatcca aacaagatct ggactaacat gttcaatgt ggacaagaac 6180
 atggaagact lacatgca tatctctgg gaaccagatg caaglaagct gaatgagaat 6240
 tactgccga atccagatga ttagctcat ggacctgtg gctacaggg aatccactc 6300

ES 2 773 305 T3

atctctggg attattgccc tatttctcgt tgtgaagggtg ataccacacc tacaatagtc 6360
aatttagacc atccccgtaaat atctgtgccc aaaacgaaac aatfgcgagl tglaaatggg 6420
atccaacac gaacaaacat agggatggatg gttagtltga gatacagaaa taaacatatc 6480
tgcggaggat caltgataaa ggagagttgg gttcttactg cacgacagtg ttcccttct 6540
cgagactga aagallatga agcttggcct ggaaltcatg atgtccacgg aagaggagat 6600
gagaaatgca aacaggttct caatgttcc cagctgglat atggccctga aggatcagat 6660
ctggttfaa tgaagctgc caggccctgct gtctctggatg atttgttag taagattgat 6720
ttacclaait atggatgcac aattcctgaa aagaccagtt gcagtgltta tggctggggc 6780
tacctggat tgalcaacta tgalggccta ttacgagtgg cacatctcta lalaatggga 6840
aatgagaaal gcagccagca lcatcgaggg aaggtgactc tgaatgagtc tgaataatgt 6900
gctggggctg aaaagattgg atcaggacca tgtgaggggg allatggggg cccactgtt 6960
tgtgagcaac ataaaatgag aatgttctt ggtgtcattg ttccgtgctg tggatgtgcc 7020
atccaatc gtccgtgat tttgtccga gtagcatatt atgcaaatg gatacacaaa 7080
attattfaa calataaggt accacagtca tag 7113

- <210> 4
- <211> 6190
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Secuencia de nucleótidos de HGF-X2
- <400> 4

atgtgggta ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcatctccic 60
ctgclccca tcgcatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120
gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaaatag atccagcact gaagataaaa 180
accaaaaaag tgaalactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt 240
ccattcactt gcaaggcttt tgtttttag aaagcaagaa aacaatgcct ctggtcccc 300
ttcaatagca tgtcaagtg agtgaaaaa gaatttggcc algaattga cctctatgaa 360
aacaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctacaa ggaacagta 420
tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccttggagtt ccatgatacc acacgaacac 480
aggtagaac agatgaaga aaagagatga agcctctgc tttttacat gttaacagtc 540
tcalattagi ccttcagaat aattctaca tctaaaata acttagccaa ctgtcgaal 600
tgtattacgg caaggttat atgaattcat gactgatali tagcaaatga ttaaltaata 660
tgtaataaa atgtagccaa aacaatalct tacctaatg cctcaattg tagatctgg 720
tatttgtaa alaataacgt aaactcgtt taaaaggatt ctctctctg tctttgaaa 780
agtaccggac tgtcagggg gagaggtga tigtgaaaa tcagaggtag atgagaatct 840
lactgagggc tgagggttct ttaacctgg tggatctcaa catlgttgc acattaaaat 900
cacctgtgc aagccctga cgaatctac ttagaagatg acaacacaga acaaltfaat 960
cagaatctct ggggagaata gggcaccagt atttttgag ctcccaccat gattccaaag 1020
tgcagccaaa ttigagaacc actgctaaaa gctcaagctt cagattgacc agctttcca 1080
tctcacctat cgctaaaaga ccaaatgga laaatgtgtt cattacgaca gatgggtact 1140

ES 2 773 305 T3

atttaaagat gagtaaacac aatatactta ggctcgtcag actgagagtt ttaatcatca 1200
 ctgaggaaaa acatagatat ctaatactga ctggagtatt agtcaaggct tatttcacac 1260
 acaattttat cagaaaccaa aglagtttaa aacagctctc cccftattag laatgcatfg 1320
 gggggttac ttaaccatgi accftgctga gcactgtacc tggtaatct cattfactg 1380
 taalagaaac cacacagcgg gtagltttat tggftctatt ttacctacat gacaaaactg 1440
 aagcatalaaa acacttagta agtttcagt gtcatgcaca actaggaagt gacatggcca 1500
 gaatataagc ccagtcacca tcactctata acctgcgctt taacaactt cagggcatga 1560
 cacatttggc cggtcagtag aacctatgct gtagttgtt ttgcagtgg tggtagtac 1620
 tgccttgtg aatccacttt ttattctatt ccaftttggg gacacaatic tgcaagalga 1680
 ttcttcatla ggaaacagag atgagttatt gaccaacaca gaaagaaaaa gagtttgtg 1740
 ctccacactg ggattaaacc tatgatctg gcctaaitaa cactagctag taagtlcca 1800
 agctgatcat ctctacaaca ttcaataac agaaaacaac aatttcaaa atagttaact 1860
 tacaattatg tagaaatgcc tctaaaacac agtattttcc ttatattaca aaaacaaaaa 1920
 ttalaattgg tttgtctc tttgagagt ttgcatggtg ttactccctg catagtgaag 1980
 aaaaactttt atlaagtag atggatctaa gttttcatg aacaaaggaa tgacattga 2040
 aatcaatccl acctatgctc aggagaatgc attagattaa cctagtagag gtctatttc 2100
 acctgagtt ttctatgac gtgattctct cctggaggag taattgtgaa atagatctct 2160
 ctgggaactg gcttctagt ccaatcagct clttaccaaa tgaacactc ctgtgatat 2220
 agatgtttat ggccgagagg atcccttct ttctacctgt attgtctca ataatgttt 2280
 gactattaa ttactactt cctcacagct tttttggc ttacaaaic cactggaaag 2340
 gtatalgggt glatcacttt gtglattcg gtgtgcatgi gtagagggga caaaaalctt 2400
 ctctcaact ataatattg agtattgtg tattgaacat ttgtataac tactaggttt 2460
 cttaataat cttaatata aaaatgatal agaaaaaggg aaattatagt tctattatt 2520
 catctaagtg aagagattaa aaccagggga gtaataaat tgtctaagga ctaaggtgt 2580
 atactattta ggtgatagat atggggcaac cgtatgggtt ttatgattaa caaataaact 2640
 tctcaccact ctaccataic aactttcca taaaagagag ctataglatt ctltgctaa 2700
 ataaattga ttatgcatg acttctgaa aacatataaa gcaaaagtca cafttgattc 2760
 tatcagaaaa gtgagtaagc catggcccaa acaaaagatg caftaaata ttctggaatg 2820
 atggagctaa aegtaagaaa aatgactttt taaaaagtt tactgttagg aatttgtaa 2880
 ttatgtgaa tttagttgc attataatt ttgcagtca tacggctcga caacctgtct 2940
 tattctatt tcccatalg aggaatgcta gtttaagtat gatalttaact attactact 3000
 agatgcattg aagtgcata atatggataa tacttcactg gtccctgaa aatgttagt 3060
 taglaataag tctctacac tattgtttt gtccaataat ttatatttc tgaagactta 3120
 actctagaat acactcatgt caaatgaaa gaatttcatl gcaaaatatt gctggtaaa 3180
 tgaccatac ctgatttgt ttgtgtcac aacatgaaaa atgatggttt attagaagt 3240
 tcaatgggta ggaaacacat ttgaatggta ttactaaga tactaaaatc ctggacttc 3300
 actctaalt tagtgcaat tagaacicaa ggtctcagta aaagtagaaa laaacctgt 3360
 taacaaaaa caagctgaat attaaaaatg taactggatt ttcaagaaa tgtttactgg 3420

ES 2 773 305 T3

tattacctgt agatgtatat tctttattat gatctttgt gtaaagtctg gcagacaaat 3480
gcaatatcta atftgtgagt ccaatatcac aagcagtaca aaagtataaa aaagacttgg 3540
cctttcttaa tggtaaaa tactttaigc tggtaataac actaagagta gggcactaga 3600
aatttaagi gaagataatg tgttcagtt actgcactca atggcttact atataaacc 3660
aaaactggga tcaactaagct ccagtcagtc aaaatgatca aaattatga agagaataag 3720
caattctgt ctttattagg acacagtaga tacagactac aaagtgaggt gtgcttaata 3780
agaggtagca ttgttaagt gtcaattact ctattatccc ttggagcttc tcaaaataac 3840
catataaggi gtaagatgtt aaaggittatg gttacactca gtgcacaggt aagctaaag 3900
gctgagagaa gctaaattac ttactgggtt ctacagtaa gaaagtgagc tgaagtcca 3960
gcccagattt aactggatc tgggctctt atcatgta ctcatgaat ctgttctca 4020
atgtgcaga aaaaaggggg ctattataa gaaaagcaat aaacaacaa gtaatgatct 4080
caaaatagta atgcaagaaa tagtgagatt tcaaatcag tggcagcgt ttctcagttc 4140
tgtcctaagt ggcctgtctc aatcacctgc tctctttag tggagctttg aaattatgtt 4200
tcagacaact tggattcagt tclagaatgt ttgactcagc aaattcacag gctcatcttt 4260
claactgat gggaalalg gaaattcagc taaatggatg llaataaaa tcaaacgttt 4320
taaggacaga tgaalalgac agaatttaa ggtaaaatat atgaaggaat ataagataaa 4380
ggattttct acctcagca aaaaataacc cactaattag taaaattaat aggcaaaaaa 4440
aagttgatg ctctatact gtaatgatta tcaatttaa actagctttt tgccttcgag 4500
ctatcgggtt aaagacctac aggaaaaacta ctgtogaaat cctcgagggg aagaaggggg 4560
acctgtgtt ttcaagca atccagaggt acgctacgaa gctgtgaca ttctcagtg 4620
ttcagaagtt gaatgatga cctgcaatgg ggagagttat cgaggtctca tggatcatal 4680
agaatcagc aagatttgc agogctggga tcatcagaca ccacaccggc acaaattctt 4740
gcctgaaga tatcccgaca agggcttga tgalaattat tggcgaatc ccgatggcca 4800
gocgagcca tgggtctata ctctgaccc tcaacaccgc tgggagttact gtgcaaitaa 4860
aacatcgct gacaatacta tgaatgacac tgatgttct ttggaaacaa ctgaatgat 4920
ccaaggtcaa ggagaaggct acaggggcac tgtcaalacc attggaatg gaaltccatg 4980
tcagcgttg gattctcagt atctcaca gcatgacatg actcctgaaa attcaagtg 5040
caaggaccta cgagaaaatt actgccgaaa tccagatggg tctgaatcac cctggtgttt 5100
taccactgat ccaaacatcc gagttggcta ctgctccaa attccaaact gtgatatgc 5160
acatggacaa gattgtatc ggggaatgg caaaaattat atgggcaact tatcccaaac 5220
aagatctgga claacatgtt caatgtggga caagaacatg gaagacttac atcgcatal 5280
ctctgggaa ccagatgcaa glaagctgaa tgagaattac tggcgaatc cagatgatga 5340
tgctcatgga cctgtgtct acacgggaaa tccactcatt ccttgggatt attgccctat 5400
ttctgtgtt gaaggigata ccacacctac aatagtcatt ttgacctc cgttaatatc 5460
ttgtccaaa acgaacaat tgcgagttgt aaatgggatt ccaacacgaa caaacatagg 5520
atggatggtt agttgagat acagaaataa acatatctgc ggaggatcat tgataaagga 5580
gagttgggtt ctactgcac gacagtttt cccctctcga gactgaaag attatgaagc 5640
ttggcttga atcatgatg tccacggaag agggatgag aaatgcaaac aggttctcaa 5700

ES 2 773 305 T3

gtttccag ctggatag gccctgaagg atcagatctg gtttaatga agcttgccag 5760
 gccgctgic ctggatgait ttgltagtac gattgattha cctaattaig gatgcacaa 5820
 tctgaaaag accagttgca gtgttatgg ctggggctac actggattga tcaactatga 5880
 tggcclalta cgagtggcac atctctatat aatgggaaat gagaaatgca gccagcatca 5940
 tggaggaag gtgactciga atgagtciga aataigtct ggggctgaaa agattggatc 6000
 aggaccatgt gagggggatt atggggccc acttgittgt gagcaacata aatgagaaat 6060
 ggttctggt gtcattgtc ctggtctgg atgtgccalt ccaaactgic ctgglatth 6120
 tgcaggatg gcalattatg caaaatggat acacaaaait atthaacat ataaggatcc 6180
 acagtcatag 6190

<210> 5
 <211> 5190
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de HGF-X3
 <400> 5

atgtgggga ccaaaactct gccagccctg ctgctgcagc atgtctctct gcactctctc 60
 ctgtcccca tgcctatccc 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
 ttcaalagca tgcgaatgg agtgaaaaa gaattggcc atgaattga cctctatgaa 360
 aacaaagact acattagaaa ctgcatcalt ggtaaaggac gcagctacaa gggaaacagta 420
 tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccttgaggtt ccatgatacc acacgaacac 480
 agglaagaac aglatgaaga aaagagaiga agcctctgic tttttacat gttaacagtc 540
 tcatatfagt cctcagaat aattctaca tcttaaaata acttagccaa ctgctgaaat 600
 tgtattacgg caaggtttat atgaattcat gactgatait tagcaaalga ttaattaata 660
 tgttaataaa atgtagccaa aacaatatct tacctaatg cctcaattg tagatctcgg 720
 tattttgaa ataataacgt aaactctgt taaaaggatt ctcttctg tcttgagaa 780
 agtacggcac tgtcagggg gagaggtga ttgtgaaaa tcagaggtag atgagaatct 840
 tactgagggc tgaggttct ttaacctgg tggatctcaa cattgggtgc acattaanaat 900
 cactgctgc aagccctga cgaatctac ttagaagatg acaacacaga acaatfaaat 960
 cagaatctct ggggagaata gggcaccagt atttttgag ctcccacat gattccaaag 1020
 tgcagccaaa ttgagaacc actgctaaaa gctcaagctt cagattgacc agctttcca 1080
 tctcacctat cgcctaaaga ccaaatlga laaatgtit callacgaca gatgggact 1140
 attaaagal gaglaaacac aatatactta ggctcgtcag actgagagt ttaatcatca 1200
 ctgaggaaaa acatagatct ctaatactga ctggagtatt agtcaaggct fatttcacac 1260
 acaatttat cagaaaccaa agtagttta aacagctctc ccttattag taatgcallg 1320
 gagggttac ttaccatgt acctgctga gcactgtacc ttgtaact calltactg 1380

ES 2 773 305 T3

taatgagaac cacacagcgg glagittat tggltclat ttacclacat gacaaaactg	1440
aagcataaaa acacttagta agtttcagt gtcatgcaca actaggaagt gacatggcca	1500
gaatataagc ccaglcacca tcactctata acctgcgclt itaacaactt cagggcatga	1560
cacattggc cgglcagtag aacctatgct gtgattglt ttgcagtgg tgggatgac	1620
tgccitgtt aatccactt ttattclat ccatttggg gacacaaltc tgaagatga	1680
ttctcatta ggaaacagag atgattatt gaccaacaca gaaagaaaa gagttgtt	1740
ctccacactg ggattaacc tatgatctg gcclaattaa cactagctag taagtcca	1800
agctgatcat ctctacaaca ttcaalaac agaaaacaac aatttcaa attagtact	1860
tacaattatg tagaaaagcc tcaaaaacac agtatttcc ttattaca aaaaacaaaa	1920
ttataattg ttgtctcc ttgtgagat tgcattggg ttactccctg catagtgaag	1980
aaaacattt atttaagtag atggatctaa gttttcatg aacaaaggaa tgcattga	2040
aatcaatctt acctagtcc aggagaatgc attagattaa cctagtagag gtcttattc	2100
acctgagtt ttctatgat gtgattctt gctggaggag taattgtgaa atagatctt	2160
ctgggaactg gcttctagt ccaatcagct ctttaccac tgaacactt ctgtgat	2220
agatgtttt ggccgagagg atccgggta ggaaacacat ttgaatgta ttactaaga	2280
tactaaaalc ctggacttc acictaalt tagtgccat tgaacacaa ggtctcagta	2340
aaaglagaaa taaagcctgt taacaaaca caagctaat ataaaaatg taactggatt	2400
ttcaagaaa tgttactgg tattacctgt agatgtat ttctttat gatctttgt	2460
gtaaagctg cgagacaaal gcaatactat attgttagt ccaatatcac aagcagtaca	2520
aaagataaa aaagactgg cctttctaa tgtttaaaa tactttatgc tggtaatac	2580
actaagagta gggcactaga aatttaagt gaagataatg tgttcagtt actgcactca	2640
atggctact attataaacc aaaactggga tcaactaagct ccagtcagtc aaaatgatca	2700
aaattatga agagaataag caattctgt ctattagg acacagtaga tacagactac	2760
aaagtgaggt gtgcttaala agaggtagca ttgttaagt gtcaattact ctattatccc	2820
ttggacttc tcaaaatac catataaggt glaagatgt aaaggtatg gtacactca	2880
gtgcacaggt aagclaatag gctgagagaa gctaaaltac ttactgggtt ctcacagtaa	2940
gaaagtgagc tgaagltca gccagattt aactggattc tggctcttt attcagtta	3000
ctcatgaal ctgttctca attgtcaga aaaaaggggg ctattataa gaaaagcaat	3060
aaacaaaca gtaatgatc caaataagta atgcaagaaa tagtgagatt tcaaatcag	3120
tggcagcgt ttctcagttc tgcctaagt ggccctgctc aatcacctgc tatctttag	3180
tggagcttg aaattatgt tcaacaact tcaattcagt tctagaatgt ttgactcagc	3240
aaattcacag gctcalctt ctaactgat ggtgaatag gaaatcagc taaatggatg	3300
ttataaaa tcaaacgtt taaggacaga tgaaatgac agaatttaa ggtaaaatat	3360
atgaaggaat ataagataaa ggaattttt accttcagca aaaacatacc cactaattag	3420
taaaatlat aggcacaaaa aagttgatg ctctatact glaalgatta tcaittaaa	3480
actagcttt tgcctcagc ctatcgggtt aaagacctac aggaaaacta ctgtcgaat	3540
cctcagggg aagaaggggg acctgggtt ttacaagca atccagaggt acgctacgaa	3600
gtctgtgaca ttctcagtg ttcaagaat gaatgatga cctgcaatgg ggagagttat	3660

ES 2 773 305 T3

cgagggtcica tggatcatalc agaalcaggc aagattgtc agogcigggg tcaicagaca 3720
 ccacaccggc acaaatctt gctgaaaga tatcccgaca agggctttga tgataaltat 3780
 tgcgcaalc ccgatggcca gccgaggcca tgggtctata ctctgaccc tcaacccgc 3840
 tgggagtacl gtgcaattaa aacatgctc gacaatacla tgaatgacac tgaatgtcct 3900
 ttggaacaa ctgaaigcat ccaaggtcaa ggagaaggct acaggggcac tgitcaatacc 3960
 atttgaatg gaattccaig tcaagcttgg gattctcagc atcctcacga gcatgacatg 4020
 acicctgaaa attcaagtg caaggaccta cgagaaaatt actgccgaaa tccagatggg 4080
 tctgaalcac cctgggttt taccactgat ccaaacatcc gattggcta ctgctccaa 4140
 attcacaact gtgatgtc acatggacaa gattgtatc tgggaatgg caaaaattat 4200
 atgggcaact tatccaaac aagatctgga ctaacatgti caatgtggga caagaacatg 4260
 gaagacttac atcgtcatat ctctgggaa ccagatgcaa glaagctgaa tgagaaitac 4320
 tgcgaaatc cagatgatga tgcctatgga ccctggtgct acacgggaaa tccactcatt 4380
 ccttgggatt atgcccctat ttctgtgtg gaaggtgata ccacacctac aatagtcaat 4440
 ttgaccatc cagtaaatc ttgtgcaaa acgaaacaat tgcgagttgt aaatgggatt 4500
 ccaacacgaa caaacatagg atggatgggt agtttgagat acagaaalaa acatatctgc 4560
 ggaggatcat tgataaagga gatttgggtt ctactgcac gacagtgtt ccctctcga 4620
 gacttgaag attaigaagc ttgcttggga atcatgatg tccacggaag aggagatgag 4680
 aaatgcaaac aggttctcaa tglttccag ctggatatag gccctgaagg atcagatctg 4740
 gtttfaatga agcttccag gccctcgtc ctggatgat tigtatgac gattgatita 4800
 cctaattatg gatgcacaat tctgaaaag accagttgca gtgttatgg ctggggctac 4860
 actggatga tcaactatga tggcctatta cgagtggcac atctctat attggaat 4920
 gagaatgca gccagatca tggagggaag gtgacttga atgacttga aatgtgtc 4980
 ggggtgaaa agattgcatc aggacctgt gagggggatt atggggccc acttgttgt 5040
 gagcaacata aaatgagaat ggttctgtg gtcattgtc ctggctggtg atgtgccatt 5100
 ccaaatctc ctggtatttt tgcgagta gcalattatg caaaatggat acacaaaatt 5160
 atttaacat ataaggtacc acagtcatg 5190

<210> 6
 <211> 4241
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de HGF-X4

<400> 6

atgtgggtga ccaaaactct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctct gcatctctc 60
 ctgctccca tgcctatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120
 gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa 180
 accaaaaaag tgaatctgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt 240
 ccaatcacti gcaaggcttt tgttttgat aaagcaagaa aacaatgctt ctggttcccc 300
 ttcaatagca tgitcaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaattga cctctatgaa 360
 aacaaagact acattagaaa ctgcatcatt gglaaaggac gcagctacaa ggaacagta 420

ES 2 773 305 T3

tctatcacta agagtgcat caaatgtcag ccclggagtt ccatgatacc acacgaacac 480
 agglagaac aglatgaaga aaagagatga agccctctgc tttttacat gttaacagtc 540
 tcatattagt ccttcagaat aattctacaa tcttaaaata acttagccaa ctgtctgaat 600
 tglattacgg caaggttat atgaattcat gactgatatt tagcaaatga ttaattaata 660
 tgltaataaa atglagccaa aacaatatct taccttaatg cctcaalltg tagatctcgg 720
 tattgtgaa ataataacgt aaactctgt taaaaggatt ctctctcctg tctttgagaa 780
 agtacggcac igtgcagggg gagaggitga ttgigaaaaa tcagaggtag atgagaatct 840
 tactgagggc tgagggttct ttaacctgg tggatctcaa catgggtgc acattaaaat 900
 cacctgtctc aagccctga cgaactctac ttagaagatg acaacacaga acaattaaat 960
 cagaatctct ggggagaata gggcaccagt atttttgag ctcccaccat gattocaaag 1020
 tgcagccaaa ttgagaacc actgctaaaa gctcaagctt cagatgacc agctttcca 1080
 tctaacctat cgcctaaaga ccaaatgga taaatgtgt callacgaca gatgggtact 1140
 attaaagat gagtaaacac aatatactta ggctctcag actgagagtt ttaatcalca 1200
 ctgaggaaaa acatagatal ctaatactga ctggagtatt agtcaaggct tatttcacac 1260
 acaatttat cagaaaccaa aglagttta aacagctctc ccttattag taatgcattg 1320
 gagggttac ttaccatgt acctgtctga gcactgtacc ttgtaatct calltacttg 1380
 taatgagaac cacacagcgg gtatgtttat tggttctatt ttacctacat gacaaaactg 1440
 aagcataaaa acacttagla agtttcagtt gtcatgcaca actaggaagt gacatggcca 1500
 gaataaagc ccagtcacca tcaactata acctgcgctt ttaacaactt cagggcatga 1560
 cacalltgc cggcaglag aaccatgct gtgattgtt ttgcagtggt tggtagtac 1620
 tgctgttg aatccacttt ttattctatt ccaatttggg gacacaattc tgcaagatga 1680
 ttctcatta ggaacagag atgagtatt gaccaacaca gaaagaaaa gagttgttg 1740
 ctccacactg ggattaaacc tatgatctg gcclaatfaa cactagctag taagtgtcca 1800
 agctgatcat ctclacaaca ttcaataac agaaaacaac aallttcaaa allagtact 1860
 tacaattag tagaatgcc tclaaaacac agtalltcc ttatattaca aaaacaaaa 1920
 ttataattgg tttgtctc tttgagagt ttcatggtg ttactccctg catagtgaag 1980
 aaaacatttt attlaagtag atggatctaa gttttcatg aacaaaggaa tgacattga 2040
 aatcaatctt acctagctc aggagaatgc attagattaa cctagtagag gtcttattc 2100
 acctgagtt ttclatgac gtgattctct gctggaggag taattgtgaa atagatctct 2160
 ctgggaactg gcttctagt ccaatcagct clttaccaaa tgaacacttc cltltgatat 2220
 agatgttat ggcogagagg atcctfatgt ttcagacaac ttcgattcag tictagaatg 2280
 ttgactcag caaattcaca ggctatctt tctaactga ttgtaatat ggaaattcag 2340
 claatggat gtttaataaaa tcaaacgtt ttaaggacag atgaaaatga cagaattta 2400
 agglaaaaa latgaaggaa talaagataa aggattttc tacctcagc aaaaacaiac 2460
 ccactaatta gtaaaattaa taggcaaaaa aaagttgcat gctctatc tgtaattgat 2520
 atcattttaa aactagcttt ttgccttga gctatcgggg taaagacctt cagggaaaact 2580
 actgtcгаа tctctgaggg gaagaagggg gacctgggt ttccacaagc aatccagagg 2640
 tacgtacga agtctgtgac attcctcagt gtfcagaagt lgaatgcatg acctgcaatg 2700

ES 2 773 305 T3

gggagagta tggaggctc atggatcata cagaatcagg caagattgt cagcgctggg 2760
 atcatcagac accacaccgg cacaattct tgcctgaaag atatcccgac aaggccttg 2820
 atgataatta ttgccgcaal cccgatggcc agccgaggcc atggctctat actcttgacc 2880
 ctacacccc cggggagtac tgtgcaatta aaacatgcgc tgacaatact algaatgaca 2940
 ctgatttcc ttggaaaca actgaatgca tccaaggta aggagaaggc tacaggggca 3000
 ctgtcaaac catttgaat ggaattccat gtcagcgttg ggattctcag tatcctcacg 3060
 agcatgacal gactcctgaa aattcaagt gcaaggacct acgagaaaat lactgccgaa 3120
 atccagatgg gctgcaatca ccttggtgt ttaccactga tccaacatc cgagttggct 3180
 actgtccca aattccaac tggatattt cacatggaca agattgtat cgtgggaatg 3240
 gcaaaaatta talgggcaac ttatcccaaa caagatctgg actaacatgt tcaatgggg 3300
 acaagaacat ggaagacta catgctata tctctggga accagatgca agtaagctga 3360
 atgagaatta ctccgaaat ccagatgat atgctcatgg accttggctc tacacgggaa 3420
 atccactcat tcttgggat talgtccca ttctcgttg tgaaggatg accacacct 3480
 caatagtaa ttagacct cccgtaatat ctgtgcca aacgaaaca ttgcgagttg 3540
 taaatgggat tcaaacgca acaaacatag gatggatgt tagttgaga tacagaata 3600
 aacatctc cggaggatca ttgataaagg agattgggt tcttactgca cgacaggtt 3660
 tccctctcg agactgaaa gattaagaag ctggcttgg aattcatgat gtccacgaa 3720
 gaggagatga gaaatgcaa caggttctca atgttccca gctgtatat ggcctgaag 3780
 gatcagatc ggttlaatg aagctgcca ggctgctgt cctggatgat ttgttagta 3840
 cgattgatt acctaattt ggatgcaca ttctgaaaa gaccagttgc agtattatg 3900
 gctggggcta cactggatt atcaactatg atggcctatt acgagtgga catctctata 3960
 taatgggaaa tgagaatgc agccagcatc atcgagggaa ggtgactctg aatgagctg 4020
 aaatatgctc tgggctgaa aagattggat caggacctg tgaggggat tatggggcc 4080
 cactgtttg tgagcaecat aaaatgagaa tggttctgg tgcattgtt cctgtctgtg 4140
 gatgtgcca tccaatctg cctgtattt ttgtccgagf agcatattt gcaaaatgga 4200
 tacacaaat tatttaaca tataaggtag cacagtcata g 4241

<210> 7
 <211> 5602
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de HGF-X5

<400> 7

atgtgggta ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctct gcatctctc 60
 ctgtcccca tgcctatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120
 gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa 180
 accaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt 240
 ccattcact gcaaggctt tgttttga aaagcaagaa aacaatgccl ctggttccc 300
 tcaatagca tgaagatgg agtgaaaaa gaatttggcc atgaattga cctctatgaa 360

ES 2 773 305 T3

aacaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctacaa gggaacagta 420
tctatcacta agagtggcat caaatgtag ccttgagitt ccatgatacc acacgaacac 480
aggaagaac agtatgaaga aaagagatga agcctctgic tttttacat gttaacagtc 540
tcataatagt ccttcagaat aattctacaa tctaaaata acttagccaa ctgctgaaat 600
tgtattacgg caagglttat atgaattcat gactgatatt tagcaaatga ttaattaata 660
tgtaataaa atgtagccaa aacaatatct tacctaatg cctcaattg tagatctgg 720
tatttgtaga tccaglatat taataaaatc ccttttga tcaatgagg gaaacacata 780
atttcatca attagcagct tattgaaata tctgcatgat ggttaacac tttlaaggt 840
tgactaaaga ttaatttac agaaaataga aaaagaaata tgtttctgic tggaggaatg 900
atttatgtt gaccctaaa tgaataat ttagtagtgg cttaatggaa agatgatgaa 960
agatgatgaa ataatgtag aagcttaact agaaaatcag gtagcctgat atctacatct 1020
gtatcctca tggccaccc agcattcatt aatgaatcag atgatggaat agatcaagtt 1080
tcttagaac acagtgaata ttaaaagaaa acaaaggag cctagcacct agaagaccta 1140
glttatatt caaaglatat ttggatglaa cccaattta aacatttct cacttgctc 1200
tctaaagcc ttgccaacag caaggacaga gaaccaaaaa taggtatata atgaalaaat 1260
gottattaca gaatctgctg actggcacat gctttgtg taalgggtic tcaaaacac 1320
ttgtgaatg aacacacata agtgaagag catggctagg ctctccct tggcaaaata 1380
tgggggcta aagaaaagca ggggaaatac atggggacac taacaaaaaa aaacagttaa 1440
tttaggtaa agataaaata caccacagaa tgaagaaaag agatgaccca gactgctct 1500
taacctcat gtctagaga ggtttttgat atgaattgca ttcagaaitg tggaaaggag 1560
cccacttt ctctcatt tgaatttatt aactccaatg ggggaatttt atctgttt 1620
tggccatc tactttgat ttctacata ttctcttc ctltctacct glatttgcc 1680
taataaattg ttgacttatt aattcactac ttctcacag cttttttg gctttacaa 1740
tccactggaa aggtatatgg gtgtatcact ttgttattt cgggtgcat gtglagagg 1800
gacaaaaatc ctctcaaa ctataaatat tgaglattg tttattgaa atttctata 1860
actactaggt ttctaaata atctaatat ataaaatgat atagaaaaag ggaattata 1920
gttctgatta ttcatctag tgaagagait aaaaccagg gagtaataa atttctaaag 1980
gactaaggtt gtatactatt taggtgatag atatggggca accgtatggg ttttatgatt 2040
aacaataaaa ctctcacca ctctaccata tcaactttc cataaaagag agctatagta 2100
ttcttgctt aaataaattt gattagtca tgactcttg aaaacataa aagcaaaagt 2160
cacatttgat tctatcagaa aagttagtaa gccatggccc aaacaaaaga tgcattaaaa 2220
tattctggaa tgatggagct aaaagtaaga aaaatgact ttaaaaaag ttactgtta 2280
ggaaattgta aattatgctg aattttagt gcattataat tttgtcagt catacggct 2340
gacaacctgt ctalltcta ttcccata tgaggatgc tagtlaagta tggataltaa 2400
ctattactac tttagtcat tgaagttgca taataggat aatactcac tggttccctg 2460
aaaatgtta gttagtaata agtctctac actattgtt ttgtccaata atttatatt 2520
tctgaagact taactctaga atacactcat gtcaaaaaga aagaattca ttgcaaaata 2580
ttcttgga catgacgat acctgtatt gttttgtc acaaatgaa aatgatggt 2640

ES 2 773 305 T3

tlallagaag tticattggg taggaaacac allgaatgg tattactaa gatactaaaa 2700
 tcctgggact tcaactctaat tttagtgcca lllagaactc aaggctcag taaaagtaga 2760
 aataaagcct gltaacaaaa cacaagctga ataitaaaa lglactgga tttcaaga 2820
 aatglttact ggtattacct gtagatgat atictttat algatcttt gtgtaaagtc 2880
 tggcagacaa atgcaatac taattgtga gtccaatac acaagcagta caaaagata 2940
 aaaaagactt ggccittct aatgtgtaa aatacttat gctggaata acactaagag 3000
 tagggcacta gaaatttaa glgaagata lgtgtgagc tactgcact caatggctta 3060
 ctattataa ccaaaactgg gactactaag ctccagcag tcaaatgat caaaattat 3120
 gaagagaata agcaaltcg ttcttatta ggacacagta galacagact acaaagtga 3180
 gtgtgctaa taagagtag cattgttaa gtgcaata ctctattc cctggagct 3240
 tctcaaaata accatataag gtgtaagatg taaaggta tggctact cagtgcacag 3300
 gtaagcta ataggcgag aagctaaat acttactggg gtctcacagt aagaaagta 3360
 gctgaagltt cagccagat ttaactggat tctgggctt ttattcalt tactcatga 3420
 atctgttct caattgca gaaaaaggg ggctaltat aagaaaagca alaaacaaac 3480
 aagtaatgat ctcaataag taatgaaga aatagtgaga ttcaaaatc agtggcagcg 3540
 atttctcagt tctgtctaa gtggcctgc tcaatcacct gctatctt agtggagct 3600
 tgaattatg tticagacaa ctctgatca gtctagaat gttgactca gcaaatcac 3660
 aggcctact ttctaactg atggtaata tggaaatca gctaaatgga tgfataaaa 3720
 attcaaacgt ttaaggaaga gatgaaaatg acagaaltt aagglaaaat atatgaagga 3780
 atataagata aaggatttt ctacctcag caaaaacata cccactaat agtaaaata 3840
 ataggcaaaa aaaagtgca tgccttata ctgtaatgat tatcatlta aaactagctt 3900
 ttgctctc agctatcggg gtaaagacct acaggaaaac tactgtcga atcctcaggg 3960
 ggaagaaggg ggaccctgtt gttcacaag caatccagag gfacgctacg aagctgtga 4020
 cactctcag lgtcagaag tgaatgcat gacctgcaal ggggagagtt atcgaggct 4080
 catggatcat acagaatcag gcaagattg tcagcgtgg gatcatcaga caccacaccg 4140
 gcacaaatc ttgctgaaa gatatccga caagggttt gatgataatt atgcccga 4200
 tccgatggc cagccgaggc catgggtcta tactctgac cctcacacc gctgggagta 4260
 ctgtgcaat aaaaatcgc ctgacaatac tatgaatgac actgatgtc ctttgaaac 4320
 aactgaatc atccaaggtc aaggagaagg ctacaggggc actgtcaata ccattggaa 4380
 tggaaatcca tctcagcgtt gggalltca glactctac gagcagaca tgaactctga 4440
 aaattcaag tgcaaggacc tacgagaaaa ttactgcga aatccagatg ggtctgaatc 4500
 acctgtgtt ttaccactg atccaaacal ccgattggc tactctccc aaattcaaaa 4560
 ctgtgatag tcacatggac aagattgta tctgggaat ggcaaaaat atatggcga 4620
 ctatcccaa acaagatcg gactaacatg ttcaatgtg gacaagaaca tggaaactt 4680
 acatctcat atctctggg aaccagatgc aagtaagctg aatgagaat actgccgaaa 4740
 tccagatgat gatctcatg gacctgtg ctacacggga aatccactca ttcttggga 4800
 ttattgccct atttctgtt gtgaaggtga taccacacct acaatagta atttagacca 4860
 tccgtaata tctgtgcca aaacgaaca atgctgagtt gtaaatggga ttccaacacg 4920

ES 2 773 305 T3

```
aacaaacala ggalggatgg tlaglttgag alacagaaat aaacatatct gcggaggatc 4980
attgataaag gagagltggg ttcttactgc acgacagtgt ttccctctc gagactgaa 5040
agattalgaa gcttggcttg gaattcatga tgtccacgga agaggagatg agaaatgcaa 5100
acaggttctc aatgtttccc agctggata tggccctgaa ggalcagatc tggtttaat 5160
gaagcttgcc aggcctgctg tctggatga ttitgtagt acgattgatt tacctaata 5220
tggatgcaca attccigaaa agaccagttg cagtgttat ggctggggct acactggatt 5280
gatcaactat galggcctat tacgagttgc acatctctat ataalgaggaa algagaaatg 5340
cagccagcat catcgagga aggtgactct gaatgagtct gaaatattg ctggggctga 5400
aaagattgga tcaggacat gtgaggggga ttatggtggc ccactgttt gtgagcaaca 5460
taaaatgaga atggtcttg gtgtcattgt tcttggctgt ggalgtgcca ttccaaatcg 5520
tcttggtaft ttgtccgag tagcatatta tgcaaaatgg atacacaaaa ttatttaac 5580
atataaggta ccacagtcac ag 5602
```

<210> 8

<211> 4679

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de HGF-X6

<400> 8

ES 2 773 305 T3

atgtgggiga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcctctcctc 60
 ctgctcccca togccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120
 gaaltcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa 180
 accaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt 240
 ccattcactt gcaaggcttt tgttttggat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc 300
 ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaattggcc atgaattga ccctatgaa 360
 aacaaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctacaa gggaacagta 420
 tctatcacia agagtggcat caaatgtcag cctggagtt ccatgatacc acacgaacac 480
 aggtaagaac agtatgaaga aaagagatga agcctctgtc tttttacat gtaacagtc 540
 tcatattagt cctcagaat aattctacaa tctaaaata acttagccaa ctgtctgaat 600
 tgtattacgg caaggtttat atgaattcat gactgatatt tagcaaatga ttaattaata 660
 tghtaataaa atgtagccaa aacaatatct tacctaatg cctcaaittg tagatctcgg 720
 tatttggga tccctcctt tctacctga ttgtcctaa taaattgtg actlattaal 780
 tcactactic ctacagctt tttttggct ttacaaatcc actggaagg tatagggtg 840
 tatcactttg tgtattcgg tgtcatgtg tagaggggac aaaaatctc tctaaacta 900
 taaatattga gtatttgtt attgaacatt tgcataact actaggttc taaataatc 960
 ttaatatata aatgatata gaaaaagga aattatagt cgtattatc atctaagtga 1020
 agagattaaa acccaggag taaataaatt gtctaaggac taaggttgta tactatttag 1080
 gtgatagata tggggcaacc gtatgggtt tatgaltaac aaataaacit ctaccactc 1140
 taccatalca acittccat aaaagagagc tatagtatc ttgcttaaa taaattgat 1200
 tagtgcaiga ctcttgaaa acatataaag caaaagtcac aittgattct atcagaaaag 1260

ES 2 773 305 T3

tgagtaagcc atggcccaaa caaaagatgc attaaaaat tctggaatga tggagctaaa 1320
 agtaagaaaa algactttt aaaaaagtt actgttagga atgtgaaat tatgctgaat 1380
 tttagtgca ttalaalitt lgtcagtcac acggctgac aacctgtctt atttctalitt 1440
 ccccalatga ggaalgctag ttaagtatgg atattaacta ttactacta gatgcattga 1500
 agltgcataa tatggalaat acttcaactgg ttccctgaaa atgtttagtt agtaataagt 1560
 ctctacact attgttttg tccaalaatt talatttct gaagactaa ctclagaata 1620
 cactcalgc aaaaatgaaag aatttcattg caaaatattg ctgtgacat gaocataacc 1680
 tgtattgtt ttgtgcaca acatgaaaaa tgatggitta ttagaagtt cattgggtag 1740
 gaaacacatt tgaatggat ttactaagat actaaaatcc ttgacttca ctctaatttt 1800
 agtgccalitt agaactcaag gtctcagtaa aagtagaaat aaagcctgtt aacaaaacac 1860
 aagctgaata ttaaaaatgt aactggattt tcaaagaaat gttfactggt attacctgta 1920
 gatgtatatt ctttatttg atctttgtg taaagtctgg cagacaaaag caatatctaa 1980
 ttgttgatc caatatcaca agcagtacaa aagtataaaa aagacttggc cttttctaat 2040
 gtgttaaat actttatgt ggaataaca ctaagagtag ggcactagaa attttaagtg 2100
 aagataatgt gttgcagtta ctgcactcaa tggcttacta ttataacca aaactgggat 2160
 cactaagctc cagtcagtca aaatgatcaa aattatgaa gagaataagc aattctgttc 2220
 ttattagga cacagtagat acagactaca aagtggagtg tgcctaataa gaggtagcat 2280
 ttgttaagtg tcaattalcic laltalocct tggagcttct caaataaacc atataaggtg 2340
 taagatgta aaggftatgg ttacactcag tgcacaggta agctaagtg ctgagagaag 2400
 ctaaattact tactggggc tcacagtaag aaagttagct gaagttcag cccagattta 2460
 actggattct gggcicttta ttcatgttac ttcatgaatc tgtttctcaa ttgtgcagaa 2520
 aaaagggggc tattataag aaaagcaala aacaacaag taatgatctc aaataagtaa 2580
 tgcaagaaat agtgagatt caaaatcagt ggcagcagtt tctcagttct gtctaaagtg 2640
 gcctgtctca atcacctgct atcttttagt ggagctttga aattatgltt cagacaactt 2700
 cgattcagtt ctagaatgtt tgcactcagca aattcacagg ctcatcttc taactgatg 2760
 gtgaatattg aaattcagct aaatggatgt taataaaatt caaacgtttt aaggacagat 2820
 gaaaaatgaca gaattttaag gtaaaatata tgaaggaata taagataaag gattttctca 2880
 ccttcagcaa aaacataccc aciaattagt aaaatlaata ggcaaaaaaa agltgcatgc 2940
 tcttatactg taatgattat catltaaaa ctagctttt gccttcgagc fatcggggta 3000
 aagacctaca ggaaaactac tctcgaatc ctgagggga agaaggggga ccttgggtt 3060
 tcacaagcaa tccagaggta cgtacgaag tctgtgacat tctcagttt tcagaagttg 3120
 aatgcatgac ctgcaatggg gagagttatc gaggtctcat ggatcataca gaatcaggca 3180
 agatttgta cgcctgggat calcagacac cacaccggca caaattctg cctgaaagat 3240
 atcccacaa gggctttgat gataattatt gccgcaatcc cgatggccag ccgaggccat 3300
 ggtgtalac tcttgacct cacaccogct gggagtactg tgcattaaa acatgcgctg 3360
 acaatactat gaatgacct gatgtcctt tggaaacaac tgaalgcalc caaggtaag 3420
 gagaaggcta caggggact gtcaatacca ttggaatgg aattccatgt cagcgtggg 3480
 atttcaglia tctcagcag catgacaiga ctctgaaaa ttcaagtc aaggacctac 3540

ES 2 773 305 T3

gagaaaatta ctgccgaat ccagatgggt ctgaatcacc ctgggtttt accactgatc 3600
 caaacatccg agttggctac tgcctccaaa ttccaaactg tgatagtca catggacaag 3660
 attgtatcg tgggaatggc aaaaattata tgggcaactt atcccaaaca agatctggac 3720
 taacalgttc aatgtgggac aagaacalgg aagacttaca tgcctatc tctgggaac 3780
 cagatgcaag taagctgaat gagaattact gccgaaatcc agatgatgat gctcatggac 3840
 cctgtgcta cacgggaaat ccactcattc ctggggatta ttgccctatt tctcgttgg 3900
 aaggtagalac cacacctaca atagtcaatt tagaccatcc cgtaataatc tgtcccaaaa 3960
 cgaacaallt gcgagtgtta aatgggattc caacacgaac aacatagga tggatggta 4020
 gtttgagala cagaaataaa catatctgog gaggatcatt gataaaggag agttgggttc 4080
 ttactgcacg acagtgttc cctctcag actigaaaga ttatgaagct tggctggaa 4140
 ttcatgatgt ccacggaaga ggagatgaga aatgcaaaca ggttctcaat gttcccagc 4200
 tggatattgg cctgaagga tcatatctgg tttaatgaa gcttgccagg cctgctgccc 4260
 tggatatttt tgltagtac attgattac ctaattatgg atgcacaatt cctgaaaaga 4320
 ccagttgcag tgttatggc tggggctaca ctggattgat caactatgat ggccattac 4380
 gagtggcaca tctctatata atgggaaatg agaaaigcag ccagcatcat cgaggggaagg 4440
 tgactctgaa tgagctgaa atatgtgctg gggctgaaaa gattgatca ggaccatgtg 4500
 agggggatta tggggccca ctgtttgtg agcaacataa aatgagaatg gttcttggg 4560
 tcatgttcc tggctgga tgtgccattc caaatctcc tggatlltt gtccagtag 4620
 catattatgc aaaatggata cacaaaatta ttttaacata taaggtacca cagtcatag 4679

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

5

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de HGF-X7

<400> 9

atgtgggiga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc algtccclct gcactcclc 60
 ctgctccca tgcctatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120
 gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaatag atccagcact gaagataaaa 180
 accaaaaaag tgaalacigc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt 240
 ccattcactt gcaaggcftt tglttttgat aaagcaagaa aacaalgcct ctggttcccc 300
 ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa 360
 aacaagact acattagaaa ctgcattcatt ggtaaaggac gcagctacaa gggaacagta 420
 tctatcacta agagtggcat caaatgtcag cctggagtt ccatgatacc acacgaacac 480
 aggtaagaac agtatgaaga aaagagatga agcctctgct tttttacat gtaacagtc 540
 tcatattagt cctcagaat aattclacaa tcttaaaata acttagccaa ctgtctgaat 600
 tgtattacgg caaggtttat atgaallcat gactgatatt tagcaaatga ttaattaata 660
 tgttaataaa atgtagccaa aacaalactt tacctaalg cctcaalltg tagatctcgg 720
 tattttgga tctgggtag gaaacacatt tgaatgtat ttactaagat actaaaatcc 780

ES 2 773 305 T3

ttggacttca ctctaatttt agtgccattt agaactcaag gtctcagtaa aagtagaaat 840
 aaagcctgtt aacaaaacac aaactgaata ttaaaaatgt aaciggtatt tcaaagaaat 900
 gtttactggg atfacctgia gatgtataat ctttattatg atcttttgg (aaagctcgg 960
 cagacaaatg caatalctaa ttgttgagtc caatalcaca agcagtacaa aagtataaaa 1020
 aagacttggc ctttctaatt gigttaaaat actttatgct ggtaataaca cttagagtag 1080
 ggcactagaa atftlaagtg aagataatgt gttgcagtia ctgcactcaa tggcttacta 1140
 ttataacca aaactgggat cactaagctc caglcagtica aaatgatcaa aattattgaa 1200
 gagaalaagc aattctgttc ttattagga cacagtagat acagactlaca aegtggagtg 1260
 tgcctaata gaggtagcat ttglaagtg tcaaltactc tattatccct tggagcttct 1320
 caaaaatacc atataagggtg taagatgta aagggtatgg ttacactcag tgcacaggta 1380
 agctaalaag ctgagagaag cttaaactt tactggggtc tcacagtaag aaagtgagct 1440
 gaagttcag cccagattia actgqattct gggctcttta ttcatgtac ttrattgaatc 1500
 tgtttcctaa ttgtcagaa aaaagggggc tatttataag aaaagcaata aacaaacaag 1560
 taatgatctc aaataagtaa tgaagaat agtgagattt caaaatcagt ggcagcgatt 1620
 tctcagttct gtctaagtg gcctgtctca atcacctgct atctttatg ggagctttga 1680
 aattatgitt cagacaactt cgattcagtt ctagaatglt tgcactcagca aattcacagg 1740
 ctcatcttc laactgatg gtgaatattg aaattcagct aaatggatgt taataaaatt 1800
 caaacgtttt aaggacagat ggaatgaca gaattttaag gtaaaatata tgaaggaata 1860
 taagataaag gatttttcta cctcagcaa aaacataccc actaaitagt aaaattaata 1920
 ggcgaaaaaa agttgatgc tcttactctg taatgattat cattttaaaa ctagcttttt 1980
 gccttcagc fatcgggta aagacctaca ggaaaactac tgcgaaatc ctgagggga 2040
 agaaggggga ccttggtgtt tcacaagcaa tccagaggta cgtacgaag tctgtgacat 2100
 tccicaggt tcaagaattg aatgatgac ctgcaatggg gagagttatc gaggctcat 2160
 ggalcataca gaatcaggca agatttga gcgctgggat calcagacac cacaccggca 2220
 caaattctg cctgaagat atcccgacaa gggctttgat gataattatt gccgcaatcc 2280
 cgalggccag ccgaggccat ggtgctatac tctgacctc cacaccgct gggagtactg 2340
 tgaattaaa acatgcgctg acaatactat gaatgacact gatgttctt tggaaacaac 2400
 tgaatgcatc caaggccaag gagaaggcta caggggcacl gtcaatacca ttggaatgg 2460
 aattcatgt cagcgttggg attctcagta tctcagag catgacatga ctctgaaaa 2520
 ttcaagtg aaggacctac gagaaaatta ctgccgaaat ccagatgggt ctgaatcacc 2580
 ctgggtttt accactgatc caaacatccg agttggctac tgcctccaaa ttccaaactg 2640
 tgatattga catggacaag attgttatcg tgggaatggc aaaaattala tgggcaactt 2700
 atcccaaca agatctggac taacatgttc aatgtgggac aagaacatgg aagacttaca 2760
 tctcatatc ttctgggaac cagalgaag taagctgaat gagaattiac gccgaaatcc 2820
 agatgatgat gctcatggac cctgggtcta cacgggaaat ccaactaltc ctgggatta 2880
 ttgccatct tctgttgg aagggtalac cacacctaca atagtcaatt tagaccaicc 2940
 cgtataatc tgtccaaaa cgaacaatt gcgagttga aatgggattc caacacgaac 3000
 aaacatagga tggatgltta gtttagata cagaataaaa catatctgcg gaggatcatt 3060

ES 2 773 305 T3

gataaaggag agltgggtc ttactgcacg acagigtffc ccttctcgag actgaaaga 3120
ttatgaagct tggcttgaa tcatgatgt ccacggaaga ggagatgaga aatgcaaca 3180
ggftctcaat gttcccagc tggatgatg cccgaagga tcagatctgg tttaatgaa 3240
gctgccagg cctcctgcc tggatgatt tgttagtac atgattac claattaigg 3300
atgcacaatt cctgaaaaga ccagttcag ttttatggc tggggctaca ctggattgat 3360
caactatgat ggcctattac gagtggcaca tctctatata atgggaaaig agaaatgcag 3420
ccagcatcat cgaggggaagg tgactctgaa tgagtctgaa ataigtctg gggctgaaaa 3480
gattggatca ggaccatgtg agggggaita tggtgccca ctgttttg agcaacataa 3540
aalgagaalg gttctggig tcaatgtcc tggctgga tggccattc caaatctgc 3600
tggatttt gtccgagtag catattatgc aaaatggata cacaaaatta ttttaacata 3660
taaggtaacca cagtcatag 3679

- <210> 10
- <211> 2729
- <212> ADN
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia de nucleótidos de HGF-X8
- <400> 10

ES 2 773 305 T3

atgigggtga ccaaactccl gccagccctg ctgctgcagc atgtctctct gcatctctc 60
 ctgclcccca tggccatccc clatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120
 gaaltcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa 180
 accaaaaaag tgaalactgc agaccaatgt gctaatagat gtaactaggaa taaaggactt 240
 ccaltcactt gcaaggcttt tgttttggat aaagcaagaa aacaatgcct ctggtlcccc 300
 ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttgccc atgaattga ccclcatgaa 360
 aacaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctacaa gggacacagta 420
 tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccttgagggti ccatgalacc acacgaacac 480
 agglaagaac agtaigaaga aaagagatga agcctctgic tttttacat gttaacagtc 540
 tcatattagt ccttcagaat aattctaca lcctaaaata acttagccaa ctgctgaat 600
 tgtattacgg caaggttat atgaattcat gactgatatt tagcaaatga tiaattaata 660
 tgttaataaa atglagccaa aacaatact taccttaatg cctcaattg tagatctgg 720
 tatttgga tccitagt ttagacaact tggattcagt tctagaatgt ttgactcagc 780
 aaaltcacag gctcatcttt ctaacttgat ggtaaatatg gaaaltcagc taaatggatg 840
 ttaataaaat tcaaacgttt taaggacaga tgaaaatgac agaattftaa ggtaaaatat 900
 atgaaggaat ataagataaa ggattttct accttcagca aaaacatacc cactaattag 960
 taaaaltaat aggcaaaaaa aagttgcatg ctcttatact gtaatgatta tcaattfaaa 1020
 actagctttt tgccttcag ctatcgggtt aaagacctac aggaaaaacta ctgtcgaaat 1080
 cctcgagggg aagaaggggg accttggtgt ttcacaagca atccagaggt acgctacgaa 1140
 gtcgtgaca ttccicagtg ttcagaagtt gaatgcatga cctgcaatgg ggagagttat 1200
 cgaggctca tggatcatac agaalcaggc aagatttgc agcgtcggga tcatcagaca 1260
 ccacaccggc acaaatctt gccgaaaga talcccgaca agggcttga tgataattat 1320

ES 2 773 305 T3

tggcgaatc ccgatggcca gccgaggcca tgggtctata ctctgaccc tcacaccgc 1380
 tgggagtact gtgcaattaa aacatgcgct gacaatacta tgaatgacac tgaatgtcct 1440
 ttggaacaa ctgaatgcat ccaaggctca ggagaaggct acagggggcac tgcataacc 1500
 attggaatg gaattccatg tcagcgttgg gattctcagt atcccaaga gcatgacatg 1560
 actcctgaaa attcaagtg caaggacctc cgagaaaatt actgccgaaa tccagatggt 1620
 ctgaatcacc ctggtgitt accactgatc caaacatccg agttggctac tgctcccaaa 1680
 ttccaaactg tgatagtca calggacaag attgllatcg tgggaatggc aaaaattala 1740
 tgggcaactt atcccaaca agatctggac taacatgttc aatgtgggac aagaacatgg 1800
 aagacttaca tgcataatc ttctgggaa cagatgcaag taagctgaat gagaattact 1860
 gccgaaatcc agatgatgat gctcatggac cctggtgcta cccgggaaat ccactcattc 1920
 ctggggalla tggccattt tctcgttgg aagggtalac cacacctaca atagtcaait 1980
 tagaccatcc cgtaatatc tgtcccaaaa cgaacaait gogagtgtga aatgggattc 2040
 caacacgaac aaacalagga tggatgglla gttgagata cagaaataaa catactcgg 2100
 gaggatcatt gataaaggag agttgggttc ttactgcaag acagtgttc cctctcag 2160
 actgaaaga ttatgaagct tggctggaa ttcatgatg ccaacgaaga ggagatgaga 2220
 aatgcaaca ggttctcaat gttcccagc tggatatagg ccctgaagga tcagatctgg 2280
 tttaafgaa gcttgcagg cctgctgccc tggatgatt ttttagtacc atgattiac 2340
 claattatgg algcaaat cctgaaaaga ccagttgacg ttttatggc tggggctaca 2400
 ctgattgat caactatgat ggcctattc gagtggcaca tctctatata atgggaaatg 2460
 agaaatgac ccagcatcat cgaggggaagg tgactctgaa tgagtctgaa atatgtcgtg 2520
 gggctgaaa gattgatca ggaccatgtg agggggatta tggggccca ctgtttgtg 2580
 agcaacataa aatgagaatg gttctggtg tcaatgtcc tggctgga tgtccattc 2640
 caaatcgtcc tggattttt gtcgagtag catattatgc aaaaaggata cacaaaatta 2700
 ttttaacata taaggtaacca cagcatag 2729

- 5 <210> 11
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Cebador directo para el gen BAX

- <400> 11
- ggcagacagt gaccatcttt 20

- 10 <210> 12
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 15 <223> Cebador inverso para el gen BAX

- <400> 12
- agtggacctg aggtttattg 20

- <210> 13
- <211> 20
- 20 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

ES 2 773 305 T3

<220>
<223> Cebador directo para el gen BCL-2

<400> 13
ccatcaatca aagccaagca 20

5 <210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso para el gen BCL-2

10 <400> 14
agccttcacg caagttcagg 20

15 <210> 15
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo para el gen GAPDH

20 <400> 15
ccatcactgc cactcagaag ac 22

<210> 16
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador inverso para el gen GAPDH

<400> 16
tcatactgg caggttctc c 21

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de prevención o el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica, conteniendo la composición, como principio activo, dos o más isoformas del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) o un polinucleótido que codifique las isoformas, en la que las dos o más isoformas del HGF incluyen el HGF de longitud completa (flHGF), que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y la variante de eliminación del HGF (dHGF), que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que las dos o más isoformas del HGF son codificadas por secuencias de nucleótidos diferentes.
- 10 3. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que las dos o más isoformas del HGF son codificadas por una única secuencia de nucleótidos.
4. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que el polinucleótido es un ADN desnudo, o está contenido en un sistema de suministro genético.
5. La composición para el uso de la reivindicación 4, en la que el sistema de suministro genético es un vector.
6. La composición para el uso de la reivindicación 5, en la que el vector es un plásmido.
- 15 7. La composición para el uso de la reivindicación 6, en la que el vector es el pCK.
8. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que el polinucleótido incluye una secuencia correspondiente del exón 1 al exón 18 de un gen del HGF humano, y el intrón 4 de un gen del HGF humano o su fragmento como una secuencia insertada adicionalmente entre el exón 4 y el exón 5.
- 20 9. La composición para el uso de la reivindicación 8, en la que el polinucleótido incluye una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 10.
10. La composición para el uso de la reivindicación 9, en la que el polinucleótido incluye una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9.
11. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que el polinucleótido se administra a una dosis de 1 µg a 2.500 mg.

25

Fig. 1

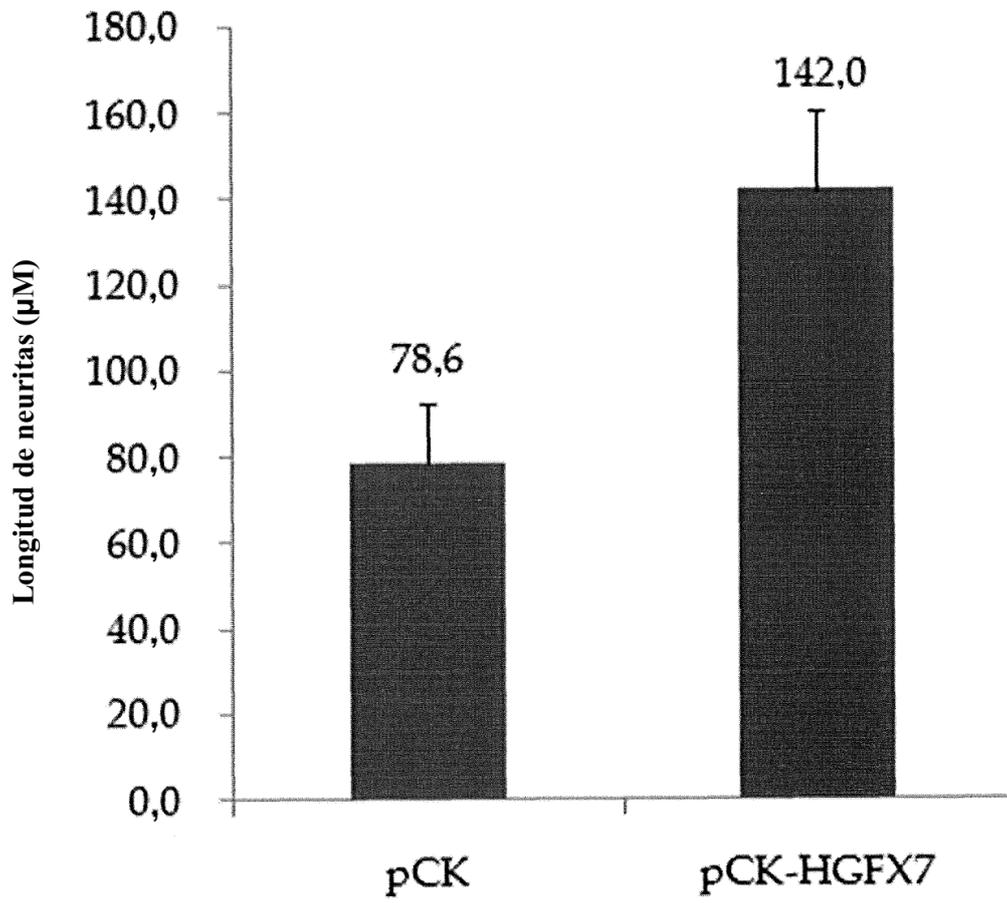


Fig. 2

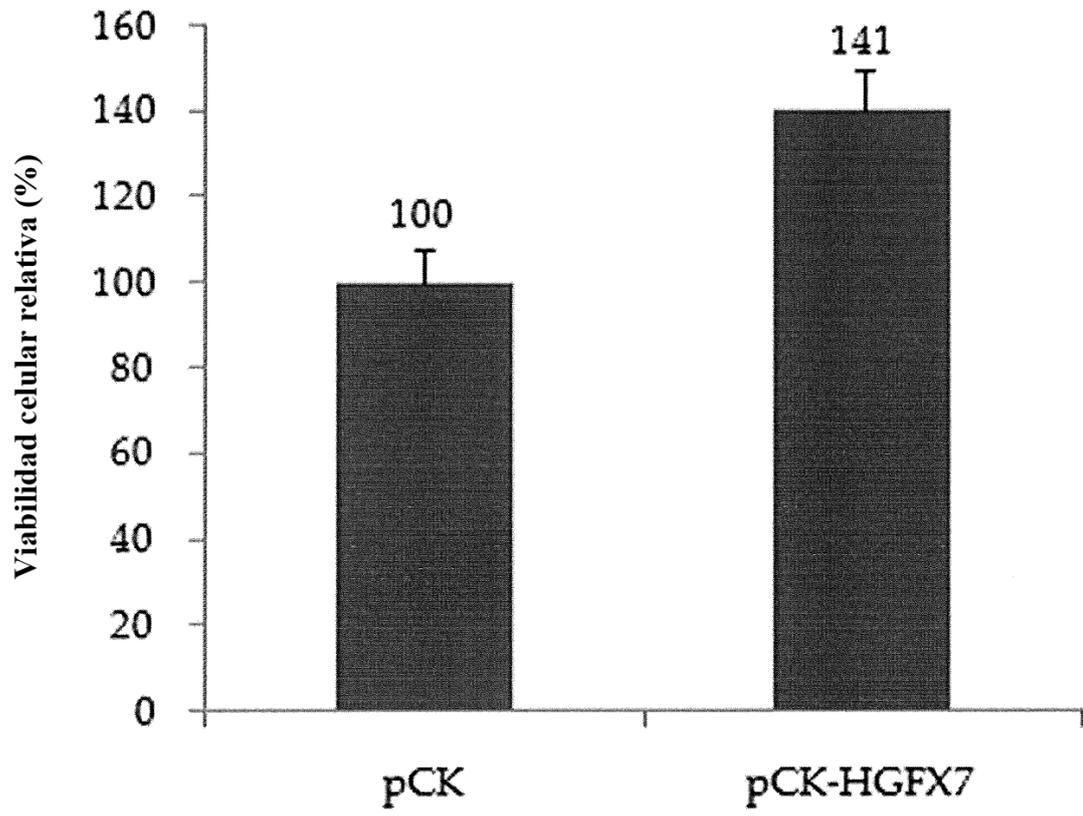


Fig. 3

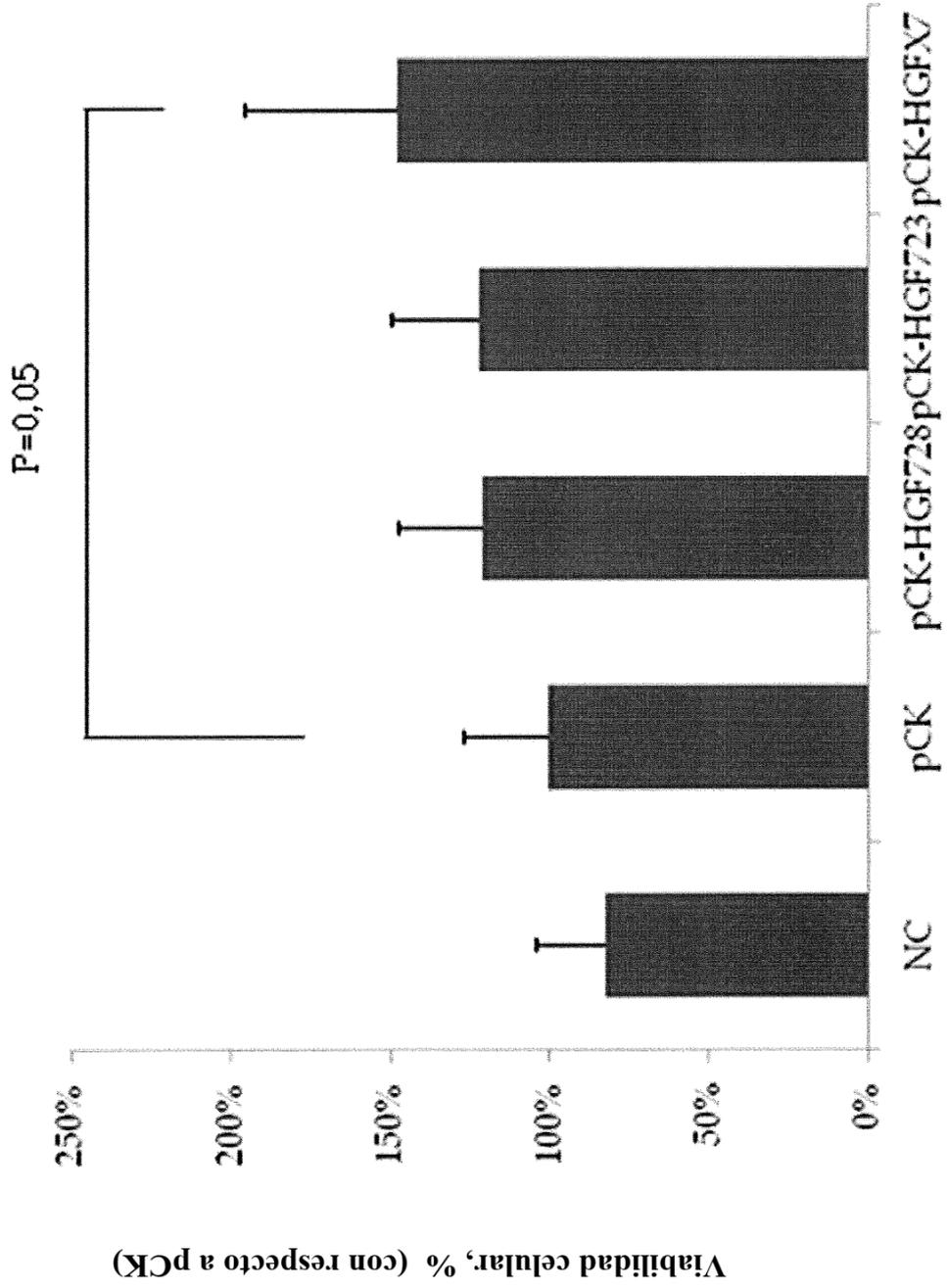


Fig. 4a

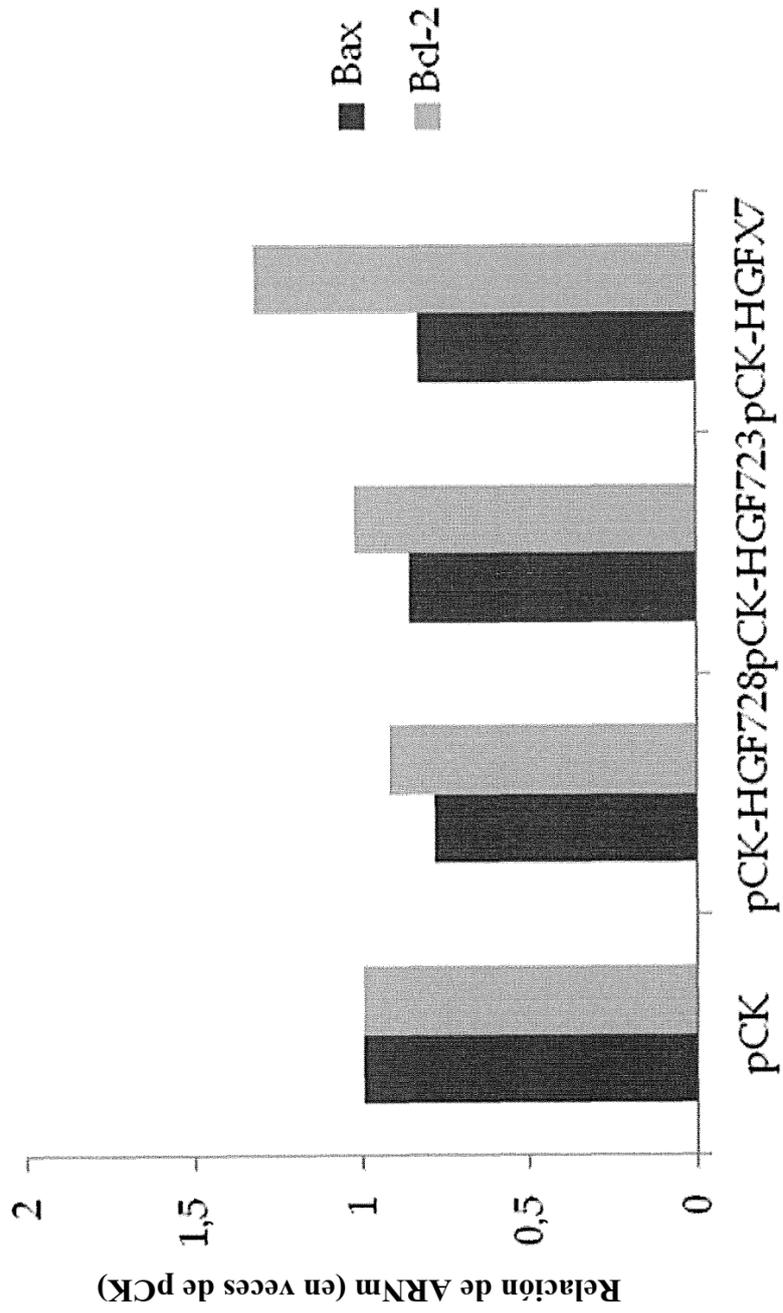


Fig. 4b

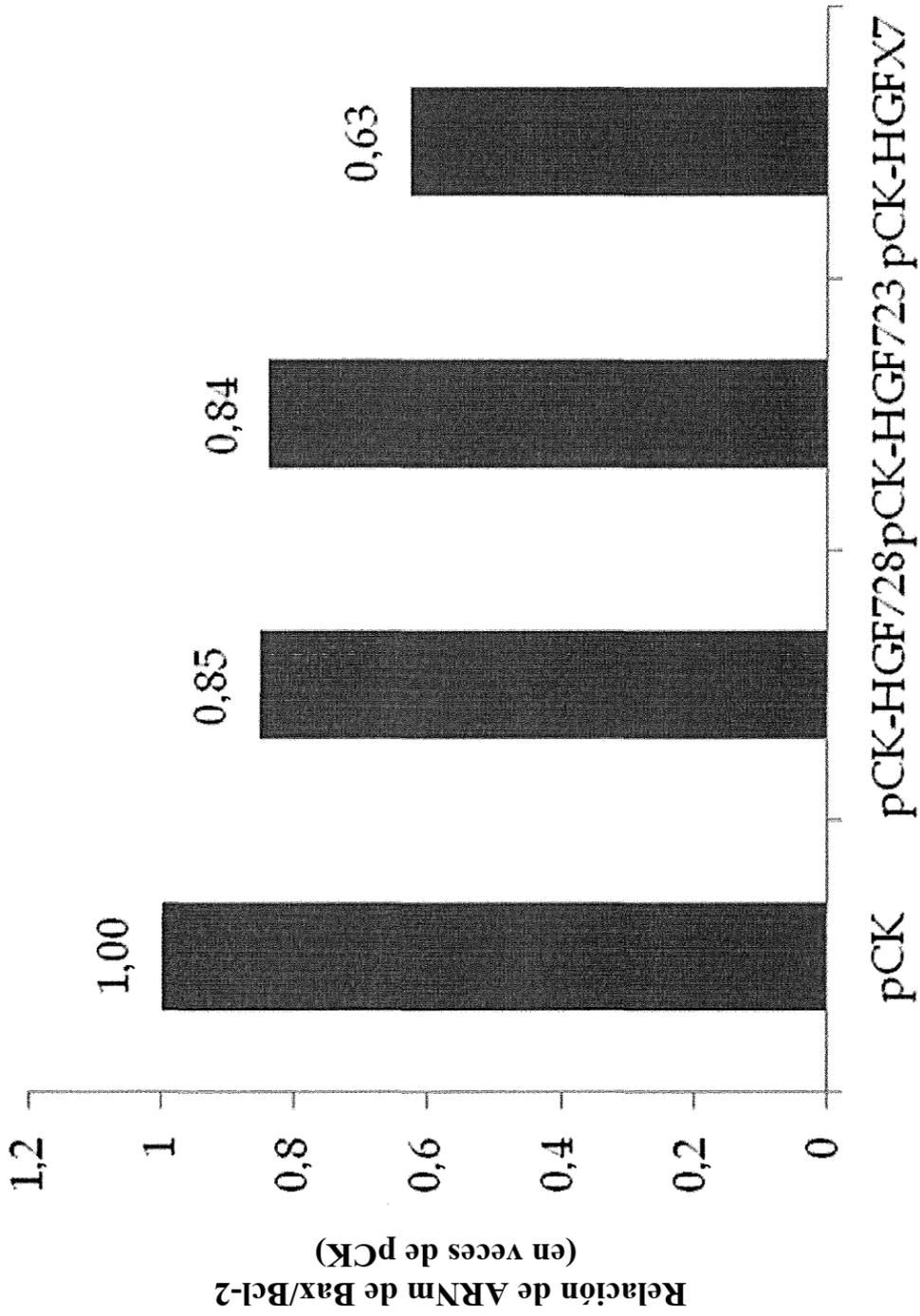


Fig. 5

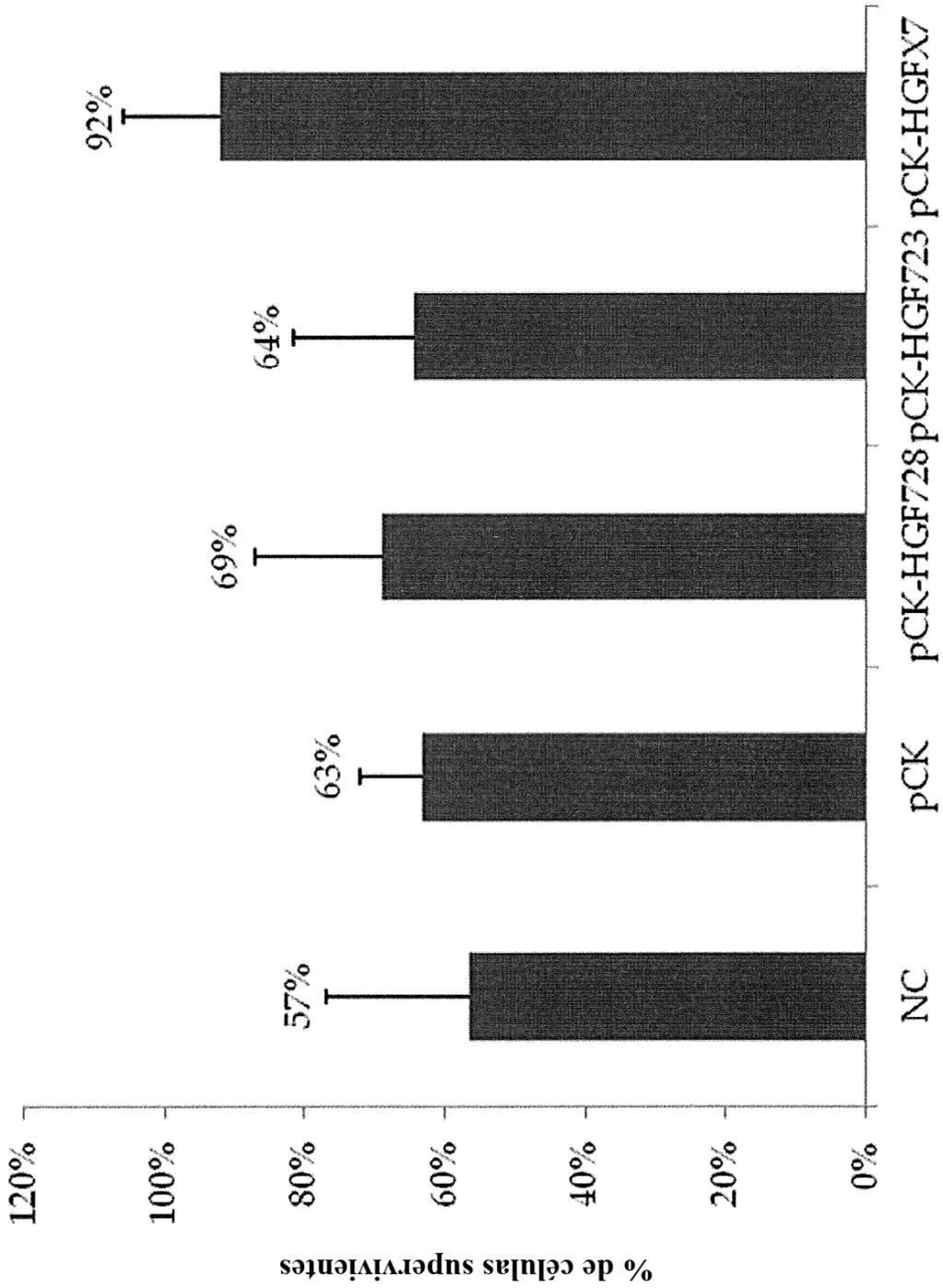


Fig. 6a

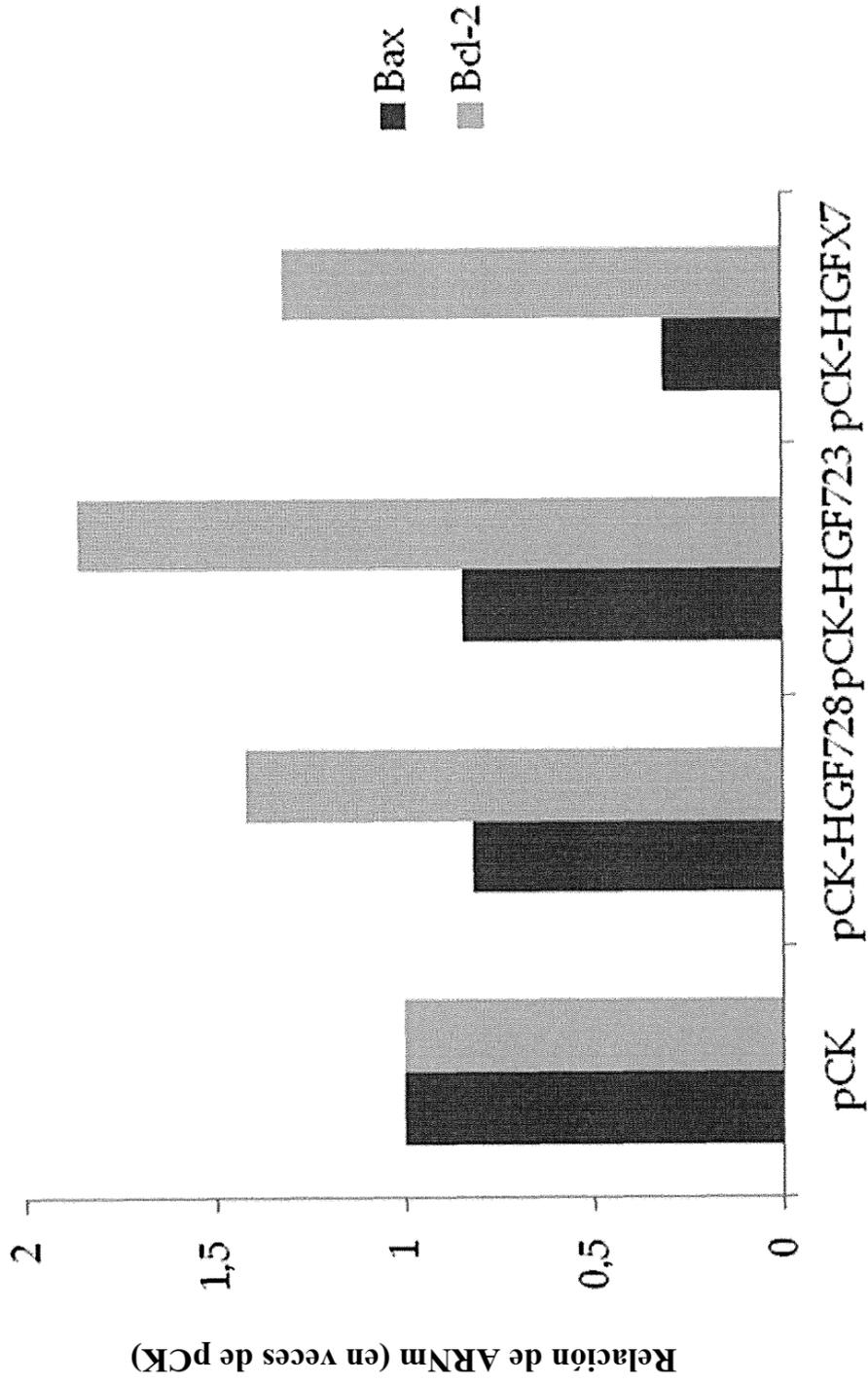


Fig. 6b

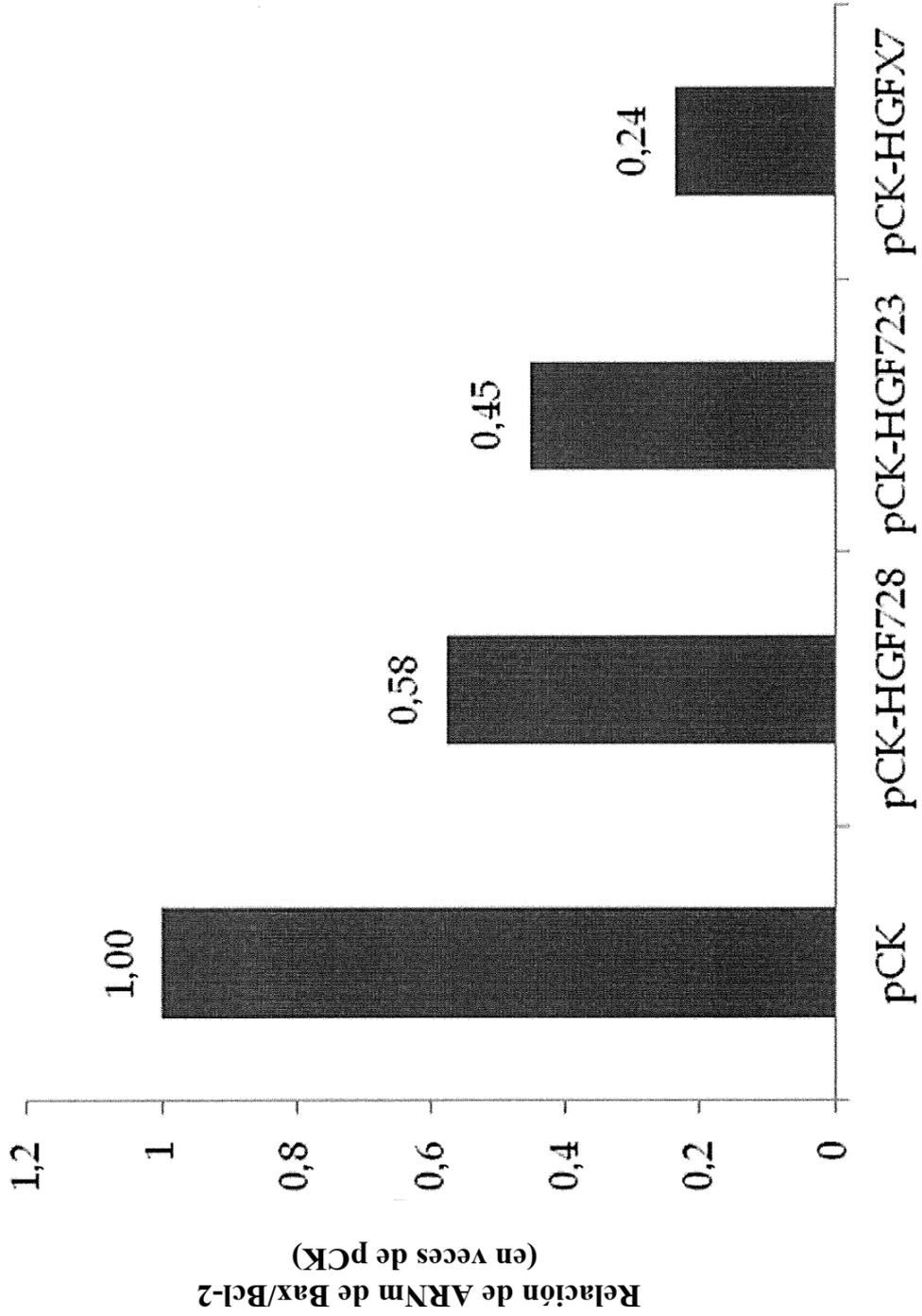


Fig. 7

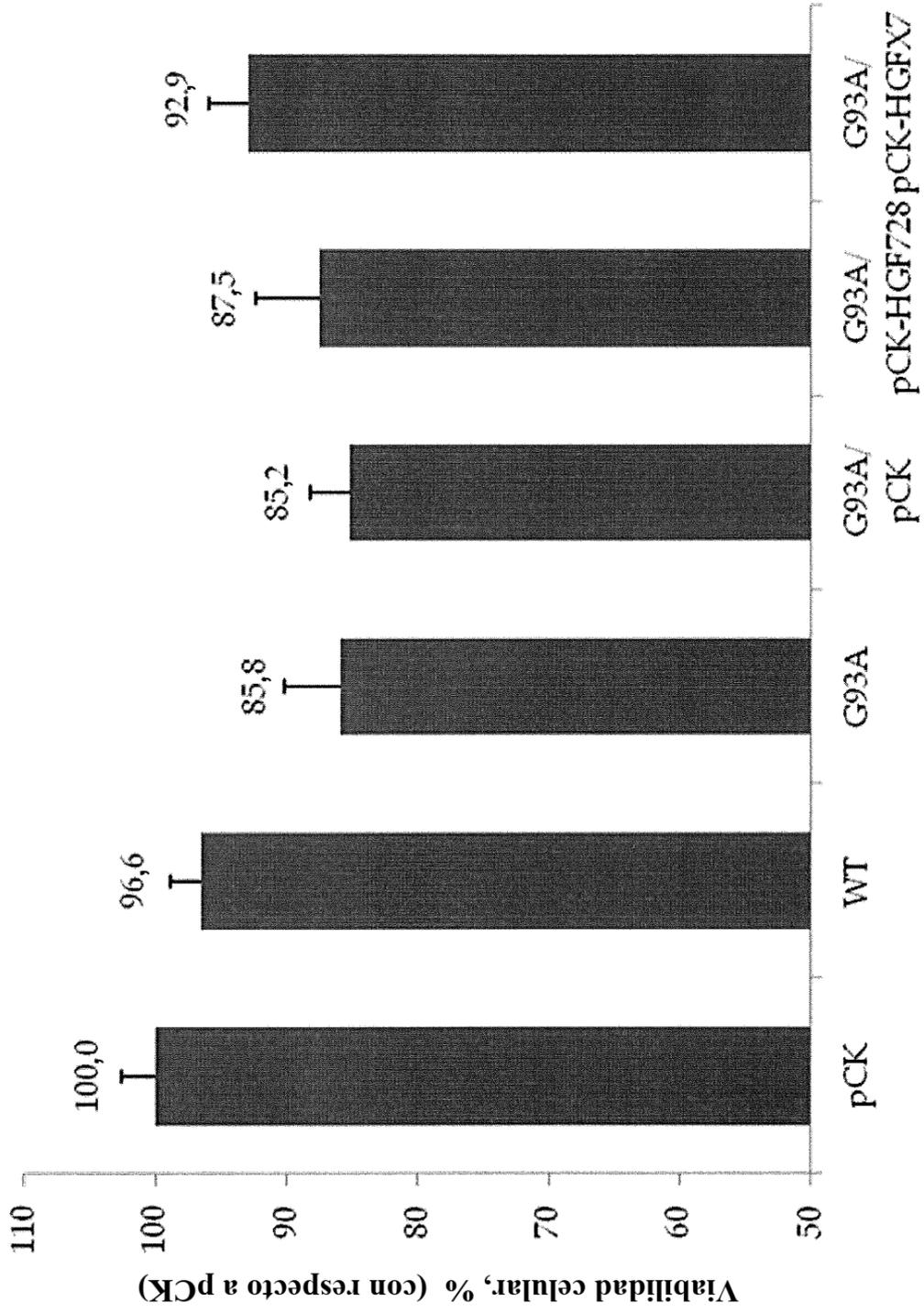


Fig. 8

