



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 293 553**

51 Int. Cl.:
A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **05720656 .7**

86 Fecha de presentación : **07.03.2005**

87 Número de publicación de la solicitud: **1722811**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **22.11.2006**

54 Título: **Uso de factor de crecimiento de hepatocitos para promover la inducción de diferenciación vascular.**

30 Prioridad: **09.03.2004 JP 2004-66415**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

73 Titular/es: **Tohoku Technoarch Co., Ltd.**
468, Aoba, Aramaki-aza, Aoba-ku
Sendai-shi, Miyagi 980-0845, JP
Kringle Pharma Inc.

72 Inventor/es: **Kubo, Hiroshi;**
Ishizawa, Kota;
Sasaki, Hidetada y
Nakamura, Toshikazu

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Uso de factor de crecimiento de hepatocitos para promover la inducción de diferenciación vascular.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al uso de factor de crecimiento de hepatocitos para la fabricación de un medicamento para promover la inducción de la diferenciación de células de médula ósea en células progenitoras endoteliales o células endoteliales.

10 **Antecedentes de la técnica**

El factor de crecimiento de hepatocitos (de aquí en adelante denominado HGF) se identificó originalmente como un factor de crecimiento para hepatocitos maduros, y se clonó su gen (ADNc) en 1989 (véanse las referencias bibliográficas no de patente 1 y 2).

Se ha descubierto hasta ahora que el HGF ejerce diversas actividades biológicas tales como proliferación celular, promoción de la migración celular, inducción de la morfogénesis, inhibición de la muerte celular y similares en diversas células así como hepatocitos (véanse las referencias bibliográficas no de patente 3 a 6).

Las actividades biológicas del HGF se expresan mediante su receptor, concretamente la c-Met tirosina cinasa. El HGF tiene diversas actividades biológicas y tiene funciones de reparación y protección en diversos tejidos de diversas lesiones.

La actividad promotora de la angiogénesis es una de las funciones de regeneración o protección de tejidos del HGF. El HGF no sólo estimula la proliferación y migración de células endoteliales vasculares, sino que también muestra una potente actividad inductora de la angiogénesis *in vivo* (véanse las referencias bibliográficas no de patente 7 a 10).

Sin embargo, ninguna de las referencias bibliográficas anteriormente mencionadas describe que el HGF promueva la inducción de la diferenciación de células de médula ósea en células progenitoras endoteliales o células endoteliales.

[Referencia bibliográfica de patente 1]: documento JP-A-89869/1996.

[Referencia bibliográfica de patente 2]: documento JP-A-172207/1994.

[Referencia bibliográfica no de patente 1]: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1984, vol. 122, pág. 1450-1459.

[Referencia bibliográfica no de patente 2]: *Nature*, 1989, vol. 342, pág. 440-443.

[Referencia bibliográfica no de patente 3]: *The Journal of Cell Biology*, 1985, vol. 129, pág. 1177-1185.

[Referencia bibliográfica no de patente 4]: *The Journal of Biochemistry*, 1986, vol. 119, pág. 591-600.

[Referencia bibliográfica no de patente 5]: *International Review of Cytology*, 1999, vol. 186, pág. 225-260.

[Referencia bibliográfica no de patente 6]: *Kidney International*, 2001, vol. 59, pág. 2023-2038.

[Referencia bibliográfica no de patente 7]: *The Journal of Cell Biology*, 1992, vol. 119, pág. 629-641.

[Referencia bibliográfica no de patente 8]: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, vol. 90, pág. 1937-1941.

[Referencia bibliográfica no de patente 9]: *Circulation*, 1998, vol. 97, pág. 381-390.

[Referencia bibliográfica no de patente 10]: *Hypertension*, 1999, vol. 33, pág. 1379-1384.

Descripción de la invención

Recientemente, el concepto de angiogénesis ha cambiado en gran medida. Es decir, la angiogénesis en adultos se había considerado como el resultado sólo de la proliferación y migración de células endoteliales vasculares existentes, sin embargo, ahora se ha sugerido que hay una posibilidad de que pueda tener lugar la regeneración vascular de tipo vasculogénico, que se ha considerado que aparece sólo en la etapa embrionaria, como resultado de la angiogénesis que aparece cuando están implicadas células progenitoras endoteliales en el flujo sanguíneo. Basándose en esta suposición, se espera actualmente el desarrollo de un método terapéutico para la regeneración de los vasos sanguíneos mediante la aplicación de células progenitoras endoteliales o células endoteliales.

Puesto que las células progenitoras endoteliales en adultos derivan de la médula ósea, es un objeto de la presente invención proporcionar un agente para promover la inducción de la diferenciación de células de médula ósea en células progenitoras endoteliales o células endoteliales.

Los presentes inventores han encontrado hace poco que (1) la expresión de las células progenitoras endoteliales aumenta en la sangre periférica mediante la administración de HGF, (2) dicho aumento deriva de células de médula ósea, y (3) el HGF promueve la inducción de la diferenciación de células de médula ósea en células progenitoras endoteliales o células endoteliales. Basándose en estos descubrimientos, los presentes inventores han estudiado adicionalmente y completado la presente invención.

A saber, la presente invención se refiere al uso de HGF para preparar un medicamento para promover la inducción de la diferenciación de células de médula ósea en células progenitoras endoteliales o células endoteliales.

Además, se describe en la presente memoria un método para cultivar células de médula ósea junto con un agente para la inducción de la diferenciación que contiene HGF, y transplantar a mamíferos células progenitoras endoteliales o células endoteliales diferenciadas de células de médula ósea, o un método para cultivar células de médula ósea, transplantar las células de médula ósea proliferadas a mamíferos y simultáneamente administrar un agente para promover la inducción de la diferenciación que contiene HGF, e inducir la diferenciación de las células de médula ósea transplantadas en células progenitoras endoteliales o células endoteliales.

Es más, se describe en la presente memoria un medicamento génico para promover la inducción de la diferenciación de células de médula ósea en células progenitoras endoteliales o células endoteliales, que comprende la introducción del gen de HGF, así como la administración de HGF.

El agente para promover la inducción de la diferenciación vascular según la presente invención acelera la inducción de la diferenciación de células de médula ósea en células progenitoras endoteliales o células endoteliales. Las células progenitoras endoteliales se diferencian en células endoteliales, y las células endoteliales exhiben efectos que dan como resultado angiogénesis de tipo vasculogénico o regeneración vascular. Puesto que el agente de la presente invención promueve la inducción de la diferenciación de células de médula ósea en células progenitoras endoteliales o células endoteliales, es útil para el tratamiento de enfermedades que requieren angiogénesis o regeneración vascular.

Además, al cultivar células de médula ósea en presencia de un agente para promover la inducción de la diferenciación según la presente invención, pueden producirse células progenitoras endoteliales o células endoteliales diferenciadas a partir de células de médula ósea. Las células progenitoras endoteliales o células endoteliales obtenidas como tales pueden utilizarse como células de trasplante para angiogénesis o regeneración vascular en el campo de la medicina regenerativa.

Breve explicación de los dibujos

La Fig. 1 muestra la distribución de la expresión de anticuerpos FIK-1 en la fracción celular derivada de médula ósea de sangre periférica de ratones receptores con capilares pulmonares lesionados.

La Fig. 2 muestra los descubrimientos histológicos de pulmón de ratones receptores con capilares pulmonares lesionados.

La Fig. 3 muestra la tinción de inmunofluorescencia de capilares pulmonares en ratones receptores con capilares pulmonares lesionados.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

El HGF utilizado en la presente invención es una sustancia conocida. Puede utilizarse en la presente invención el HGF preparado mediante diversos procesos, a condición de que esté suficientemente purificado para utilizarse como agente medicinal. Respecto a los procesos de producción de HGF, por ejemplo, el HGF puede obtenerse cultivando células de cultivo primario o células de una estirpe celular establecida que produce HGF, aislando el HGF a partir de sobrenadante de cultivo o similar y purificando el HGF aislado. Como alternativa, el HGF recombinante puede obtenerse también según una técnica de ingeniería genética integrando un gen que codifica HGF en un vector apropiado, insertando el vector en células huésped apropiadas para transformación de las mismas y recogiendo el HGF recombinante a partir del sobrenadante de cultivo de las células transformadas (véanse, por ejemplo, los documentos JP-A-111382/1993; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, vol. 163, pág. 967).

Las células huésped anteriormente mencionadas no están particularmente limitadas, y pueden utilizarse diversos tipos de células huésped utilizadas convencionalmente en las técnicas de ingeniería genética, tales como *Escherichia coli*, levadura, células animales con la excepción de células madre embrionarias humanas o similares. El HGF obtenido, a condición de que tenga sustancialmente la misma actividad que el HGF natural, puede incluir sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del mismo. De forma similar, el HGF puede incluir sustitución, delección y/o adición de cadena(s) de azúcar. Aquí, la “delección, sustitución, adición o inserción de uno o más aminoácidos” en la secuencia de aminoácidos significa que los aminoácidos pueden eliminarse, sustituirse, añadirse y/o insertarse en la secuencia de aminoácidos en un número que puede apare-

cer naturalmente (uno a varios aminoácidos) mediante métodos técnicos conocidos tales como técnicas de ingeniería genética, inducción de mutación específica de sitio y similares.

También el “HGF que incluye sustitución, delección y/o adición de cadena(s) de azúcar” significa, por ejemplo, (1) HGF deficiente de glicosilación que se obtiene tratando un HGF glicosilado natural con una enzima para eliminar la(s) cadena(s) de azúcar, (2) HGF del que la secuencia de aminoácidos está mutada en un sitio de glicosilación para inhibir la glicosilación, o (3) HGF del que la secuencia de aminoácidos está mutada de tal manera que aparezca glicosilación en un sitio diferente del sitio de glicosilación natural.

Además, el HGF incluye también una proteína que tiene al menos 60% o más de homología, preferiblemente 80% o más de homología, más preferiblemente 90% o más de homología, aún más preferiblemente 95% o más de homología con la secuencia de aminoácidos de HGF, y que tiene también una actividad para inducir la diferenciación de células de médula ósea en células progenitoras endoteliales o células endoteliales. La “homología” anteriormente mencionada entre secuencias de aminoácidos significa generalmente el nivel de homología entre los restos de aminoácido que constituyen las secuencias de aminoácido cuando se comparan las estructuras primarias de las proteínas.

El HGF utilizado en la presente invención puede tener un grupo carboxilato ($-\text{COO}^-$), amida ($-\text{CONH}_2$) o éster ($-\text{COOR}$), así como carboxilo ($-\text{COOH}$), en su terminación C, a condición de que tenga sustancialmente la mismas actividades que el HGF natural. Aquí, como R en el éster pueden mencionarse grupos alquilo inferior opcionalmente sustituidos (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, ciclopentilo, bencilo, fenilo, etc.), grupos arilo (por ejemplo, fenilo, α -naftilo, etc.), grupos pivaloilo oximetilo que se utilizan generalmente en forma de éster para administración oral, y similares. Además, el HGF utilizable en la presente invención puede incluir HGF en el que un grupo amino de un resto de metionina en la terminación N está protegido con un grupo protector (por ejemplo, un grupo acilo tal como formilo, acetilo, etc.), HGF en el que un grupo glutamilo producido escindiendo un lado N-terminal *in vivo* ha cambiado a un ácido piroglutámico y similares.

En la presente invención, “células progenitoras endoteliales” significa células que se diferencian en células endoteliales, principalmente en células endoteliales vasculares.

Puesto que el agente para promover la inducción de la diferenciación según la presente invención acelera la inducción de la diferenciación de células de médula ósea en células progenitoras endoteliales o células endoteliales que participan en angiogénesis de tipo vasculogénico o regeneración vascular, puede aplicarse a enfermedades que requieren angiogénesis o regeneración vascular en mamíferos (por ejemplo, vacas, caballos, cerdos, ovejas, perros, gatos, etc.), incluyendo seres humanos. Dichas enfermedades incluyen, por ejemplo, arteriosclerosis obliterante de los miembros inferiores, infarto de miocardio, enteritis isquémica, colitis isquémica, infarto cerebral y similares. Puesto que la angiogénesis o regeneración vascular es uno de los fenómenos fisiológicos de la vasculogénesis que se observan en la etapa de curación de quemaduras o heridas, el agente para inducir la diferenciación vascular según la presente invención es también útil en el tratamiento de quemaduras y heridas.

Además, puesto que las células progenitoras endoteliales se diferencian en células endoteliales, están implicadas en la reparación de endotelio vascular lesionado. Por tanto, el agente según la presente invención para inducir la diferenciación vascular puede utilizarse para la reparación y regeneración de endotelio vascular en enfermedades que están asociadas a lesión endotelial vascular, tales como coagulación intravascular diseminada, formación de trombos de plaquetas en vasos pequeños, trombosis, arteriosclerosis, arteriosclerosis diabética, lesión endotelial vascular debida a medicamentos tales como agentes antitumorales (por ejemplo, doxorubicina, etc.), lesión endotelial vascular debida a toxicidad por tabaco, enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide, polimiositis y poliarteritis, lesión endotelial vascular causada por complicaciones debidas a enfermedades malignas tales como linfoma, leucemia, cáncer de estómago, etc., lesión endotelial vascular causada por infecciones bacterianas o víricas o por vacunación.

El agente para promover la inducción de la diferenciación vascular según la presente invención puede tomar diversas formas de dosificación tales como preparaciones líquidas, preparaciones sólidas, cápsulas y similares, sin embargo, se formula generalmente con HGF solo o con una combinación de HGF y un portador convencional en inyecciones, inhalaciones, supositorios o preparaciones administrables por vía oral. Las inyecciones anteriormente mencionadas pueden ser inyecciones acuosas o inyecciones oleosas.

En el caso de inyecciones acuosas, pueden prepararse de tal manera que el HGF se disuelva, por ejemplo, en una disolución preparada añadiendo apropiadamente un portador farmacéuticamente aceptable tal como agentes isotónicos (por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio, glicerina, manitol, sorbitol, ácido bórico, bórax, glucosa, propilenglicol, etc.), tampones (por ejemplo, tampón de ácido fosfórico, tampón de ácido acético, tampón de ácido bórico, tampón de ácido carbónico, tampón de ácido cítrico, tampón Tris, tampón de ácido glutámico, tampón de ácido ϵ -aminocaproico, etc.), conservantes (por ejemplo, p-oxibenzoato de metilo, p-oxibenzoato de etilo, p-oxibenzoato de propilo, p-oxibenzoato de butilo, clorobutanol, alcohol bencílico, cloruro de benzalconio, deshdroacetato de sodio, edetato de sodio, ácido bórico, bórax, etc.), espesantes (por ejemplo, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, poli(alcohol vinílico), polietilenglicol, etc.), estabilizantes (por ejemplo, hidrogenosulfito de sodio, tiosulfato de sodio, edetato de sodio, citrato de sodio, ácido ascórbico, dibutilhidroxitolueno, etc.), agentes de control del pH (por ejemplo, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, ácido fosfórico, ácido acético, etc.) y similares a un disolvente acuoso (por ejemplo, agua inyectable, agua purificada, etc.), y después se filtra la disolución a través de un filtro, etc., se esteriliza y se rellena con ella un recipiente estéril según un método conocido. Además, pueden utilizarse solubilizantes apropiados.

dos tales como alcoholes (por ejemplo, etanol, etc.), polialcoholes (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol, etc.) o tensioactivos no iónicos (por ejemplo, polisorbato 80, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno 50, etc.).

En el caso de preparaciones oleosas, se utilizan aceite de sésamo, aceite de soja y similares como disolvente oleoso, y pueden utilizarse benzoato de bencilo, alcohol bencílico y similares como solubilizante. Con la disolución inyectable obtenida se rellena habitualmente una ampolla o un vial. El contenido de HGF en la preparación de inyección se ajusta habitualmente aproximadamente a 0,0002 a 0,2% p/v, preferiblemente aproximadamente a 0,001 a 0,1% p/v. Es preferible que las preparaciones líquidas tales como inyecciones se conserven después de eliminar el agua mediante criopreservación o liofilización. La preparación liofilizada se redisuelve en agua destilada inyectable antes del uso.

En el caso de preparaciones administrables por vía oral, las formas de dosificación incluyen, por ejemplo, comprimidos, gránulos, gránulos finos, polvos, cápsulas, líquidos, emulsiones, suspensiones, jarabes y similares. Estas preparaciones pueden prepararse mediante un método convencional. En el caso de gránulos o comprimidos, pueden producirse utilizando aditivos farmacéuticamente aceptables tales como excipientes (por ejemplo, lactosa, azúcar blanca, glucosa, almidón, celulosa cristalina, etc.), lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, ácido esteárico, estearato de calcio, etc.), disgregantes (por ejemplo, almidón, carmelosa de sodio, carbonato de calcio, etc.), aglutinantes (por ejemplo, pasta de almidón, disolución de hidroxipropilcelulosa, disolución de carmelosa, disolución de goma arábiga, disolución de gelatina, disolución de alginato de sodio, etc.) y similares. También pueden recubrirse gránulos o comprimidos con un agente de recubrimiento apropiado (por ejemplo, gelatina, azúcar blanco, goma arábiga, cera carnauba, etc.), agentes de recubrimiento entérico (por ejemplo, celulosa acetato ftalato, copolímero de ácido metacrílico, hidroxipropilcelulosa ftalato, carboximetilcelulosa, etc.) y similares.

En el caso de cápsulas, pueden seleccionarse apropiadamente excipientes conocidos tales como estearato de magnesio, estearato de calcio, talco y ácido silícico anhidro ligero para potenciar la fluidez y lubricidad; celulosa cristalina o lactosa para aumentar la fluidez bajo presión; y los disgregantes anteriormente mencionados. El HGF se combina o granula homogéneamente con el excipiente anteriormente mencionado, o los gránulos pueden recubrirse con un agente de recubrimiento adecuado y después rellenar con ellos una cápsula, o los gránulos pueden encapsularse con una cápsula básica (por ejemplo, de gelatina) que tiene una plasticidad aumentada proporcionada por la adición de glicerina, sorbitol, etc. En caso necesario, pueden añadirse a la preparación de cápsula agentes colorantes o conservantes (por ejemplo, dióxido de azufre, p-oxibenzoato de metilo, p-oxibenzoato de etilo, p-oxibenzoato de propilo, p-oxibenzoato de butilo, etc.). La preparación de cápsula puede tomar la forma de una cápsula con recubrimiento entérico, cápsula resistente al ácido gástrico, cápsula de liberación controlada o similar, además de las preparaciones de cápsula convencionales.

En el caso de preparaciones de cápsula con recubrimiento entérico, se rellena una cápsula convencional con HGF recubierto con un agente de recubrimiento entérico o con HGF al que se añaden los excipientes adecuados anteriormente mencionados. Como alternativa, puede encapsularse HGF solo o HGF al que se añaden los excipientes adecuados anteriormente mencionados en una cápsula con recubrimiento entérico o en una cápsula formada a partir de un material básico que comprende un polímero entérico.

En el caso de jarabes, pueden seleccionarse y utilizarse apropiadamente estabilizantes (por ejemplo, edetato de sodio, etc.), agentes de suspensión (por ejemplo, goma arábiga, carmelosa, etc.), correctores (por ejemplo, jarabe simple, glucosa, etc.), perfumes y similares.

Además, pueden prepararse supositorios mediante un método de formulación convencional utilizando una base de supositorio convencional (por ejemplo, manteca de cacao, aceite láurico, glicerogelatina, macrogol, Witepsol, etc.) y similares.

Además, las preparaciones de inhalación pueden producirse mediante un método de formulación convencional. En la formulación de inhalaciones, puede utilizarse cualquier aditivo a condición de que se utilicen habitualmente para preparaciones de inhalación. Por ejemplo, además de propelentes, se utilizan los excipientes, aglutinantes, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes isotónicos, agentes de control del pH y correctores (por ejemplo, ácido cítrico, mentol, glicirrizato de amonio, glicina, perfume, etc.) anteriormente mencionados. Como propelentes, se utilizan propelentes de gas licuado, gas comprimido y similares. Los propelentes de gas licuado incluyen, por ejemplo, hidrocarburos fluorados tales como clorofluorocarbonos alternativos (por ejemplo, HCFC-22, HCFC-123, HCFC-134a, HCFC-142, etc.), éter de petróleo licuado, dimetiléter y similares. El gas comprimido incluye, por ejemplo, gas soluble (por ejemplo, gas dióxido de carbono, gas óxido nitroso, etc.) y gas inerte (por ejemplo, gas nitrógeno, etc.).

Además, el HGF utilizado en la presente invención junto con un polímero biodegradable puede formularse en una preparación de liberación retardada. En las preparaciones de liberación retardada de HGF, pueden esperarse efectos tales como el mantenimiento del nivel sanguíneo, la reducción de la frecuencia de administración, el alivio de efectos adversos, etc. Dichas preparaciones de liberación retardada pueden prepararse, por ejemplo, según el método convencional como se describe en "Drug Delivery System", capítulo 3, 1986 (publicado por CMC, Japón). El polímero biodegradable utilizado en la presente invención puede seleccionarse apropiadamente de polímeros biodegradables conocidos e incluye, por ejemplo, polisacáridos (por ejemplo, almidón, dextrano, quitosán, etc.), proteínas (por ejemplo, colágeno, gelatina, etc.), poliaminoácidos (por ejemplo, poli(ácido glutámico), polilisina, polileucina, polialanina, polimetionina, etc.), poliésteres (por ejemplo, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), polímero o copolímero de ácido

lático/ácido glicólico, policaprolactona, poli(ácido β -hidroxibutírico), poli(ácido málico), poli(anhídrido de ácido), copolímero de ácido fumárico-poli(etilenglicol-vinilpirrolidona, etc.), poli(ortoésteres), poli(ácidos alquilcianoacrilícos) (por ejemplo, poli(ácido metil- α -cianoacrilíco), etc.), policarbonatos (por ejemplo, poli(carbonato de etileno), poli(carbonato de propileno), etc.), entre los que se prefieren los poliésteres y son más preferibles poli(ácido láctico),
 5 polímeros o copolímeros de ácido láctico/ácido glicólico. Cuando se utiliza un polímero o copolímero de poli(ácido láctico/glicólico), su relación de componentes (% en moles) de poli(ácido láctico/glicólico) es de aproximadamente 100/0 a 50/50 en el caso de un tiempo de liberación retardado de dos semanas a tres meses, preferiblemente de dos semanas a un mes, aunque dicha relación depende del tiempo de liberación retardado. El peso molecular medio de dicho polímero o copolímero de poli(ácido láctico/ácido glicólico) es generalmente de 5.000 a 20.000. El polímero o
 10 copolímero de poli(ácido láctico/ácido glicólico) puede prepararse según un método conocido, por ejemplo, el método como se describe en el documento JP-A-28521/1986. Aunque no hay limitación con respecto a la relación de mezclado de HGF con polímero biodegradable, se utiliza generalmente el HGF en una cantidad de aproximadamente 0,01% p/p a 30% p/p respecto al polímero biodegradable.

15 El contenido de HGF en las preparaciones anteriormente mencionadas puede ajustarse apropiadamente dependiendo de la forma de dosificación, indicaciones, gravedad de la enfermedad, edad, etc.

El agente para promover la inducción de la diferenciación vascular de la presente invención puede contener apropiadamente otros ingredientes activos medicinales, a condición de que no sean contrarios al fin de la presente invención. Los ejemplos de dichos ingredientes activos incluyen, por ejemplo, vasodilatadores coronarios (por ejemplo, nitrito de amilo, nitrato de isosorbida, nitroglicerina, trapidil, etc.), β -bloqueantes (por ejemplo, oxprenolol, carteolol, bucumolol, bufetolol, propranolol, pindolol, etc.), antagonistas de calcio (por ejemplo, diltiazem, verapamilo, nifedipina, nicardipina, etc.), agentes para trastornos de la circulación periférica (por ejemplo, alprostadil, alfadex, kalidínogenasa, tocoferol, nicomol, etc.), agentes antiarrítmicos (por ejemplo, adimarina, procainamida, lidocaína, etc.),
 25 agentes hipotensivos (por ejemplo furosemida, triclórometiazida, hidralazina, agentes simpatolíticos, antagonistas de calcio, etc.), agentes antilipémicos (por ejemplo, clofibrato, pravastatina, simvastatina, lovastatina, nicomol, etc.), anticoagulantes (por ejemplo, heparina, warfarina, dicumarol, aspirina, etc.), agentes trombolíticos (por ejemplo, urocinasa, etc.), agentes antidiabéticos (por ejemplo, tolbutamida, clorpropamida, acetahexamida, glibenclamida, metformina, acarbose, etc.), agentes antiinflamatorios (por ejemplo, diclofenaco de sodio, ibuprofeno, indometacina, etc.),
 30 antibióticos (por ejemplo, cefixima, cefdinir, ofloxacina, tosfloracina, etc.), antimicóticos (por ejemplo, fluconazol, itraconazol, etc.) y similares.

También puede utilizarse una preparación que contiene esos ingredientes activos en combinación con una preparación de la presente invención. No hay limitación de esos ingredientes activos medicinales a condición de que pueda alcanzarse el fin de la presente invención, y es posible utilizar dichos ingredientes activos apropiadamente en una
 35 relación de mezclado o relación de combinación adecuada.

Los agentes para promover la inducción de la diferenciación vascular de la presente invención pueden administrarse por una vía de administración adecuada dependiendo de su forma de dosificación. Por ejemplo, las inyecciones pueden administrarse por vía intravenosa, intraarterial, subcutánea o intramuscular y similares. La dosis de inyección es habitualmente de 0,001 mg a 1.000 mg basándose en el HGF, preferiblemente de 0,01 mg a 100 mg, que se administra apropiadamente una vez al día o varias veces al día de manera dividida, aunque puede ajustarse apropiadamente dependiendo de la afección, edad, peso corporal de los pacientes, etc.

Los agentes para promover la inducción de la diferenciación vascular de la presente invención pueden utilizarse *in vitro* para promover la inducción de la diferenciación de células de médula ósea en células progenitoras endoteliales o células endoteliales. Como células de médula ósea, puede utilizarse cualquier célula de médula ósea de mamíferos, incluyendo seres humanos, aunque es preferible utilizar células de médula ósea flotantes. Por ejemplo, las células de médula ósea humana se recogen mediante un método conocido, se suspenden en un líquido de cultivo celular, se siembran en una placa Petri de plástico y se cultivan, recogiendo sólo las células flotantes del mismo. Posteriormente, se cultivan las células de médula ósea flotantes junto con un agente para promover la inducción de la diferenciación vascular de la presente invención. Como líquido de cultivo celular, puede utilizarse un líquido de cultivo convencional tal como DMEM, MEM, RPMI1640, IMDM, etc. Aunque pueden añadirse al líquido de cultivo celular anteriormente mencionado aditivos que se utilizan habitualmente en cultivo celular, tales como suero fetal bovino, es preferible
 55 utilizar un líquido de cultivo celular exento de suero con vistas a la inmunología de trasplante. La concentración de HGF en el agente para promover la inducción de la diferenciación vascular es de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml. Las condiciones de cultivo son las empleadas en el cultivo celular habitual, por ejemplo, aproximadamente a 35°C $\pm$ 2°C en presencia de 5% de dióxido de carbono y similares. Se cultivan las células de médula ósea como tales durante una a cinco semanas, dando como resultado una diferenciación en células progenitoras endoteliales o células endoteliales. Las células progenitoras endoteliales inducidas por la diferenciación o células endoteliales derivadas de las células de médula ósea obtenidas como anteriormente están disponibles en forma de células para trasplante de órganos.

Para ser más específicos, las células progenitoras endoteliales o células endoteliales diferenciadas y proliferadas a partir de células de médula ósea de un paciente con arteriosclerosis obliterante de los miembros inferiores pueden ser, por ejemplo, inyectadas por vía intramuscular para trasplantar para necrosar la parte ulcerosa del cuerpo del paciente causada por arteriosclerosis obliterante de los miembros inferiores. Según este procedimiento, es posible obtener una gran cantidad de células progenitoras endoteliales o células endoteliales necesarias para trasplante en pacientes con

arteriosclerosis obliterante de los miembros inferiores a partir de las células de médula ósea de dichos pacientes mismos.

Además, el trasplante puede incluir otra realización que comprende cultivar células de médula ósea, utilizar las células de médula ósea no diferenciadas proliferadas como células para trasplante, y administrar un agente para promover la inducción de la diferenciación vascular de la presente invención a un receptor. Según el presente procedimiento, puesto que se cultiva y prolifera una pequeña cantidad de las células de médula ósea recogidas de pacientes con arteriosclerosis obliterante de los miembros inferiores, y se devuelve una gran cantidad de células de médula ósea resultantes al paciente al mismo tiempo que se administra un agente para promover la diferenciación vascular según la presente invención, ocurre eficazmente en el cuerpo la inducción de la diferenciación de las células de médula ósea transplantadas en células progenitoras endoteliales o células endoteliales.

Con respecto a las células de médula ósea para utilizar para el trasplante anteriormente mencionado, son preferiblemente las recogidas de los mismos receptores para transplantar, con vistas a la inmunología de trasplante.

En los últimos años, se ha informado de terapias génicas que utilizan el gen de HGF (véanse *Circulation*, 1997, vol. 96, n° 3459; *Nature Medicine*, 1999, vol. 5, pág. 226-230; *Circulation*, 1999, vol. 100, n° 1672; *Gene Therapy*, 2000, vol. 7, pág. 417-427), y se han establecido tecnológicamente dichas terapias génicas. La presente invención incluye un agente de terapia génica que comprende la introducción del gen de HGF para la inducción de la diferenciación de células de médula ósea en células progenitoras endoteliales o células endoteliales, así como la administración de HGF como se menciona anteriormente. De aquí en adelante, se describirá con detalle la terapia génica con HGF.

Como se utiliza en la presente memoria, "gen de HGF" significa un gen capaz de expresar HGF. Para ser más específicos, se ejemplifica un gen en el que el ADNc de HGF está integrado en un vector de expresión adecuado (vector no vírico, vector vírico) como se describe en la referencia bibliográfica no de patente 2; la Patente Japonesa n° 2.777.678, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, vol. 163, pág. 967; o *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, vol. 172, pág. 321. Aquí, la secuencia de bases de ADNc que codifica HGF se describe en las referencias bibliográficas anteriores, y está también registrada en bases de datos tales como Genebank. Basándose en los datos de secuencia anteriores, es por lo tanto posible llevar a cabo, por ejemplo, una PCR-FI en ARNm del hígado, etc., mediante el uso de un segmento de ADN apropiado como cebador de PCR, mediante la que se realiza la clonación de ADNc de HGF. Dicha clonación podría hacerse fácilmente por los expertos en la técnica según libros de texto fundamentales tales como "Molecular Cloning", 2ª edición, publicado por Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

Además, el gen de HGF utilizado en la presente invención no está limitado a los genes anteriormente mencionados, y puede utilizarse cualquier gen de HGF como gen de HGF de la presente invención a condición de que exprese una proteína que tiene sustancialmente la misma actividad que la de HGF. Es decir, entre los ADN que pueden hibridar con el ADNc anteriormente mencionado en condiciones rigurosas y los ADN que codifican una proteína en la que uno a varios aminoácidos (preferiblemente varios aminoácidos) en la secuencia de aminoácidos codificada por el ADNc anteriormente mencionado están sustituidos, eliminados, añadidos y/o insertados, se incluye en el alcance del gen de HGF utilizado en la presente invención cualquier ADN que codifique una proteína que tenga una actividad de HGF. Dichos ADN pueden obtenerse fácilmente mediante un método de hibridación común, un método PCR y similares, específicamente por referencia a libros de texto fundamentales tales como "Molecular Cloning" mencionado anteriormente.

Los genes de HGF utilizados en la presente invención pueden aplicarse a la inducción de la diferenciación de células de médula ósea en células alveolares, de la misma manera que en la proteína HGF anteriormente mencionada.

Cuando se administra a un paciente un agente de terapia génica que comprende el gen de HGF como ingrediente activo, dicha administración puede realizarse de la manera convencional descrita, por ejemplo, en "Basic Technology of Gene Therapy", volumen separado de "Experimental Medicine" publicado por Yodosha, Japón, 1996; "Gene Introduction and Expression Analysis Method", volumen separado de "Experimental Medicine", publicado por Yodosha, Japón, 1997; "Gene Therapy Development Research Handbook", editado por la Japan Society of Gene Therapy, publicado por NTS, Japón, 1999.

La forma de dosificación puede incluir una variedad de formas conocidas adecuadas para cada forma de administración mencionada anteriormente. El contenido de ADN en la preparación puede controlarse apropiadamente, dependiendo de la enfermedad diana, edad y peso corporal de los pacientes, etc., y habitualmente el contenido de ADN según la presente invención es de 0,0001 a 100 mg, preferiblemente de 0,001 a 10 mg.

Además, el gen de HGF y HGF pueden utilizarse cada uno independientemente o en combinación.

La presente invención se ilustrará por los siguientes ejemplos, sin embargo no está limitada a ellos. El porcentaje (%) significa % en masa a menos que se indique otra cosa.

Ejemplo 1

Ratones receptores

5 Se establecieron ratones transgénicos de proteína fluorescente verde potenciada (GFP) en una cepa de fondo C57BL/6 en la Universidad de Osaka, Japón. Se transplantaron células hepáticas de hígados fetales recogidos de embriones GFP el día 13,5 a ratones macho C57BL/6, que se irradiaron utilizando dosis de 12 Gy antes del transplante, según el método de Morishita *et al.* como se describe en *Hypertension*, 1999, vol. 33, pág. 1379-1384. Sirvieron como ratones receptores en el experimento ratones en los que más de un 95% de los leucocitos en circulación (leucocitos periféricos) se reemplazaron completamente por células de médula ósea procedentes de ratón GFP tres semanas después del transplante.

Inducción de lesión capilar pulmonar y tratamiento

15 Se instiló por vía intranasal elastasa pancreática porcina (200 unidades/kg, Sigma St. Louis, MO) a ratones receptores. Tres semanas después de la instilación de elastasa, los ratones receptores exhibieron cambios enfisematosos en los pulmones, y se observaron capilares pulmonares lesionados. En este punto, los ratones receptores con enfisema pulmonar inducido se dividieron aleatoriamente en dos grupos, concretamente, grupo de administración de vehículo y grupo de administración de HGF, que se inyectaron por vía intraperitoneal con una dieta equilibrada y con HGF, respectivamente, a una dosis de 1 mg/kg al día durante 12 días.

Anatomía histológica

25 Se fijaron los pulmones de los ratones receptores con 4% de paraformaldehído-PBS (disolución salina tamponada con fosfato) a una presión de 2 kPa, se prepararon secciones embebidas en parafina según el método convencional y se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE). Se detectó la GFP utilizando el anticuerpo anti-GFP (Abcam, Cambridge, R.U.) y se visualizó con 3,3'-diaminobenzidina.

30 Con el fin de identificar el fenotipo de células positivas de GFP, se realizó la tinción por inmunofluorescencia de las secciones congeladas utilizando anticuerpos anti-CD34 y anti-CD45 (Pharmingen, San Diego, CA).

35 Se aislaron células de sangre periférica Sca-1⁺ (antígeno de superficie derivado de células de médula ósea) recogidas de cada ratón utilizando el sistema de clasificación celular magnético con microperlas recubiertas con anti-Sca-1 (Miltenvi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Se midió la distribución celular de las células progenitoras endoteliales o células endoteliales en sangre periférica Sca-1⁺ aislada mediante citometría de flujo utilizando un FACSCalibur (aparato de análisis y clasificación celular automatizados, BD, San José, CA), en la que se utilizó como índice la expresión de Sca-1 y Flk-1, que es uno de los receptores de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Se detectó Sca-1 utilizando anticuerpo anti-Sca-1 marcado con isotiocianato de fluoresceína, y se detectó Flk-1 utilizando anticuerpo anti-Flk-1 marcado con ficoeritrina (pigmento fluorescente rojo) (Pharmingen).

Resultados

45 Se muestra en la Fig. 1 la distribución de las células positivas de Flk-1 en ratones receptores cuyos capilares pulmonares están lesionados. La distribución celular total en el grupo de administración de HGF [HGF(+); línea gris] estaba desplazada a la derecha comparado con la del grupo control [HGF(-)]. Este resultado indica que las células positivas de Flk-1, concretamente, células progenitoras endoteliales o células endoteliales, han aumentado en el grupo de administración de HGF.

50 En las observaciones de secciones de tejido pulmonar de los ratones receptores, se destruyeron los capilares pulmonares en los ratones receptores que habían recibido elastasa, mientras que en el grupo de administración de HGF se observaron los capilares pulmonares a casi la misma extensión en el pulmón de los ratones receptores que el grupo control que no recibió elastasa (véase la Fig. 2). Los resultados de la observación histológica de los ratones receptores mediante tinción por inmunofluorescencia mostraron que las células endoteliales capilares pulmonares en el grupo de administración de HGF se diferenciaron de las células de médula ósea derivadas de ratones GFP (véase la Fig. 3).

55 Este resultado indicaba que las células progenitoras endoteliales o células endoteliales en las que se indujo la diferenciación a partir de células de médula ósea se diferenciaron adicionalmente para regenerar nuevamente capilares pulmonares.

Ejemplo 2

Métodos

65 Se obtuvo un total de 0,5-1,0 ml de sangre periférica a partir de cada ratón. Se separaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Lymphosepal; IBL, Gunma, Japón). Se agotaron los eritrocitos con tampón de lisis RBC (NH₄Cl 0,15 M, KHCO₃ 0,01 M, EDTA-2Na 0,1 mM, pH 7,2). Se tiñeron células Sca-1⁺/Flk-1⁺/c-kit⁺, consistentes con EPC periféricos, con anticuerpo anti-Sca-1 de múrido marcado con FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA), anticuerpo anti-cinasa hepática 1/receptor 2 de factor de crecimiento en-

dotelial vascular fetal (Flk-1/VEGF-R2) de múrido marcado con PE (BD Pharmingen) y anticuerpo anti-c-kit marcado con APC (BD Pharmingen), y se analizaron mediante un FACSCalibur (BD, San José, CA).

Resultados

El número de PBMC, que contienen una población de EPC, aumentó mediante el tratamiento con HGF en comparación con ratones tratados con disolución salina. El número de células Sca-1⁺/Flk-1⁺/c-kit⁺ en circulación aumentó en ratones tratados con HGF (tabla 1). Estos resultados sugerían que el HGF indujo un aumento del número de células Sca-1⁺/Flk-1⁺/c-kit⁺ periféricas en circulación, consistentes con el fenotipo de EPC, a partir de médula ósea, y que el parénquima pulmonar podría recibir por lo tanto más células progenitoras a partir de la médula ósea.

TABLA 1

Número de PBMC y células Sca-1⁺/Flk-1⁺/c-kit⁺ en ratones tratados con disolución salina y HGF

Tratamiento	PBMC	Células Sca-1 ⁺ /Flk-1 ⁺ /c-kit ⁺
Disolución salina	21,7 ± 1,7	1,1 ± 0,1
HGF	63,3 ± 8,8*	7,6 ± 1,1*

Los valores representan media ± EEM x 10⁵ células/ml.

*Significativamente diferente de ratones tratados con disolución salina (p < 0,05).

Aplicabilidad industrial

El agente para promover la inducción de la diferenciación vascular de la presente invención es útil como agente medicinal para promover la inducción de la diferenciación de células de médula ósea en células progenitoras endoteliales o células endoteliales. Puesto que la angiogénesis o regeneración vascular tiene lugar utilizando dichas células progenitoras endoteliales o células endoteliales, el agente para promover la inducción de la diferenciación vascular según la presente invención puede utilizarse en el campo de la medicina regenerativa.

REIVINDICACIONES

1. Uso de factor de crecimiento de hepatocitos para la preparación de un medicamento para promover la inducción
de la diferenciación de células de médula ósea en células progenitoras endoteliales o células endoteliales.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

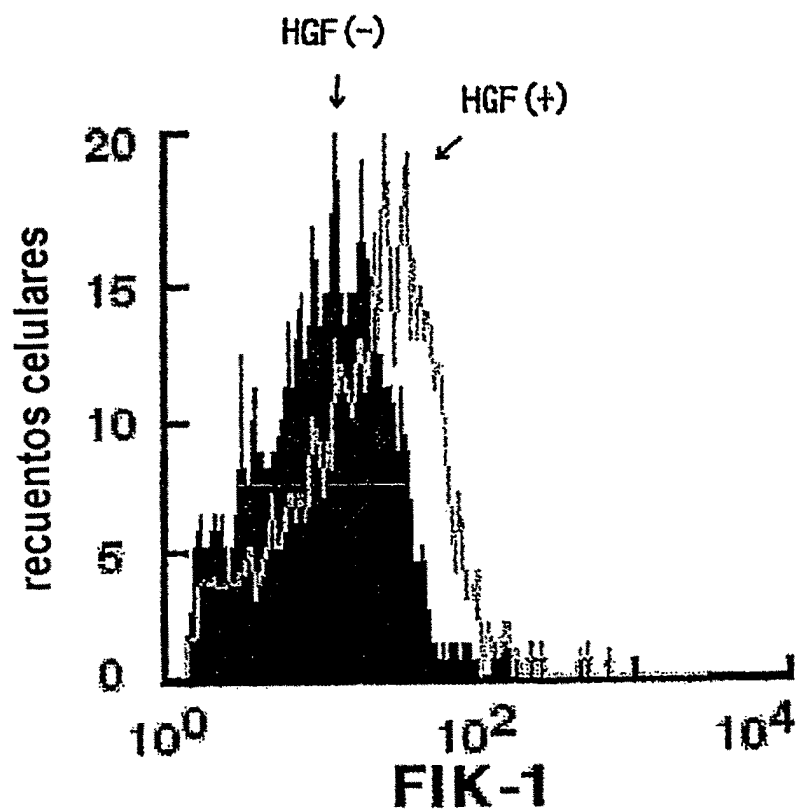


Fig. 2

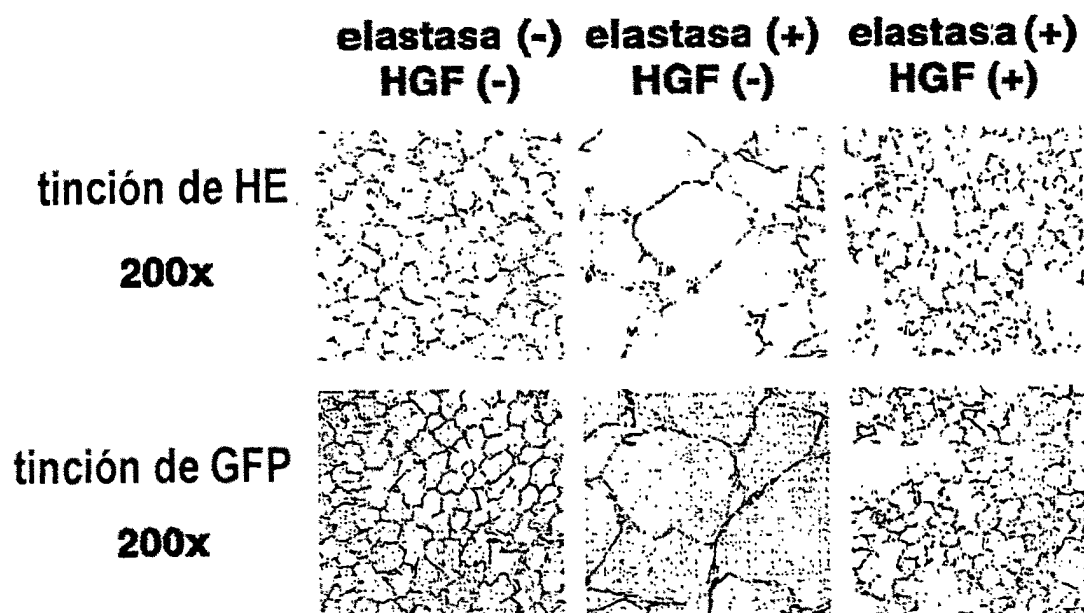


Fig. 3

