

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 986 021**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/17	(2006.01)	A61P 27/02	(2006.01)
C12N 15/86	(2006.01)	A61P 29/00	(2006.01)
A61K 38/18	(2006.01)	A61P 31/00	(2006.01)
A61K 31/7088	(2006.01)	A61P 35/00	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)	A61P 43/00	(2006.01)
A61P 9/00	(2006.01)	A61P 17/02	(2006.01)
A61P 9/04	(2006.01)		
A61P 9/10	(2006.01)		
A61P 17/06	(2006.01)		
A61P 19/02	(2006.01)		

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.01.2014 PCT/EP2014/050788**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2014 WO14111458**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2014 E 14700872 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2024 EP 2945642**

(54) Título: **Proteína factor 1 para la utilización en el tratamiento o prevención de enfermedades**

(30) Prioridad:

17.01.2013 EP 13151593

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.11.2024

(73) Titular/es:

**MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER
(100.0%)
Carl-Neuberg-Strasse 1
30625 Hannover, DE**

(72) Inventor/es:

**WOLLERT, KAI CHRISTOPH y
KORF-KLINGEBIEL, MORTIMER**

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 986 021 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

Proteína factor 1 para la utilización en el tratamiento o prevención de enfermedades

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a proteínas que comprenden secuencias de aminoácidos codificadas por ácidos nucleicos derivados de la región cromosómica humana C19Orf10 denominadas Factor 1, para el uso como un medicamento.

10 Antecedentes de la invención

El infarto agudo de miocardio (IAM) es una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Solo en Alemania la incidencia es de aproximadamente 280.000 casos al año. El tratamiento de un paciente que presenta un IAM comprende la abertura de la arteria coronaria obstruida mediante tratamiento de reperfusión en combinación con la administración de inhibidores de la agregación de trombocitos e inhibidores de coagulación para evitar el restrechamiento del vaso. Además, puede reducirse el pulso y la presión arterial mediante la administración de betabloqueantes e inhibidores del enzima conversor de la angiotensina (ECA). También es habitual el uso de estatinas para reducir el nivel de colesterol. El enfoque médico para la reparación directa del músculo cardíaco actualmente está limitada al uso experimental de células de médula ósea del propio organismo. Existe una gran necesidad de fármacos con un efecto similar sin utilización de células de médula ósea.

La necrosis tisular experimentada durante un IAM induce una respuesta de cicatrización de la lesión que conduce a la sustitución de la zona necrótica por tejido de granulación y finalmente una cicatriz rica en colágeno. Los monocitos son atraídos desde la médula ósea al miocardio infartado y desempeñan funciones importantes durante la cicatrización de la lesión tras un IAM. La respuesta de monocitos en el miocardio es bifásica en el tiempo. Los monocitos proinflamatorios aparecen inicialmente y promueven la digestión del tejido infartado y la eliminación de los residuos necróticos, mientras que los monocitos reparadores son dominantes posteriormente y propagan la angiogénesis y la reparación. La expresión en la superficie celular del receptor de quimoquina CXCR4 identifica un subgrupo de monocitos reparativos en ratones y seres humanos. Los efectos proangiogénicos y procicatrización de las células mieloídes CXCR4⁺ se cree que están mediados a través de proteínas secretadas que actúan de una manera paracrina, aunque en gran medida se desconoce la identidad de estos factores. Por lo tanto, los inventores han llevado a cabo un análisis bioinformático del secretoma en células de médula ósea CXCR4⁺ humanas con el fin de identificar nuevas proteínas secretadas que controlan la cicatrización en el infarto y que muestra potencial terapéutico después del IAM.

35 Estos estudios han identificado dos polipéptidos diferentes que muestran efectos proangiogénicos y/o citoprotectores que han sido denominados proteínas Factor 1 y Factor 2 por los inventores.

Ambos factores han sido descritos en varias publicaciones científicas en referencia a un contexto biológico que no comprende los efectos proangiogénicos y/o citoprotectores de estos factores en células no transformadas o en tejidos no transformados. Ninguno de los estudios da a conocer pruebas o ni siquiera un indicio de la función de dichos factores, o una correlación significativa de uno de los factores con una enfermedad o afección asociada exclusivamente a células no transformadas o tejido no transformado.

45 La secuencia de aminoácidos del Factor 1 humano está codificada en el marco de lectura abierto 10 en el cromosoma humano 18 (C19Orf10). La proteína fue descrita en 2007 en un análisis del proteoma de los denominados sinoviocitos similares a fibroblastos (células FLS, por sus siglas en inglés) como nuevo factor secretado en el sinovio. Se ha supuesto que existe una correlación entre la secreción de la proteína y las enfermedades inflamatorias articulares sin ninguna prueba experimental o evidencia estadística (Weiler et al., Arthritis Research and Therapy 2007, The identification and characterization of a novel protein, c19orf10, in the synovium). Una solicitud de patente correspondiente reivindica la proteína como agente terapéutico para el tratamiento articular y para el diagnóstico de un tejido que experimenta un crecimiento alterado, así como la monitorización de los cambios en un tejido (documento n.º US 2008/0004232 A1, Characterization of c19orf10, a novel synovial protein). Otra publicación científica describe la expresión incrementada de la proteína en células de carcinoma hepatocelular (Sunagozaka et al., International Journal of Cancer, 2010, Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma). La proteína producida recombinantemente ha mostrado un efecto de incremento de la proliferación en células de carcinoma hepatocelular en cultivo. Se indica que C19Orf10 también se ha denominado IL-25, IL-27 e IL-27W, ya que originalmente se consideró que era una interleuquina. Sin embargo, los términos «IL-25» e «IL-27» se han utilizado inconsistentemente en la técnica y se ha utilizado para designar una diversidad de diferentes proteínas. Por ejemplo, el documento n.º US 2004/0185049 se refiere a una proteína como IL-27 y da a conocer su utilización en la modulación de la respuesta inmunitaria. Esta proteína es estructuralmente diferente del Factor 1 (compárese la secuencia de aminoácidos del Factor 1 según la SEC ID n.º 1 con la secuencia de aminoácidos de «IL-27» según UniProt: Q8NEV9). Análogamente, el documento n.º EP 2 130 547 A1 se refiere a una proteína como IL-25 y da a conocer su uso en el tratamiento de la inflamación. Esta proteína también se ha denominado en la técnica «IL-17E» y es estructuralmente diferente del Factor 1 (compárese la secuencia de aminoácidos del Factor 1 según la SEC ID n.º 1 con la secuencia de aminoácidos de «IL-25» según UniProt: Q9H293).

La secuencia de aminoácidos del Factor 2 humano está codificada en el marco de lectura abierto 63 en el cromosoma humano 18 (C19Orf63). La proteína fue descrita en 2009 como nuevo factor de secreción INM02 (Wang et al., Journal of Endocrinology 2009, Molecular cloning of a novel secreted peptide, INM02, and regulation of its expression by glucose). Se mostró la presencia de la proteína en suero humano utilizando anticuerpo policlonales. Además, se ha mostrado una correlación entre la expresión de la proteína en MIN6 en cultivo (células beta), así como islotes pancreáticos de rata aislados, y la concentración de glucosa en el medio. El análisis de la correlación entre la diabetes y la expresión de INM2 no ha proporcionado resultados significativos. Una solicitud de patente correspondiente reivindica la producción de anticuerpos policlonales contra la proteína y la utilización para el tratamiento de la diabetes mellitus (documento n.º CN 200910055490, Novel polyclonal antibody of secretive peptide INM02 and preparation method thereof).

Otra publicación científica ha descrito la proteína como el nuevo factor de secreción hHSS1 (por sus siglas en inglés, factor secretado 1 humano que contiene péptido de señal hematopoyética) (Junes-Gill et al., J Neurooncol, 2011, hHSS1: a novel secreted factor and suppressor of glioma growth located at chromosome 19q13.33). Los datos publicados muestran la expresión de hHSS1 en células madre del sistema hematopoyético y sugieren una función como supresor tumoral en la génesis de determinados tumores cerebrales (gliomas). Una solicitud de patente correspondiente reivindica la utilización de hHSS1 en el tratamiento de tumores cerebrales (documento n.º WO2011/094446 A1, A method for treating brain cancer using a novel tumor suppressor gene and secreted factor).

El documento n.º US 2004/185049 A1 se refiere a métodos para modular la respuesta inmunitaria en un animal mediante la administración de un agente que interactúa con el receptor de WSX-1 sobre las células T CD-4⁺ y CD-8⁺. Dicha solicitud de patente no se refiere a la proteína de SEC ID n.º 1 o n.º 2 tal como se da a conocer en la presente memoria.

El documento n.º EP 2 130 547 A1 se refiere al tratamiento de enfermedades asociadas a la respuesta de citoquinas inflamatorias que resulta de células CD-14⁺ y muestra que los monocitos responden a IL-25 mediante la regulación negativa de la expresión de citoquinas inflamatorias inducida por diversos estímulos inflamatorios. Dicha solicitud de patente no se refiere a la proteína de SEC ID n.º 1 o n.º 2 tal como se da a conocer en la presente memoria.

El documento n.º WO 02/081681 A1 no da a conocer ningún dato biológico sobre las indicaciones a las que se hace referencia y se ha mostrado posteriormente que la presunta capacidad de potenciar la proliferación de células linfoides no era reproducible.

El documento n.º KR 2012/0095063 se refiere a una composición que comprende p53 e IL-27 para la utilización en la prevención o tratamiento de enfermedades inmunitarias. La proteína IL-27 utilizada no presenta ninguna similitud con la presente SEC ID n.º 1.

El documento n.º US 2004/214229 da a conocer un péptido identificado después de inducir una sepsis artificial en babuinos, pero no da a conocer ningún dato experimental sobre ninguna aplicación médica de dicho péptido.

El documento n.º WO 98/11217 A1 da a conocer proteínas que presentan secuencias de señal secretoria, que supuestamente pueden utilizarse para un vasto número de aplicaciones. Sin embargo, dicha publicación no se correlaciona con el polipéptido de la presente SEC ID n.º 1, ya que da a conocer una señal putativa que es un análogo de KDEL para dicha proteína.

Descripción resumida de la invención

La invención se expone en el juego de reivindicaciones adjunto. En particular, la presente invención proporciona en un primer aspecto una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos según la SEC ID n.º 1, o un fragmento o una variante de la misma, para la utilización como un medicamento. Dicho fragmento o variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a SEC ID n.º 1 a lo largo de toda la longitud de SEC ID n.º 1, y el fragmento o variante muestra potencial antiapoptótico y protege las células o tejidos de la muerte celular apoptótica, en donde el potencial antiapoptótico es por lo menos 50 % del potencial apoptótico de la proteína con la secuencia de aminoácidos según la SEC ID n.º 1.

En un segundo aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos codificantes de las proteínas según el primer aspecto para la utilización como un medicamento.

En un tercer aspecto, la invención proporciona vectores que comprenden el ácido nucleico del segundo aspecto para la utilización como un medicamento.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas: para la utilización como un medicamento, en donde dicha composición comprende la proteína para la utilización tal como se define en la presente memoria, el ácido nucleico para la utilización tal como se define en la presente memoria o el vector para la utilización tal como se define en la presente memoria, y opcionalmente un excipiente farmacéutico adecuado.

Se dan a conocer aspectos y realizaciones adicionales en el juego de reivindicaciones adjunto.

Breve descripción de los dibujos

- Figura 1: se cultivaron células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAEC, por sus siglas en inglés) y células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC, por sus siglas en inglés) durante 24 horas en medio mínimo en ausencia (control) o presencia de FCS al 10 %, VEGF-A recombinante humano (R&D Systems) o diferentes concentraciones de Factor 1 humano recombinante (secuencia de aminoácidos según la SEC ID n.º 2) o Factor 2 (secuencia de aminoácidos según la SEC ID n.º 4), tal como se indica. (A) Se midió la proliferación de HCAEC mediante incorporación de bromodesoxiuridina. (B) Se evaluó la migración de HCAEC tras lesionar una monocapa confluente de células endoteliales con una punta de pipeta. (C) Se evaluó la formación de una red de HUVEC en células cultivadas sobre Matrigel reducido en factores de crecimiento. N=3-5 experimentos independientes por condición; *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs. control.
- Figura 2: se aislaron cardiomiositos ventriculares a partir de ratas Sprague-Dawley de 1 a 3 días de edad mediante centrifugación en gradiente de densidad de Percoll. Se expusieron los cardiomiositos a isquemia simulada durante 180 min (medio sin glucosa que contenía 2-desoxiglucosa en atmósfera de 5 % de CO₂/95 % de N₂) seguido de reperfusión simulada durante 60 min (nuevamente en medio que contenía glucosa en aire en 5 % de CO₂/95 % aire ambiente) en ausencia (control) o en presencia de GDF-15 humano recombinante o diferentes concentraciones de Factor 1 de ratón recombinante (secuencia de aminoácidos según la SEC ID n.º 13), tal como se indica. Se evaluó la muerte celular mediante marcaje *in situ* de extremos con dUTP mediado por TdT (TUNEL, por sus siglas en inglés). N=3 experimentos independientes por condición; *P<0,05 vs. control.
- Figura 3: se clonaron ADNc de Factor 1 o Factor 2 de ratón (ácidos nucleicos según las SEC ID n.º 7 y n.º 10) en adenovirus deficientes para la replicación. Como control se utilizó un adenovirus deficiente en replicación codificante de galactosidasa (lacZ). Se anestesiaron ratones C57BL/6 macho de 10 a 12 semanas de edad y se ventilaron con isoflurano y sometieron a ligación permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (DAI). Se inyectaron virus en la cavidad ventricular izquierda (VI) inmediatamente después de la ligación DAI. (A) Se evaluó la función sistólica ventricular izquierda (cambio de superficie fraccional, FAC, por sus siglas en inglés) mediante ecocardiografía transtorácica 28 días después de la ligación DAI. (B) Se cuantificó la densidad capilar positiva para isolectina en la zona marginal del infarto mediante microscopía fluorescente 28 días después de la ligación DAI. *P<0,05, **P<0,01 vs. control Ad. lacZ
- Figura 4: se anestesiaron ratones C57BL/6 macho de 10 a 12 semanas de edad y se ventilaron con isoflurano y sometieron a ligación transitoria de la arteria coronaria descendente anterior durante 1 hora seguido de reperfusión durante 28 días. Los ratones recibieron una única inyección s.c. de Factor 1 de ratón recombinante (secuencias de aminoácidos según la SEC ID n.º 13) o Factor 2 (secuencia de aminoácidos según la SEC ID n.º 24) en el momento de la reperfusión. A lo anterior siguió una infusión s.c. continua durante 7 días de Factor 1 o Factor 2 recombinante. Los ratones de control recibieron una infusión de PBS. (A) Se evaluó la función sistólica ventricular izquierda (cambio de superficie fraccional, FAC) mediante ecocardiografía transtorácica 28 días después de la reperfusión. (B) Se cuantificó la densidad capilar positiva para isolectina en la zona marginal del infarto mediante microscopía fluorescente 28 días después de la reperfusión. *P<0,05, **P<0,01 vs. control de PBS.
- Figura 5: se anestesiaron ratones C57BL/6 macho de 10 a 12 semanas de edad y se ventilaron con isoflurano (al 1-2 %) y sometieron a ligación transitoria de la arteria coronaria descendente anterior izquierda durante 1 hora, seguido de reperfusión durante 28 días. Los ratones recibieron una única inyección s.c. de Factor 1 o Factor 2 recombinante de ratón (SEC ID n.º 13 y n.º 24, respectivamente) en el momento de la reperfusión (se inyectó PBS en los ratones de control). A lo anterior siguió una infusión s.c. continua durante 7 días de Factor 1 o Factor 2 recombinante. Los ratones de control recibieron una infusión de PBS. Se realizó una inspección diaria de los ratones durante 28 días para evaluar la supervivencia postinfarto.
- Figura 6: los homólogos de secuencia de la proteína codificada por C19Orf10 humana se buscaron con el algoritmo BLASTP. A partir de las secuencias identificadas, se seleccionaron ejemplos de diferentes especies de vertebrado, principalmente de mamífero, aunque también un ejemplo de anfibio, ave y pez. Las secuencias de aminoácidos seleccionadas se alinearon utilizando el algoritmo CLUSTALW2. Las identidades entre todas las especies alineadas están marcadas con «*»; las posiciones de aminoácido más altamente conservadas, es decir, que solo muestran sustituciones conservadoras, están marcadas con «:»; las posiciones de aminoácido altamente conservadas están marcadas con «.».
- Figura 7: los homólogos de secuencia de la proteína codificada por C19Orf10 humana se buscaron con el algoritmo BLASTP. A partir de las secuencias identificadas, se seleccionaron ejemplos de diferentes especies de vertebrado, principalmente de mamífero, aunque también un ejemplo de anfibio, ave y pez. Las secuencias de aminoácidos de mamífero seleccionadas se alinearon utilizando el algoritmo CLUSTALW2. Las identidades entre todas las especies alineadas están marcadas con «*»; las posiciones de aminoácido más altamente conservadas, es decir, que solo muestran sustituciones conservadoras, están marcadas con «:»; las posiciones de aminoácido altamente conservadas están marcadas con «.».
- Figura 8: los homólogos de secuencia de la proteína codificada por la variante de procesamiento HSS1 de C19Orf63 humana se buscaron con el algoritmo BLASTP. A partir de las secuencias identificadas, se seleccionaron ejemplos de diferentes especies de vertebrado, principalmente de mamífero, aunque también una secuencia de anfibio y de pez. Las secuencias de aminoácidos seleccionadas se alinearon utilizando el algoritmo CLUSTALW2. Las identidades entre todas las especies alineadas están marcadas con «*»; las posiciones de aminoácido más

altamente conservadas, es decir, que solo muestras sustituciones conservadoras, están marcadas con «::»; las posiciones de aminoácido altamente conservadas están marcadas con «..».

Figura 9: los homólogos de secuencia de la proteína codificada por la variante de procesamiento HSS1 de C19Orf63 humana se buscaron con el algoritmo BLASTP. A partir de las secuencias identificadas, se seleccionaron ejemplos de diferentes especies de vertebrado, principalmente de mamífero, aunque también una secuencia de anfibio y de pez. Las secuencias de aminoácidos de mamífero seleccionadas se alinearon utilizando el algoritmo CLUSTALW2. Las identidades entre todas las especies alineadas están marcadas con «*»; las posiciones de aminoácido más altamente conservadas, es decir, que solo muestras sustituciones conservadoras, están marcadas con «::»; las posiciones de aminoácido altamente conservadas están marcadas con «..».

Figura 10: los homólogos de secuencia de la proteína codificada por la variante de procesamiento HSS1 de C19Orf63 humana se buscaron con el algoritmo BLASTP. A partir de las secuencias identificadas, se seleccionaron ejemplos de diferentes especies de vertebrado, principalmente de mamífero, aunque también una secuencia de anfibio y de pez. Las secuencias de aminoácidos seleccionadas se alinearon utilizando el algoritmo CLUSTALW2. Las identidades entre todas las especies alineadas están marcadas con «*»; las posiciones de aminoácido más altamente conservadas, es decir, que solo muestras sustituciones conservadoras, están marcadas con «::»; las posiciones de aminoácido altamente conservadas están marcadas con «..».

Figura 11: los homólogos de secuencia de la proteína codificada por la variante de procesamiento HSS1 de C19Orf63 humana se buscaron con el algoritmo BLASTP. A partir de las secuencias identificadas, se seleccionaron ejemplos de diferentes especies de vertebrado, principalmente de mamífero, aunque también una secuencia de anfibio y de pez. Las secuencias de aminoácidos de mamífero seleccionadas se alinearon utilizando el algoritmo CLUSTALW2. Las identidades entre todas las especies alineadas están marcadas con «*»; las posiciones de aminoácido más altamente conservadas, es decir, que solo muestras sustituciones conservadoras, están marcadas con «::»; las posiciones de aminoácido altamente conservadas están marcadas con «..».

Figura 12: muestra el efecto de los anticuerpos específicos de Factor 1 y de Factor 2 sobre la proliferación de las HCAEC estimuladas con Factor 1 recombinante (panel A) y Factor 2 recombinante (panel B). Los datos son de medias ± SEM de 3 a 6 experimentos. Panel A: #P<0,05, ##P<0,01 vs. control no estimulado (columna de la izquierda) *P<0,05, **P<0,01 vs. Factor 1 sin anticuerpo; Panel B: ###P<0,01 vs. control no estimulado (columna más a la izquierda) *P<0,05, **P<0,01 vs. Factor 2 sin anticuerpo.

30 Descripción detallada de la invención

Antes de describir en detalle la presente invención a continuación, debe entenderse que la presente invención no se encuentra limitada a la metodología, protocolos y reactivos particulares indicados en la presente memoria, ya que pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente memoria presenta el propósito de describir realizaciones particulares únicamente, y que no pretender ser limitativa del alcance de la presente invención, que se encuentra limitada exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto ordinario en la materia.

40 Definiciones

Preferentemente, los términos utilizados en la presente memoria se definen tal como se describen en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel y H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Suiza (1995).

Para la puesta en práctica de la presente invención, a menos que se indique lo contrario, se utilizan métodos convencionales de química, bioquímica y biología celular, y técnicas de ADN recombinante, los cuales se explican en la literatura del campo (ver, p. ej., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a edición, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989). Además, se utilizan métodos convencionales de cardiología clínica que también se explican en la literatura del campo (ver, p. ej., Braunwald's Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine, 9a edición, P. Libby et al. eds., Saunders Elsevier Philadelphia, 2011).

A lo largo de toda la presente especificación y en las reivindicaciones siguientes, a menos que el contexto indique lo contrario, el término "comprende" y variaciones tales como "comprendiendo", se entenderá que implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas indicado y no la exclusión de cualquier otro número entero, etapa o grupo de números enteros o etapas. Tal como se utiliza en la presente especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" o "la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Se entiende que las moléculas de ácidos nucleicos son macromoléculas poliméricas constituidas de monómeros nucleótidos. Los monómeros de nucleótido están compuestos de una nucleobase, un azúcar de cinco carbonos (tal como, aunque sin limitación, ribosa o 2'-desoxirribosa), y uno a tres grupos fosfato. Habitualmente, se forma un polinucleótido mediante enlaces fosfodiéster entre los monómeros nucleótido individuales. En el contexto de la presente invención, las moléculas de ácidos nucleicos a las que se hace referencia incluyen, aunque sin limitación, ácido ribonucleótico (ARN) y ácido desoxirribonucleico (ADN). Los términos «polinucleótido» y «ácido nucleico» se utilizan intercambiablemente en la presente memoria.

- La expresión «marco de lectura abierto» (ORF, por sus siglas en inglés), se refiere a una secuencia de nucleótidos que puede traducirse en aminoácidos. Habitualmente, dicho ORF contiene un codón de inicio, una región siguiente que habitualmente presenta un tramo que es un múltiplo de 3 nucleótidos, aunque no contiene un codón de parada (TAG, TAA, TGA, UAG, UAA o UGA) en el marco de lectura proporcionado. Habitualmente, las ORF ocurren naturalmente o se construyen artificialmente, es decir, por medios tecnológicos de manipulación génica. Un ORF codifica una proteína en la que los aminoácidos en que puede traducirse forman una cadena de péptidos unidos.
- Los términos «proteína» y «polipéptido» se utilizan intercambiablemente en la presente memoria y se refieren a cualquier cadena unida mediante enlaces peptídicos de aminoácidos, con independencia de la longitud o las modificaciones post-traduccionales. Las proteínas utilizables en la presente invención (incluyendo derivados de proteínas, variantes de proteína, fragmentos de proteína, segmentos de proteína, epítopos de proteína y dominios de proteína) pueden modificarse adicionalmente mediante modificación química. Lo anterior significa que dicho polipéptido modificado químicamente comprende otros grupos químicos aparte de los 20 aminoácidos naturales. Entre los ejemplos de dichos otros grupos químicos se incluyen, aunque sin limitación, aminoácidos glucosilados y aminoácidos fosforilados. Las modificaciones químicas de un polipéptido pueden proporcionar propiedades ventajosas en comparación con el polipéptido parental, p. ej., uno o más de estabilidad mejorada, semivida biológica incrementada o solubilidad en agua incrementada. Entre las modificaciones químicas aplicables a las variantes utilizables en la presente invención se incluyen, aunque sin limitación: PEGilación, glucosilación de polipéptidos parentales no glucosilados, acoplamiento covalente con moléculas pequeñas terapéuticas, como agonistas de péptido de tipo glucagón 1, incluyendo exenatida, albiglutida, taspoglutida, inhibidores de DPP4, incretina y liraglutida, o la modificación del patrón de glucosilación presente en el polipéptido parental. Dichas modificaciones químicas aplicables a las variantes utilizables en la presente invención pueden ocurrir co- o post-traduccionamente.
- El término «aminoácido» comprende aminoácidos naturales, así como derivados de aminoácidos. Un aminoácido no aromático hidrofóbico en el contexto de la presente invención es preferentemente cualquier aminoácido que presente un índice de hidropatía de Kyte-Doolittle superior a 0,5, más preferentemente superior a 1,0, todavía más preferentemente superior a 1,5 y que no es aromático. Preferentemente, un aminoácido no aromático hidrofóbico en el contexto de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en los aminoácidos alanina (índice de hidropatía de Kyte-Doolittle de 1,8), metionina (índice de hidropatía de Kyte-Doolittle de 1,9), isoleucina (índice de hidropatía de Kyte-Doolittle de 4,5), leucina (índice de hidropatía de Kyte-Doolittle de 3,8) y valina (índice de hidropatía de Kyte-Doolittle de 4,2) o derivados de los mismos que presenta un índice de hidropatía de Kyte-Doolittle tal como se ha definido anteriormente.
- El término «post-traduccion» utilizado en la presente memoria se refiere a sucesos que ocurren después de la traducción de un triplete de nucleótidos en aminoácido y la formación de un enlace peptídico con el aminoácido precedente en la secuencia. Dichos sucesos posteriores a la traducción pueden ocurrir después de que se haya formado todo el polipéptido o ya durante el proceso de traducción en aquellas partes del polipéptido que ya se han traducido. Los sucesos post-traduccionales normalmente alteran o modifican las propiedades químicas o estructurales del polipéptido resultante. Entre los ejemplos de sucesos post-traduccionales se incluyen, aunque sin limitación, sucesos tales como la glucosilación o la fosforilación de aminoácidos, o el corte de la cadena peptídica, p. ej., por una endopeptidasa.
- El término «cotraduccion» utilizado en la presente memoria se refiere a sucesos que ocurren durante el proceso de traducción de un triplete de nucleótidos en una cadena de aminoácidos. Dichos sucesos normalmente alteran o modifican las propiedades químicas o estructurales de la cadena de aminoácidos resultante. Entre los ejemplos de sucesos cotraduccionales se incluyen, aunque sin limitación, sucesos que pueden detener el proceso de traducción por completo, o interrumpir la formación de enlace peptídico, resultando en dos productos de traducción discretos.
- El término «variante» se utiliza en la presente memoria para referirse a un polipéptido que difiere en la comparación con el polipéptido o fragmento del mismo del que se ha derivado, por uno o más cambios en la secuencia de aminoácidos. El polipéptido del que se deriva una variante de proteína también se conoce como polipéptido parental. De manera similar, el fragmento del que se deriva una variante de fragmento de proteína se conoce como fragmento parental. Normalmente, se construye una variante artificialmente, preferentemente por medios tecnológicos de manipulación génica. Normalmente, el polipéptido parental es una proteína de tipo salvaje o un dominio proteico de tipo salvaje. Además, las variantes utilizables en la presente invención también pueden derivarse de homólogos, ortólogos o parálogos del polipéptido parental o de una variante construida artificialmente, con la condición de que la variante muestre por lo menos una actividad biológica del polipéptido parental. Los cambios en la secuencia de aminoácidos pueden ser intercambios, inserciones, delecciones, truncados N-terminales o truncados C-terminales de aminoácidos, o cualquier combinación de dichos cambios, puede ocurrir en uno o en varios sitios. Una variante utilizable en la presente invención muestra un número total de hasta 100 (hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100,) cambios en la secuencia de aminoácidos (es decir, intercambios, inserciones, delecciones, truncados N-terminales y/o truncados C-terminales). Los intercambios de aminoácidos pueden ser conservadores, y/o semiconservadores y/o no conservadores. Una variante utilizable en la presente invención puede diferir de la proteína o dominio del que se ha derivado en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,

11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 intercambios de aminoácidos, preferentemente cambios de aminoácido conservadores.

§ Las sustituciones habituales son entre aminoácidos alifáticos, entre aminoácidos que presentan cadenas laterales hidroxilo alifáticas, entre los aminoácidos que presentan residuos ácidos, entre los derivados de amida, entre los aminoácidos con residuos básicos, o entre los aminoácidos que presentan residuos aromáticos. Las sustituciones semiconservadoras y conservadoras habituales son:

Aminoácido	Sustitución conservadora	Semiconservadora
A	G; S; T	N; V; C
C	A; V; L	M; I; F; G
D	E; N; Q	A; S; T; K; R; H
E	D; Q; N	A; S; T; K; R; H
F	W; Y; L; M; H	I; V; A
G	A	S; N; T; D; E; N; Q
H	Y; F; K; R	L; M; A
I	V; L; M; A	F; Y; W; G
K	R; H	D; E; N; Q; S; T; A
L	M; I; V; A	F; Y; W; H; C
M	L; I; V; A	F; Y; W; C;
N	Q	D; E; S; T; A; G; K; R
P	V; I	L; A; M; W; Y; S; T; C; F
Q	N	D; E; A; S; T; L; M; K; R
R	K; H	N; Q; S; T; D; E; A
S	A; T; G; N	D; E; R; K
T	A; S; G; N; V	D; E; R; K; I
V	A; L; I	M; T; C; N
W	F; Y; H	L; M; I; V; C
Y	F; W; H	L; M; I; V; C

- 10 El cambio de A, F, H, I, L, M, P, V, W o Y a C es semiconservador en el caso de que la nueva cisteína permanezca como un tiol libre. Además, el experto en la materia apreciará que las glicinas en posiciones estéricamente exigentes no deben sustituirse y que no debe introducirse P en partes de la proteína que presenten una estructura alfa-helicoidal o de lámina beta.
- 15 Alternativa o adicionalmente, una «variante» tal como se utiliza en la presente memoria, puede caracterizarse por un determinado grado de identidad de secuencia respecto al polipéptido parental o polinucleótido parental del que se ha derivado. Más exactamente, una variante de proteína en el contexto de la presente invención muestra una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a su polipéptido parental. La expresión «identidad de secuencia de por lo menos 90 %» se utiliza en toda la especificación con respecto a comparaciones de secuencias de polipéptido y de polinucleótido. Dicha expresión preferentemente se refiere a una identidad de secuencias de por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, o por lo menos 99 %, respecto al polipéptido de referencia respecto o respecto al polinucleótido de referencia respectivo.
- 20 Los fragmentos de proteínas comprenden delecciones de aminoácidos, que pueden ser truncados N-terminales, truncados C-terminales o delecciones internas o cualquier combinación de ellas. Dichas variantes que comprenden truncados N-terminales, truncados C-terminales y/o delecciones internas se denominan «fragmentos» en el contexto de la presente solicitud. Un fragmento puede ser natural (p. ej., variantes de corte y empalme) o puede construirse artificialmente, preferentemente por medios de tecnología de manipulación génica. Preferentemente, un fragmento (o variante por delección) presenta una delección de hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos en su extremo N-terminal y/o en su extremo C-terminal y/o internamente en comparación con el polipéptido parental, preferentemente en su extremo N-terminal, en sus extremos N-terminal y C-terminal, o en su extremo C-terminal.
- 25 En el caso de que se comparan dos secuencias y no se especifique la secuencia de referencia en comparación con la cual se va a calcular el porcentaje de identidad de secuencia, la identidad de secuencia se calculará en referencia a la secuencia más larga de las dos secuencias que van a compararse, en caso de que no se indique específicamente lo contrario.
- 30 La similitud de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos, es decir, el porcentaje de identidad de secuencia, puede determinarse mediante alineaciones de secuencias. Dichas alineaciones pueden llevarse a cabo con varios algoritmos conocidos de la técnica, preferentemente con el algoritmo matemático de Karlin y Altschul (Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877), con hmmpalign (paquete HMMER, <http://hmmer.wustl.edu/>) o con el algoritmo CLUSTAL (Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 4673-80) o el

algoritmo CLUSTALW2 (Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. (2007). Clustal W y Clustal X versión 2.0. Bioinformatics, 23, 2947-2948) que están disponibles en, p. ej., http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html or on <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. Preferentemente, se utiliza el algoritmo CLUSTALW2 en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> con los parámetros por defecto tal como se indica en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>: tipo de alineación=lenta, matriz de pesos de proteína=Gonnet, hueco abierto=10, extensión de hueco=0,1 para las opciones de alineación por pares lenta y matriz de pesos de proteína=Gonnet, hueco abierto=10, extensión de hueco=0,20, distancias de hueco=5, ningún hueco terminal=no; Opciones de salida: formato=AIn con números, Orden=alineado.

El grado de identidad de secuencia (correspondencia de secuencias) puede calcularse utilizando, p. ej., BLAST, BLAT o BlastZ (o BlastX). Un algoritmo similar se incorpora en los programas BLASTN y BLASTP de Altschul et al. J. Mol. Biol. 215: 403-410. Se llevan a cabo búsquedas BLAST de proteínas con el programa BLAST disponible en, p. ej., http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&P

AGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome. Los parámetros de algoritmo preferentes son los parámetros por defecto tal como se indican en http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&P
 AGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome: Umbral esperado=10, tamaño de palabra=3, max de correspondencias en un intervalo de búsqueda=0, matriz=BLOSUM62, costes de hueco=Existencia: 11 Extensión: 1, ajustes composicionales=ajuste condicional de la matriz de puntuación compositiva junto con la base de datos de secuencias de proteína no redundantes (nr) para obtener secuencias de aminoácidos homólogos a los polipéptidos Factor 1 y Factor 2.

Para obtener alineaciones con huecos con fines comparativos, se utilizó Gapped BLAST, tal como se describe en Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. Al utilizar los programas BLAST y Gapped BLAST, se utilizaron los parámetros por defecto de los programas respectivos. El análisis de correspondencia de secuencias puede complementarse con técnicas establecidas de mapeado de homologías, tales como Shuffle-LAGAN (Brudno M., Bioinformatics 2003b, 19 Suppl 1:I54-I62) o los campos aleatorios de Markov. En donde se hace referencia a porcentajes de identidad de secuencia en la presente solicitud, dichos porcentajes se calculan en relación con la longitud total de la secuencia más larga, en caso de que no se indique específicamente lo contrario.

La expresión «célula huésped» tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una célula que contiene un ácido nucleico de la invención (p. ej., un plásmido o virus). Dicha célula huésped puede ser una célula procariótica (p. ej., una célula bacteriana) o una célula eucariótica (p. ej., una célula fúngica, vegetal o animal). La célula puede ser una célula transformada o no transformada. La célula puede ser una célula aislada, por ejemplo en un cultivo celular o parte de un tejido, que puede estar aislada ella misma o ser parte de una estructura de organización más compleja, tal como un órgano o un individuo.

Los términos «Factor 1», «proteína Factor 1» o «polipéptido Factor 1» se utilizan intercambiablemente y se refiere a la proteína indicada en la secuencia de referencia del NCBI, NM_019107.3 (homólogo humano), así como sus homólogos de mamífero, en particular de ratón o rata. La secuencia de aminoácidos del homólogo humano está codificada en el marco de lectura abierto 10 en el cromosoma humano 19 (C19Orf10). Preferentemente, la proteína Factor 1 se refiere a una proteína, que comprende, esencialmente consiste o consiste en un segmento central del Factor 1 humano que presenta la secuencia de aminoácidos según SEC ID n.º 1. En una realización más preferente, la proteína Factor 1 presenta la secuencia de aminoácidos según SEC ID n.º 2.

Los términos «Factor 2», «proteína Factor 2» o «polipéptido Factor 2» se utilizan intercambiablemente y se refieren a la proteína indicada en la secuencia de referencia del NCBI, NM_175063.4 (homólogo humano), así como sus homólogos de mamífero, en particular de ratón o rata. La secuencia de aminoácidos del Factor 2 humano está codificada en el marco de lectura abierto 63 en el cromosoma humano 19 (C19Orf63). Preferentemente, la proteína Factor 2 se refiere a una proteína, que comprende, esencialmente consiste o consiste en un segmento central del Factor 2 humano que presenta la secuencia de aminoácidos según SEC ID n.º 3. La proteína Factor 2 puede presentar la secuencia de aminoácidos según SEC ID n.º 4 y 5, respectivamente. Particularmente, la proteína Factor 2 es la forma secretada, que preferentemente presenta la secuencia de aminoácidos según SEC ID n.º 4.

Las expresiones «tejido no transformado» o «células no transformadas» se refieren a tejido y células que muestran los parámetros fisiológicos de una célula o tejido no canceroso o tumorigénico comparable. Dichos parámetros son, por ejemplo, aunque sin limitarse a ellos, control del ciclo celular, tasa de división celular, inhibición por contacto, crecimiento independiente de anclaje o metabolismo. Una célula o tejido no canceroso o tumorigénico comparable puede ser sano, lesionado o enfermo.

El término «curación» comprende la regeneración y reparación de células, tejidos, órganos y sistemas biológicos vivos como un todo y la reanudación parcial o completa del funcionamiento normal. En el caso de tejido, órganos o un sistema biológico como un todo, comprende el proceso por el que las células en el cuerpo se regeneran y reparan para reducir el tamaño de la zona lesionada o necrótica y sustituirla por nuevo tejido vivo. La sustitución puede ocurrir, por ejemplo, mediante regeneración en la que las células necróticas son sustituidas por nuevas células que forman tejido

- similar al presente originalmente, o mediante reparación en la que el tejido lesionado se sustituye por tejido cicatricial. Debido a que la regeneración es el proceso que resulta en la reanudación parcial o completa del funcionamiento normal, es la variante preferente en el proceso de curación. Por lo tanto, el término curación en el contexto de la presente invención comprende todos los procesos que combinaría un experto en la materia con este término, aunque preferentemente deberían promoverse los procesos regenerativos en lugar de los procesos que conducen a la producción de tejido no funcional tal como, por ejemplo, tejido cicatricial. El término curación en el contexto de la presente invención también se refiere preferentemente a la promoción de la proliferación, migración, formación de red y angiogénesis.
- 10 La expresión «que incrementa la proliferación» se refiere a un incremento de la tasa de división celular de una célula o grupo de células, en comparación con células o grupos de células no tratados con las proteínas, ácidos nucleicos, vectores o composiciones farmacéuticas: de la invención. Es bien conocido de la técnica cómo medir la tasa de división celular de las células, p. ej., mediante el recuento de las células mitóticas mediante FACS.
- 15 La expresión «inhibición de la apoptosis» se refiere a la capacidad de las proteínas, ácidos nucleicos, vectores o composiciones farmacéuticas de la invención de evitar que una célula o grupo de células entre en apoptosis bajo condiciones en las que las células o grupos de células de control entran en apoptosis. Es bien conocido por el experto en la materia cómo medir si una célula experimenta apoptosis, p. ej., mediante el ensayo TUNEL.
- 20 La descripción de las realizaciones comprende definiciones y explicaciones adicionales de los términos utilizados a lo largo de toda la solicitud. Dichas descripciones y realizaciones son válidas para toda la solicitud, a menos que se indique lo contrario.
- Realizaciones
- 25 A continuación, se describen los elementos de la presente invención. Dichos elementos se enumeran con realizaciones específicas; sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. Los ejemplos y realizaciones preferentes diversamente descritos no deben interpretarse como limitativos de la presente invención a solo las realizaciones descritas explícitamente. La presente descripción debe entenderse que apoya y comprende realizaciones que combinan las realizaciones descritas explícitamente con cualquier número de los elementos dados a conocer y/o preferentes. Además, cualesquiera permutaciones y combinaciones de todos los elementos descritos en la presente solicitud deben considerarse dadas a conocer mediante la descripción de la presente solicitud, a menos que el contexto indique lo contrario.
- 30 En un primer aspecto, la invención proporciona una proteína comprende una proteína Factor 1 con la secuencia de aminoácidos según SEC ID nº 1 o un fragmento o una variante de la misma, que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a SEC ID n.º 1 en toda la longitud de SEC ID n.º 1, para la utilización como un medicamento. En una realización particularmente preferente de la invención, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 1 o un fragmento de la misma. Preferentemente, la proteína presenta una identidad de por lo menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % respecto a la SEC ID n.º 1.
- 35 En una realización preferente del presente aspecto de la invención, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 2. Los fragmentos preferentes de SEC ID n.º 2 no presentan la secuencia de señal N-terminal MAAPSGGWNGVGASLWAALLGAVALRPAEA (SEC ID n.º 35). El experto en la materia será capaz de decidir sin una carga indebida qué posiciones en el polipéptido parental pueden mutarse y en qué medida y qué posiciones deben mantenerse para conservar la funcionalidad del polipéptido. Dicha información puede obtenerse, por ejemplo, de secuencias de homólogos que pueden identificarse, alinearse y analizarse mediante métodos bioinformáticos bien conocidos de la técnica. Dichos análisis se describen a modo de ejemplo en el Ejemplo 7 y los resultados se muestran en las figuras 6 y 7. Se introducen mutaciones preferentemente en aquellas regiones de la proteína que no están totalmente conservadas entre especies, preferentemente en mamíferos, es decir, una o más de aquellas posiciones de aminoácidos mutadas que no están marcadas con «*». Según un ejemplo específico, solo se alteran aminoácidos que ni están totalmente conservados (indicados con «*») o están conservados en menor grado (indicados mediante «:» o «.»). En una realización particularmente preferente de la invención, una proteína Factor 1 comprende, esencialmente consiste o consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 2.
- 40 Dichas mutaciones pueden estar presentes en la proteína de longitud completa según la SEC ID n.º 2 o en la proteína que no presenta la secuencia de señal N-terminal según la SEC ID n.º 1.
- 45 Las variantes por delección N-terminales además de la señal N-terminal pueden no presentar uno o más aminoácidos entre las posiciones de aminoácido 32 y 55 (basadas en la SEC ID n.º 2), es decir, de la región N-terminalmente conservada. De acuerdo con lo anterior, el extremo N-terminal de la proteína Factor 1delecionada puede encontrarse en la posición 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 o 56, adicional o alternativamente la proteína Factor 1delecionada puede no presentar una o más de las posiciones de aminoácido 146 a 173 (basadas en la SEC ID n.º 2), es decir, de la región C-terminalmente conservada. De acuerdo con lo anterior, el extremo C-terminal de una proteína Factor 1delecionada puede encontrarse en la posición 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, o 172.

La proteína del primer aspecto de la presente invención puede comprender, además, secuencias adicionales de aminoácidos, p. ej., para estabilizar o purificar la proteína resultante. Son ejemplos de dichos aminoácidos, las etiquetas His₆ (SEC ID n.º 36), etiquetas myc o etiquetas FLAG.

Puede resultar preferente mutar sitios de corte de proteasa dentro de la proteína del primer aspecto de la presente invención para estabilizar la proteína (ver Segers et al. Circulation 2007, 2011). El experto en la materia conocerá cómo determinar los posibles sitios de corte proteolítico dentro de una proteína. Por ejemplo, las secuencias de proteína pueden enviarse a sitios web que proporcionan tales análisis, tales como, p. ej., http://web.expasy.org/peptide_cutter/ or <http://pmap.burnham.org/proteases>. En el caso de que la secuencia de proteína según la SEC ID n.º 2 se envíe a http://web.expasy.org/peptide_cutter/ se determinarán los sitios de corte siguientes con menor frecuencia (inferior a 10):

Tabla 1

Proteasa	Frecuencia	Posición (con referencia a SEC ID n.º 2)
Proteasa Arg-C	7	27 43 96 113 130 151 170
Endopeptidasa Asp-N	4	40 58 85 132
Clostriptina	7	27 43 96 113 130 151 170
LysN	9	59 99 108 124 136 144 155 160 166
Prolina endopeptidasa	4	28 44 97 152

Dichos sitios pueden alterarse para eliminar la secuencia de reconocimiento/corte de la proteasa respectivamente identificada a fin de incrementar la semivida en suero de la proteína.

Se ha mostrado que el Factor 1 y el Factor 2 presentan actividad potenciadora de la proliferación, en particular en la potenciación de la angiogénesis. La proteína según el primer aspecto puede utilizarse para potenciar la proliferación de tejido no transformado o células no transformadas, preferentemente la angiogénesis. De acuerdo con lo anterior, resulta preferente que se utilice el Factor 1 en el tratamiento de enfermedades, que pueden beneficiarse de una angiogénesis mejorada. Se ejemplifican en mayor detalle posteriormente varios ejemplos de tales enfermedades.

La potenciación de la proliferación implica todos los grados de potenciación de la proliferación de una célula o un tejido en comparación con una célula de control o tejido de control sin la administración de una proteína de la invención. La proliferación de una célula puede medirse, por ejemplo, mediante la incorporación de bromodesoxiuridina, tal como se describe en el Ejemplo 2. La proliferación potenciada de un tejido puede determinarse, por ejemplo, mediante la medición del incremento del peso o tamaño del tejido respectivo, así como mediante métodos histológicos. Dichos métodos son bien conocidos de la técnica, ya que muchos de ellos son métodos estándares para aplicaciones clínicas.

En otra realización preferente, la proteína según el primer aspecto es para la utilización en el tratamiento de las indicaciones enumeradas en la reivindicación 2.

La proteína según el primer aspecto también puede utilizarse para inhibir la apoptosis de tejido no transformado o células no transformadas. De esta manera, la proteína de la presente invención muestra potencial antiapoptótico y protege las células o tejido frente a la muerte celular apoptótica. El término «protector» o «efecto citoprotector» en el presente contexto se refiere a la medida en que se reduce la muerte celular apoptótica en las células tratadas con la proteína Factor 1 según la presente invención en comparación con un control en por lo menos 20 %, preferentemente en por lo menos 30 %, más preferentemente en por lo menos 40 % y todavía más preferentemente en por lo menos 50 %, y lo más preferentemente, en por lo menos 60 %. El experto en la materia será capaz de evaluar la muerte celular, por ejemplo, mediante marcaje *in situ* terminal a partir de muescas con dUTP mediado por TdT (TUNEL) tal como se describe en el Ejemplo 3. Otros indicados de apoptosis son, por ejemplo, un genoma fragmentado que puede examinarse mediante, p. ej., escalonamiento de ADN (Liu et al., 2005, Circulation 111:90-96), liberación de citocromo c o actividad de caspasa-3 (Most et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:48404-48412). El efecto antiapoptótico de un péptido puede evaluarse *in vivo* en un modelo animal de insuficiencia cardíaca experimental. Por ejemplo, ratones con disfunción contráctil postisquémica pueden tratarse con la proteína y el tejido cardíaco de los ratones tratados y de control puede evaluarse para la extensión de los cardiomiocitos apoptóticos. El péptido puede administrarse preferentemente por vía parenteral, tal como por vía intraperitoneal, intravenosa o subcutánea. Los fragmentos y variantes de la proteína Factor 1 incluidos en la presente invención muestran potencial antiapoptótico y protegen las células o tejidos de la muerte celular apoptótica, que es por lo menos 50 %, preferentemente 60 %, preferentemente 70 %, preferentemente 80 %, preferentemente 90 % y más preferentemente por lo menos 100 % de la de una proteína con la secuencia de aminoácidos según SEC ID n.º 1.

También se da a conocer, aunque no forma parte de la invención, una proteína que comprende, que consiste esencialmente o que consiste en una proteína Factor 2, con la secuencia de aminoácidos según SEC ID n.º 3 o un fragmento o una variante de la misma, que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80% respecto a SEC ID n.º 3 para la utilización en la potenciación de la proliferación y/o curación de tejido no transformado o células no transformadas. La proteína Factor 2 puede comprender la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 3 o un fragmento o

una variante de la misma, que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80% respecto a SEC ID n.º 3. El experto en la materia será capaz de decidir sin una carga indebida qué posiciones en el polipéptido parental pueden mutarse y en qué medida y qué posiciones deben mantenerse para conservar la funcionalidad del polipéptido. Dicha información puede obtenerse, por ejemplo, de secuencias de homólogos que pueden identificarse, alinearse y analizarse mediante métodos bioinformáticos bien conocidos de la técnica. La proteína respectiva puede comprender la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 3 o un fragmento de la misma. Preferentemente, la proteína presenta una identidad de por lo menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % respecto a la SEC ID n.º 3.

10 Dicha proteína puede comprender, además, secuencias adicionales de aminoácidos, p. ej., para estabilizar o purificar la proteína resultante.

15 Resulta preferente mutar los sitios de corte de proteasa dentro de la proteína del primer aspecto de la presente invención para estabilizar la proteína. Pueden identificarse sitios de corte proteolítico adecuados tal como se ha descrito anteriormente.

20 Se da a conocer, además, aunque no forma parte de la presente invención, una proteína que comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 4 o un fragmento o una variante de la misma, que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80% respecto a SEC ID n.º 4. Los fragmentos preferentes no presentan la secuencia de señal N-terminal MAAASAGATRLLLLLMAVAA PSRARG' (SEC ID n.º 37). El experto en la materia será capaz de decidir sin una carga indebida qué posiciones en el polipéptido parental pueden mutarse y en qué medida y qué posiciones deben mantenerse para conservar la funcionalidad del polipéptido. Dicha información puede obtenerse, por ejemplo, de secuencias de homólogos que pueden identificarse, alinearse y analizarse mediante métodos bioinformáticos bien conocidos de la técnica. Dichos análisis se describen a modo de ejemplo en el Ejemplo 8 y los resultados se muestran en las figuras 8 y 9. Se introducen mutaciones preferentemente solo en aquellas regiones de la proteína que no están totalmente conservadas entre especies, preferentemente en mamíferos, es decir, una o más de aquellas posiciones de aminoácidos mutadas que no están marcadas con «*». Según un ejemplo específico, solo se alteran aminoácidos que ni están totalmente conservados (indicados con «*») o están conservados en menor grado (indicados mediante «:» o «.»). Resulta particularmente preferente la proteína Factor 2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 4 o un fragmento de la misma. Preferentemente, la proteína presenta una identidad de por lo menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % respecto a la SEC ID n.º 4.

25 Dichas mutaciones pueden estar presentes en la proteína de longitud completa según la SEC ID n.º 4 o en la proteína que no presenta la secuencia de señal N-terminal.

30 Las variantes por delección N-terminales además de la señal N-terminal pueden no presentar uno o más aminoácidos entre las posiciones de aminoácido 27 y 73 (basadas en la SEC ID n.º 4), es decir, de la región N-terminalmente conservada. De acuerdo con lo anterior, el extremo N-terminal de la proteína Factor 2 delecionada puede encontrarse en la posición 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 o 56, adicional o alternativamente la proteína Factor 1 delecionada puede no presentar una o más de las posiciones de aminoácido 190 a 254 (basadas en la SEC ID n.º 4), es decir, de la región C-terminalmente conservada. De acuerdo con lo anterior, el extremo C-terminal de la proteína Factor 2 delecionada puede encontrarse en la posición 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252 o 253.

35 Se da a conocer, además, aunque no forma parte de la presente invención, una proteína que comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 5 o un fragmento o una variante de la misma, que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80% respecto a SEC ID n.º 5. Los fragmentos preferentes no presentan la secuencia de señal N-terminal MAAASAGATRLLLLLMAVAAPSRARG (SEC ID n.º 37). El experto en la materia será capaz de decidir sin una carga indebida qué posiciones en el polipéptido parental pueden mutarse y en qué medida y qué posiciones deben mantenerse para conservar la funcionalidad del polipéptido. Dicha información puede obtenerse, por ejemplo, de secuencias de homólogos que pueden identificarse, alinearse y analizarse mediante métodos bioinformáticos bien conocidos de la técnica. Dichos análisis se describen a modo de ejemplo en el Ejemplo 9 y los resultados se muestran en las figuras 10 y 11. Se introducen mutaciones preferentemente solo en aquellas regiones de la proteína que no están totalmente conservadas entre especies, preferentemente en mamíferos, es decir, una o más de aquellas posiciones de aminoácidos mutadas que no están marcadas con «*». Según un ejemplo específico, solo se alteran aminoácidos que ni están totalmente conservados (indicados con «*») o están conservados en menor grado (indicados mediante «:» o «.»). Resulta particularmente preferente la proteína Factor 2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 5 o un fragmento de la misma. Preferentemente, la proteína presenta una identidad de por lo menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % respecto a la SEC ID n.º 5.

40 Dichas mutaciones pueden estar presentes en la proteína de longitud completa según la SEC ID n.º 5 o en la proteína según la SEC ID nº 5 que no presenta la secuencia de señal N-terminal.

Las variantes por delección N-terminales además de la señal N-terminal pueden no presentar uno o más aminoácidos entre las posiciones de aminoácido 27 y 73 (basadas en la SEC ID n.º 4), es decir, de la región N-terminalmente conservada. De acuerdo con lo anterior, el extremo N-terminal de la proteína Factor 2delecionada puede encontrarse en la posición 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 o 56, adicional o alternativamente la proteína Factor 1delecionada puede no presentar una o más de las posiciones de aminoácido 190 a 262 (basadas en la SEC ID n.º 4), es decir, de la región C-terminalmente conservada. De acuerdo con lo anterior, el extremo C-terminal de la proteína Factor 2delecionada puede encontrarse en la posición 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260 o 261.

Los fragmentos y variantes de la proteína Factor 1 dados a conocer anteriormente en la presente memoria muestran potencial antiapoptótico y protegen las células o tejidos de la muerte celular apoptótica, que es por lo menos 50 %, preferentemente 60 %, preferentemente 70 %, preferentemente 80 %, preferentemente 90 % y más preferentemente por lo menos 100 % de la de una proteína con la secuencia de aminoácidos según SEC ID n.º 3, SEC ID n.º 4 o SEQ ID n.º 5, lo más preferentemente SEC ID n.º 3.

La proteína puede utilizarse para potenciar la proliferación de tejido no transformado o células no transformadas. Potenciar la proliferación implica todos los grados de potenciación respecto a la célula o tejido de control sin administración de una proteína. Los métodos experimentales para la medición de la proliferación se han descrito anteriormente. Una medición respectiva de la proliferación para dicha proteína puede evaluarse mediante la incorporación de bromodesoxiuridina, que también se ha descrito en el Ejemplo 2.

La proteína puede utilizarse para la curación de tejido no transformado o células no transformadas. Una proteína puede mostrar ambas funciones anteriormente indicadas, es decir, potenciar la proliferación y curar un tejido no transformado o células no transformadas.

La proteína según el aspecto uno puede administrarse in vivo, ex vivo o in vitro, preferentemente in vivo. Un ejemplo en el que una proteína del primer aspecto de la invención se administra ex vivo o in vitro es la potenciación de la proliferación y/o curación y/o inhibición de la apoptosis con el fin de la ingeniería de tejidos, en donde se produce un tejido para el trasplante en un individuo. Las células que se utilizan para la ingeniería de tejidos pueden derivarse del mismo individuo, aunque también de otro individuo de la misma especie o de otra especie. El procedimiento de extraer dichas células o tejidos y el trasplante del nuevo tejido en un individuo no está comprendido en la invención.

Las células no transformadas pueden ser células madre. Dichas células madre pueden ser células madre embrionarias o células madre adultas, así como células progenitoras. Las células pueden ser células madre omnipotentes, así como células madre pluripotentes.

Las células no transformadas o el tejido no transformado puede estar enfermo. Alternativamente, las células no transformadas o el tejido no transformado está dañado. Según un ejemplo, las células no transformadas o el tejido no transformado están dañados y enfermos.

Las células no transformadas o el tejido no transformado pueden ser células musculares o tejido muscular. El músculo comprende todos los tipos de músculo conocidos por el experto en la materia. Dichos músculos son, por ejemplo, el músculo esquelético, músculo liso o músculo cardíaco. En una realización preferente más particular, el músculo es un músculo cardíaco. Alternativamente, las células no transformadas o el tejido no transformado son células epiteliales o tejido epitelial, o las células no transformadas o el tejido no transformado son células nerviosas o tejido nervioso.

Las células no transformadas o el tejido no transformado puede pertenecer al sistema circulatorio de un individuo.

Las células no transformadas o el tejido no transformado puede pertenecer o derivarse de un sistema definido del cuerpo de un individuo seleccionado del grupo que comprende los sistemas digestivo, endocrino, excretorio, inmunitario, integumentario, muscular, nervioso, reproductor, respiratorio o esquelético. Las células pueden pertenecer a dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o la totalidad de los sistemas enumerados de un individuo.

Las células no transformadas o el tejido no transformado puede pertenecer alternativamente o derivarse de una parte definida u órgano del cuerpo de un individuo, seleccionado del grupo que comprende: piel, hueso, corazón, cartílago, vaso, esófago, estómago, intestino, glándula, hígado, riñón, pulmón, cerebro y bazo. Específicamente, las células no transformadas o el tejido no transformado pertenecen o pueden derivarse del corazón.

En el caso de una célula no transformada dañadas o de tejido no transformado, el daño puede haber sido causado por una enfermedad genética/hereditaria o de una enfermedad adquirida, resultante, por ejemplo, de isquemia, daño por reperfusión, inflamación, infección, traumatismo, sobrecarga mecánica, intoxicación o cirugía. Preferentemente, el daño está causado por isquemia o mediante un daño por reperfusión.

En el caso de una célula o tejido enfermo o dañado, el daño está causado preferentemente por una enfermedad que está asociada a atrofia, hipoplasia, inflamación, herida o lesión. Resulta particularmente preferente que la enfermedad esté asociada a lesión. También resulta particularmente preferente que la enfermedad esté asociada a herida.

En una realización preferente de la presente invención, la enfermedad es un trastorno del músculo esquelético seleccionado del grupo que consiste en distrofia muscular, debilidad muscular, atrofia muscular, miositis, enfermedad del núcleo central, miopatía nemalínica (bastones), miopatía centronuclear, miopatía miotubular, miopatía miotubular centronuclear, oftalmoplejía ocular y miopatía mitocondrial. La distrofia muscular puede seleccionarse del grupo que consiste en distrofia muscular de Becker, distrofia muscular congénita, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular distal, distrofia muscular de Emery-Dreifuss, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofia muscular de la cintura y extremidades, distrofia muscular miotónica y distrofia muscular oculofaringea. La miositis puede seleccionarse del grupo que consiste en miositis osificante, fibromiositis, miopatías inflamatorias idiopáticas (tales como dermatomiositis, polimiositis y miositis por cuerpos de inclusión) y piomiositis.

En otra realización preferente de la invención, la enfermedad es cardiomiopatía primaria o adquirida. La cardiomiopatía primaria se selecciona de cardiomiopatía hereditaria y cardiomiopatía causada por mutaciones espontáneas. Las cardiomiopatías son, por ejemplo, aunque sin limitación, cardiomiopatía hipertrófica (CMH o CMOH), cardiomiopatía ventricular derecha arritmogénica (CVDA), miopatía mitocondrial no compactada ventricular aislada, cardiomiopatía dilatada (CMD), cardiomiopatía restrictiva (CMR), cardiomiopatía de Takotsubo, endocarditis de Loeffler, cardiomiopatía diabética, cardiomiopatía alcohólica, cardiomiopatía asociada a obesidad.

En el contexto de la invención, la cardiomiopatía adquirida se selecciona preferentemente de cardiomiopatía isquémica causada por enfermedades arteriales coronarias, ateroescleróticas u otras; cardiomiopatía causada por infección o intoxicación del miocardio, enfermedad cardíaca hipertensiva causada por hipertensión arterial pulmonar y/o hipertensión arterial, y enfermedades de las válvulas cardíacas, en donde la cardiomiopatía isquémica causada por enfermedades arteriales coronarias, ateroescleróticas u otras, resulta particularmente preferente.

Las células no transformadas o tejido no transformado que ha sido dañado por isquemia o daño por reperfusión preferentemente pertenece al corazón. De acuerdo con lo anterior, resulta preferente que la enfermedad resultante que va a tratarse se seleccione del grupo que consiste en infarto de miocardio, angina de pecho e insuficiencia cardíaca, en donde el infarto de miocardio resulta particularmente preferente. La expresión «infarto de miocardio» tal como se utiliza en el contexto de la invención comprende el infarto agudo de miocardio (IAM).

El uso médico de la proteína según el primer aspecto de la invención comprende la aplicación en un individuo tras infarto de miocardio y la curación comprende la mejora de la función sistólica ventricular izquierda y puede estar asociada a un incremento de la densidad capilar en la zona marginal del infarto. Además, la proteína para el uso según el primer aspecto de la invención puede reducir la mortalidad tras un infarto de miocardio. Los métodos que pueden utilizarse para determinar parámetros como la mejora de la función sistólica ventricular izquierda, el incremento de la densidad capilar en la zona marginal del infarto y la reducción de la mortalidad tras un infarto de miocardio son bien conocidos y se describen a título de ejemplo en los Ejemplos 4 a 6.

Las proteínas Factor 1, fragmentos o variantes descritos anteriormente resultan útiles, por ejemplo, en el tratamiento o mejora de la atrofia, hipoplasia, inflamación, daño, lesión, isquemia, daño por reperfusión, inflamación, infección, traumatismo, sobrecarga mecánica, intoxicación, cardiomiopatía primaria o adquirida, preferentemente cardiomiopatía hereditaria y cardiomiopatía causada por mutaciones espontáneas. Las cardiomiopatías son, por ejemplo, aunque sin limitación, cardiomiopatía hipertrófica (CMH o CMOH), cardiomiopatía ventricular derecha arritmogénica (CVDA), miopatía mitocondrial no compactada ventricular aislada, cardiomiopatía dilatada (CMD), cardiomiopatía restrictiva (CMR), cardiomiopatía de Takotsubo, endocarditis de Loeffler, cardiomiopatía diabética, cardiomiopatía alcohólica, cardiomiopatía asociada a obesidad, infarto de miocardio o en la mejora de la función sistólica ventricular izquierda.

Se dan a conocer además, aunque no forman parte de la invención, las proteínas Factor 1 y Factor 2, fragmentos o variantes indicados anteriormente para el uso en métodos de tratamiento de las afecciones y enfermedades indicadas respectivamente.

En un segundo aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos codificantes de las proteínas según el primer aspecto para la utilización como un medicamento.

La expresión «potenciación de la proliferación y/o curación y/o inhibición de la apoptosis de tejido no transformado o células no transformadas» presenta el significado, y los significados preferentes, definidos anteriormente.

Las secuencias de ácidos nucleicos pueden optimizarse en un esfuerzo por potenciar la expresión en una célula huésped. Entre los parámetros que deben considerarse se incluyen el contenido de C:G, los codones preferentes y la evitación de estructuras secundarias inhibidoras. Estos Factores pueden combinarse de diferentes maneras en un intento por obtener secuencias de ácidos nucleicos que presenten una expresión potenciada en un huésped particular (ver, p. ej., Donnelly et al., publicación de patente internacional n.º WO 97/47358). La capacidad de una secuencia

- particular de presentar una expresión potenciada en un huésped particular implica cierta experimentación empírica. Dicha experimentación implica medir la expresión de una secuencia de ácido nucleico prospectiva y, en caso necesario, alterar la secuencia. Partiendo de una secuencia de aminoácidos particular y la conocida degeneración del código genético, puede obtenerse un gran número de diferentes secuencias de ácidos nucleicos codificantes. La degeneración del código genético aparece debido a que prácticamente la totalidad de los aminoácidos están codificados por diferentes combinaciones de tripletes de nucleótidos, o «codones». La traducción de un codón particular en un aminoácido particular es bien conocida de la técnica (ver, p. ej., Lewin GENES IV, p. 119, Oxford University Press, 1990).
- 10 El ácido nucleico puede comprender, además, un elemento de control transcripcional o secuencias de control de la expresión situadas para controlar la expresión de la proteína. Dicho ácido nucleico, junto con los elementos de control, con frecuencia se denomina «sistema de expresión». La expresión «sistema de expresión» tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un sistema diseñado para producir uno o más productos génicos de interés. Normalmente, dicho sistema se diseña «artificialmente», es decir, por medios tecnológicos de manipulación genética utilizables para producir el producto genérico de interés *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. La expresión «sistema de expresión» comprende, además, la expresión del producto genérico de interés que comprende la transcripción de los polinucleótidos, el corte y empalme del ARNm, la traducción en un polipéptido, la modificación cotraduccional y post-traduccional del polipéptido o proteína, así como el direccionamiento de la proteína a uno o más compartimientos dentro de la célula, la secreción a partir de la célula y la incorporación de la proteína en la misma célula, o en otra.
- 15 20 Dicha descripción general se refiere a sistemas de expresión para el uso en células, tejidos u organismos eucarióticos. Los sistemas de expresión para los sistemas procarióticos pueden ser diferentes, en donde es bien conocido de la técnica cómo se construye un sistema de expresión para células procarióticas.
- 25 Entre los elementos reguladores presentes en un casete de expresión génica generalmente se incluyen: (a) un promotor acoplado transcripcionalmente a una secuencia de nucleótidos codificante del polipéptido, (b) un sitio de unión ribosómica 5' funcionalmente acoplado con la secuencia de nucleótidos, (c) un terminador unido al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos, y (d) una señal de poliadenilación 3' funcionalmente acoplada a la secuencia de nucleótidos. También pueden estar presentes elementos reguladores adicionales que resultan útiles para potenciar o regular la expresión génica o el procesamiento del polipéptido. Los promotores son elementos genéticos que son reconocidos por una ARN polimerasa y que median en la transcripción de las regiones cadena abajo. Los promotores preferentes son promotores fuertes que proporcionan niveles incrementados de transcripción. Son ejemplos de promotores fuertes, el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV), y CMV con intrón A (Chapman et al, Nucl. Acids Res. 19:3979-3986, 1991). Entre los ejemplos adicionales de promotores se incluyen los promotores naturales, tales como el promotor EF1 alfa, el promotor del CMV murino, el promotor del virus del sarcoma de Rous y los promotores tempranos/tardíos del SV40 y el promotor de [beta]-actina, y promotores artificiales tales como el promotor específico muscular sintético y el promotor químérico específico de músculo/CMV (Li et al., Nat. Biotechnol. 17:241-245, 1999 , Hagstrom et al., Blood 95:2536-2542, 2000).
- 30 35 40 45 El sitio de unión ribosómica se localiza en, o en proximidad a, el codón de inicio. Entre los ejemplos de sitios de unión ribosómica preferentes se incluyen CCACCAUUGG, CCGCCAUUGG y ACCAUUGG, donde AUG es el codón de inicio (Kozak, Cell 44:283-292, 1986). La señal de poliadenilación es responsable del corte del ARN transcripto y la adición de una cola poli(A) al ARN. La señal de poliadenilación en eucariotas superiores contiene una secuencia AAUAAA de aproximadamente 11 a 30 nucleótidos desde el sitio de adición de poliadenilación. La secuencia AAUAAA participa en la señalización del corte del ARN (Lewin, Genes IV, Oxford University Press, NY, 1990). La cola poli(A) es importante para el procesamiento, exportación desde el núcleo, la traducción y la estabilidad del ARNm.
- 50 Las señales de poliadenilación que pueden utilizarse como parte de un casete de expresión génica se incluyen la señal de poliadenilación mínima de [beta]-globina de conejo y la poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH, por sus siglas en inglés) (Xu et al., Gene 272:149-156, 2001 , Post et al., patente US n.º 5.122.458).
- 55 60 65 Entre los ejemplos de elementos reguladores adicionales que resultan útiles para potenciar o regular la expresión génica o el procesamiento de un polipéptido que pueden estar presentes se incluyen un intensificador, una secuencia líder y un operador. Una región de intensificador incrementa la transcripción. Entre los ejemplos de regiones de intensificador se incluyen el intensificador de CMV y el intensificador del SV40 (Hitt et al., Methods in Molecular Genetics 7: 13-30, 1995 , Xu, et al., Gene 272: 149-156, 2001). Una región de intensificador puede estar asociada a un promotor.
- 70 75 80 85 La expresión de la proteína según el primer aspecto de la invención puede estar regulada. Dicha regulación puede llevarse a cabo en muchas etapas de la expresión génica. Son posibles etapas de regulación, por ejemplo, aunque sin limitación, el inicio de transcripción, la eliminación de promotor, la elongación de la transcripción, el corte y empalme, la exportación del núcleo, la estabilidad del ARNm, el inicio de la traducción, la eficiencia de la traducción, la elongación de la traducción y el plegamiento de la proteína. Otras etapas de regulación, que incluyen en la concentración de un polipéptido de Factor 1 o Factor 1 dentro de una célula afectan a la semivida de la proteína. Dicha etapa de regulación es, por ejemplo, la degeneración regulada de proteínas. Debido a que las proteínas de la invención comprenden proteínas secretadas, la proteína puede ser dirigida a una ruta secretoria de la célula huésped. La

eficiencia de la secreción regula, junto con las etapas reguladoras referidas a la expresión y a la estabilidad de la proteína, la concentración de la proteína respectiva en el exterior de la célula. Fuera de la célula puede referirse, por ejemplo, aunque sin limitación, a un medio de cultivo, un tejido, la matriz o espacio intracelular, o un líquido corporal, tal como sangre o linfa.

El control de las etapas reguladoras mencionadas anteriormente puede ser, por ejemplo, independiente del tipo celular o tipo tisular, o específico del tipo celular o tipo tisular. El control de las etapas reguladoras puede ser específico de tipo celular o de tipo tisular. Dicha regulación específica de tipo celular o de tipo tisular preferentemente se consigue mediante las etapas de regulación referidas a la transcripción de un ácido nucleico. Dicha regulación transcripcional puede llevarse a cabo mediante la utilización de secuencias de promotor específicas de tipo celular o de tipo tisular. El resultado de dicha regulación específica de tipo celular o de tipo tisular puede presentar diferentes grados de especificidad. Lo anterior significa que la expresión de un polipéptido respectivo se ve potenciada en la célula o tejido respectivo en comparación con otro tipo celular o tisular, o que la expresión está limitada al tipo celular o tisular respectivo. Las secuencias de promotor específicas de tipo celular o tipo tisular son bien conocidas de la técnica y están disponibles para un amplio abanico de tipos celulares o tisulares.

La expresión podría no ser específica de tipo celular o de tipo tisular, pero depender de condiciones fisiológicas. Dichas condiciones son, por ejemplo, una inflamación o una herida. Dicha expresión específica de condición fisiológica también puede conseguirse mediante regulación en todas las etapas de regulación anteriormente mencionadas. El modo de regulación preferente para una expresión específica de condición fisiológica es la regulación transcripcional. Con este fin puede utilizarse un promotor específico de lesión o inflamación. Los promotores respectivos son, por ejemplo, secuencias naturales, que pueden, por ejemplo, derivarse de genes, los cuales se expresen específicamente durante una reacción inmunitaria y/o la regeneración de tejido lesionado. Otra posibilidad es la utilización de secuencias de promotor artificiales, las cuales, por ejemplo, se construyan mediante la combinación de dos o más secuencias naturales.

La regulación puede ser específica de tipo celular o de tipo tisular, y específica de condición fisiológica. Preferentemente, la expresión es una expresión específica del corazón. Resulta particularmente preferente una expresión específica del corazón y específica de lesión.

Otra posibilidad para una regulación de la expresión de la proteína según el primer aspecto de la invención es la regulación condicional de la expresión génica. Para conseguir la regulación condicional, puede utilizarse una secuencia de operador. Por ejemplo, la secuencia del operador Tet puede utilizarse para reprimir la expresión génica. La regulación condicional de la expresión génica mediante el operador Tet junto con un represor Tet es bien conocida de la técnica y se han establecido muchos sistemas respectivos para una amplia gama de organismos procarióticos y eucarióticos. El experto en la materia conoce cómo seleccionar un sistema adecuado y adaptarlo a las necesidades especiales de la aplicación respectiva.

La utilización de un ácido nucleico según la invención preferentemente comprende la aplicación en un individuo tras un infarto de miocardio y la curación preferentemente comprende la mejora de la función sistólica ventricular izquierda y puede estar asociada a un incremento de la densidad capilar en la zona marginal del infarto. Además, puede reducir la mortalidad tras un infarto de miocardio. Los métodos que pueden utilizarse para determinar parámetros como la mejora de la función sistólica ventricular izquierda, el incremento de la densidad capilar en la zona marginal del infarto y la reducción de la mortalidad tras un infarto de miocardio son bien conocidos y se describen a título de ejemplo en los Ejemplos 4 a 6.

Los ácidos nucleicos codificantes de las proteínas Factor 1 y Factor 2, fragmentos o variantes descritos anteriormente se utilizan preferentemente en el tratamiento o mejora de la atrofia, hipoplasia, inflamación, daño, lesión, isquemia, daño por reperfusión, inflamación, infección, traumatismo, sobrecarga mecánica, intoxicación, cardiomiopatía primaria o adquirida, preferentemente cardiomiopatía hereditaria y cardiomiopatía causada por mutaciones espontáneas. Las cardiomiopatías son, por ejemplo, aunque sin limitación, cardiomiopatía hipertrófica (CMH o CMOH), cardiomiopatía ventricular derecha arritmogénica (CVDA), miopatía mitocondrial no compactada ventricular aislada, cardiomiopatía dilatada (CMD), cardiomiopatía restrictiva (CMR), cardiomiopatía de Takotsubo, endocarditis de Loeffler, cardiomiopatía diabética, cardiomiopatía alcohólica, cardiomiopatía asociada a obesidad, infarto de miocardio o en la mejora de la función sistólica ventricular izquierda.

En un tercer aspecto, la invención proporciona vectores que comprenden el ácido nucleico o el sistema de expresión del segundo aspecto para la utilización como un medicamento.

La expresión «potenciación de la proliferación y/o curación y/o inhibición de la apoptosis de tejido no transformado o células no transformadas» presentan el significado, y los significados preferentes, definidos anteriormente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término «vector» se refiere a una proteína o un polipéptido, o una mezcla de los mismos, que es capaz de ser introducida o de introducir las proteínas y/o ácido nucleico comprendido en el mismo, dentro de una célula. En el contexto de la presente invención, resulta preferente que los genes de interés codificados por el polinucleótido introducido se expresen dentro de la célula huésped tras la introducción del vector o

los vectores. Entre los ejemplos de vectores adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los vectores plásmidos, los vectores cósmodos, los vectores fágicos, tales como el fago lambda, los vectores fágicos filamentosos, los vectores víricos, las partículas de tipo vírico y las esporas bacterianas.

§ Preferentemente, el vector es un vector vírico. Entre los vectores víricos adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados (VVA), vectores alfavíricos, vectores víricos herpes, vectores del virus del sarampión, vectores del virus de la viruela, vectores víricos de la estomatitis vesicular, vectores retrovíricos y vectores lentivíricos.

10 En una realización particularmente preferente de la invención, el vector es un vector adenovírico o un vector vírico adenoasociado (VAA).

15 El ácido nucleico codificante de una o más proteínas del primer aspecto de la invención puede introducirse en una célula huésped, un tejido o un individuo utilizando vectores adecuados para la administración terapéutica. Los vectores adecuados preferentemente pueden transportar ácidos nucleicos hasta el interior de una célula diana sin causar ningún efecto secundario inaceptable.

20 La utilización de un vector según la invención puede comprender la aplicación en un individuo tras un infarto de miocardio y la curación preferentemente comprende la mejora de la función sistólica ventricular izquierda y puede estar asociada a un incremento de la densidad capilar en la zona marginal del infarto. Además, puede reducir la mortalidad tras un infarto de miocardio. Los métodos que pueden utilizarse para determinar parámetros como la mejora de la función sistólica ventricular izquierda, el incremento de la densidad capilar en la zona marginal del infarto y la reducción de la mortalidad tras un infarto de miocardio son bien conocidos y se describen a título de ejemplo en los Ejemplos 4 a 6.

25 Los vectores que comprenden nucleicos codificantes de las proteínas Factor 1 y Factor 2, fragmentos o variantes descritos anteriormente se utilizan preferentemente en el tratamiento o mejora de la atrofia, hipoplasia, inflamación, daño, lesión, isquemia, daño por reperfusión, inflamación, infección, traumatismo, sobrecarga mecánica, intoxicación, cardiomiopatía primaria o adquirida, preferentemente cardiomiopatía hereditaria y cardiomiopatía causada por mutaciones espontáneas. Las cardiomiopatías son, por ejemplo, aunque sin limitación, cardiomiopatía hipertrófica (CMH o CMOH), cardiomiopatía ventricular derecha arritmogénica (CVDA), miopatía mitocondrial no compactada ventricular aislada, cardiomiopatía dilatada (CMD), cardiomiopatía restrictiva (CMR), cardiomiopatía de Takotsubo, endocarditis de Loeffler, cardiomiopatía diabética, cardiomiopatía alcohólica, cardiomiopatía asociada a obesidad, infarto de miocardio o en la mejora de la función sistólica ventricular izquierda.

30 En un cuarto aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas: para la utilización como un medicamento, en donde dicha composición comprende la proteína para la utilización tal como se define en la presente memoria, y/o el ácido nucleico para la utilización tal como se define en la presente memoria y/o el vector para la utilización tal como se define en la presente memoria, y opcionalmente un portador.

35 La expresión «potenciación de la proliferación y/o curación y/o inhibición de la apoptosis de tejido no transformado o células no transformadas» presenta el significado, y los significados preferentes, definidos anteriormente.

40 El término «portador», tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una sustancia farmacológicamente inactiva, tal como, aunque sin limitación, un diluyente, excipiente, surfactantes, estabilizantes, soluciones o vehículos de tampón fisiológico con los que se administra el ingrediente terapéuticamente activo. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos o sólidos. Entre los portadores líquidos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, líquidos estériles, tales como soluciones salinas en agua y aceites, incluyendo, aunque sin limitación, petróleo, aceites de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuate, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. También pueden utilizarse como portadores líquidos, soluciones salines y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para soluciones inyectables. Una solución salina es un portador preferente en el caso de que la composición farmacéutica se administre por vía intravenosa. Se describen ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences", de E.W. Martin. El portador es preferentemente un excipiente farmacéutico adecuado. Los «excipientes» farmacéuticos adecuados comprenden almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Dichos excipientes farmacéuticos adecuados son, preferentemente, farmacéuticamente aceptables.

45 La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a autorizado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listada en la Farmacopea US u otra farmacopea generalmente reconocida, para la utilización en animales, y más particularmente en seres humanos.

50 El término "composición" pretende incluir la formulación del compuesto activo con material de encapsulado como portador, proporcionando una cápsula en la que el componente activo, con o sin otros portadores, se encuentra circundado por un portador, que de esta manera se encuentra asociado al compuesto activo.

- La expresión «ingrediente activo» se refiere a la sustancia en una composición o formulación farmacéutica que es biológicamente activa, es decir, que proporciona un valor farmacéutico. En el contexto de la invención, el ingrediente activo es una proteína del primer aspecto y/o un ácido nucleico del segundo aspecto y/o un vector del tercer aspecto. Una composición farmacéutica puede comprender uno o más ingredientes activos que pueden actuar conjuntamente, o independientemente unos de otros. El ingrediente activo puede formularse como formas neutras o salinas. La forma salina es preferentemente una sal farmacéuticamente aceptable.
- La expresión «sal farmacéuticamente aceptable» se refiere, por ejemplo, aunque sin limitación, a una sal de los polipéptidos de la presente invención. Entre las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas se incluyen sales de adición de ácido que pueden, por ejemplo, formarse mediante la mezcla de una solución del polipéptido de la presente invención con una solución de un ácido farmacéuticamente aceptable, tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido acético, ácido benzoico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido carbónico o ácido fosfórico. Además, en el caso de que el péptido porte una fracción ácida, entre las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas del mismo se incluyen sales de metal alcalino (por ejemplo sales de sodio o potasio), sales de metal alcalino-térreo (por ejemplo sales de calcio o magnesio) y sales formadas con ligandos orgánicos adecuados (por ejemplo amonio, amonio cuaternario y cationes amina formados utilizando contraiones, tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, sulfonato de alquilo y sulfonato de arilo). Entre los ejemplos ilustrativos de sales farmacéuticamente aceptables se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, acetato, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bisulfato, bitartrato, borato, bromuro, butirato, edetato cálcico, canforato, canforsulfonato, camsilato, carbonato, cloruro, citrato, clavulanato, ciclopentanopropionato, di gluconato, dihidrocloruro, dodecilsulfato, edetato, edisilato, estolato, esilato, etanosulfonato, formato, fumarato, gluceptato, glucoheptonato, gluconato, glutamato, glicerofosfato, glicolilarsanilato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hexilresorcinato, hidrabamina, hidrobromuro, hidrocloruro, hidroyoduro, 2-hidroxi-etanesulfonato, hidroxinaftoato, yoduro, isotionato, lactato, lactobionato, laurato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, metanosulfonato, metilsulfato, mucato, 2-naftalenosulfonato, napsilato, nicotinato, nitrato, sal amónica de N-metilglucamina, oleato, oxalato, pamoato (embonato), palmitato, pantotenato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato/difosfato, picrato, pivalato, poligalacturonato, propionato, salicilato, estearato, sulfato, subacetato, succinato, tanato, tartrato, teoclato, tosilato, trietioduro, undecanoato, valerato, y similares (ver, p. ej., S. M. Berge et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci., 66, páginas 1-19 (1977)).
- El ingrediente activo se administra en una célula, un tejido o un individuo en una cantidad eficaz. Una «cantidad eficaz» es una cantidad de un ingrediente activo suficiente para conseguir el propósito deseado. El ingrediente activo puede ser un agente terapéutico. La cantidad eficaz de un ingrediente activo dado variará con parámetros tales como la naturaleza del ingrediente, la vía de administración, el tamaño y especie del individuo que va a recibir el ingrediente activo, y el propósito de la administración. La cantidad eficaz en cada caso individual puede ser determinada empíricamente por el experto en la materia de acuerdo con métodos establecidos de la técnica. Tal como se utiliza en el contexto de la invención, «administrar» incluye la administración *in vivo* en un individuo, así como la administración directamente en células o tejido *in vitro* o *ex vivo*.
- Las composiciones farmacéuticas: pueden personalizarse para el tratamiento de una enfermedad o trastorno. Tal como se utiliza en la presente memoria, «tratar», «tratando» o «tratamiento» de una enfermedad o trastorno se refiere a llevar a cabo uno o más de lo siguiente: (a) reducir la gravedad del trastorno, (b) limitar o impedir el desarrollo de síntomas característicos del trastorno o trastornos bajo tratamiento, (c) limitar el agravamiento de los síntomas característicos del trastorno o trastornos bajo tratamiento, (d) limitar o impedir la recurrencia del trastorno o trastornos en pacientes que previamente han experimentado el trastorno o trastornos, (e) limitar o impedir la recurrencia de síntomas en pacientes que anteriormente eran sintomáticos para el trastorno o trastornos, (f) reducción de la mortalidad tras la ocurrencia de una enfermedad o un trastorno, (g) curación, y (h) profilaxis de una enfermedad. Tal como se utiliza en la presente memoria, «prevenir», «previniendo», «prevención» o «profilaxis» de una enfermedad o trastorno se refiere a prevenir que dicha enfermedad o trastorno ocurra en el paciente.
- También se da a conocer, pero no forma parte de la invención, un tratamiento con una composición farmacéutica según la invención; la curación comprende el tratamiento de un individuo tras infarto de miocardio y la curación comprende la mejora de la función sistólica ventricular izquierda y puede estar asociada a un incremento de la densidad capilar en la zona marginal del infarto. Además, puede reducir la mortalidad tras un infarto de miocardio. Los métodos que pueden utilizarse para determinar parámetros como la mejora de la función sistólica ventricular izquierda, el incremento de la densidad capilar en la zona marginal del infarto y la reducción de la mortalidad tras un infarto de miocardio son bien conocidos y se describen a título de ejemplo en los Ejemplos 4 a 6.
- La composición farmacéutica contemplada por la presente invención puede formularse de diversas maneras bien conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede encontrarse en forma líquida, tal como en la forma de soluciones, emulsiones o suspensiones. Preferentemente, la composición farmacéutica de la presente invención se formula para la administración parenteral, preferentemente para la administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea, transdérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, intracoronaria o intracardíaca, o la administración a través de membranas mucosas, preferentemente para la administración intravenosa, subcutánea o intraperitoneal. También es posible una preparación para la administración

oral o anal. Preferentemente, la composición farmacéutica de la presente invención se lleva a cabo en la forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o glucosa para que la solución sea isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas deben tamponarse convenientemente (preferentemente a un pH de entre 3 y 9, más preferentemente a un pH de entre 5 y 7), en caso necesario. La composición farmacéutica preferentemente se presenta en forma de dosis unitaria. En dicha forma, la composición farmacéutica se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosis unitaria puede ser una preparación envasada, en donde el envase contiene cantidades discretas de composición farmacéutica, tal como viales o ampollas.

10 La administración de la composición farmacéutica preferentemente se administra por vía intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea, transdérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, intracoronaria o intracardíaca, en donde también están comprendidas otras rutas de administración conocidas de la técnica.

15 En el caso de que la composición farmacéutica se utilice como un tratamiento para un individuo, la utilización de la composición farmacéutica puede sustituir el tratamiento estándar para la enfermedad o condición respectiva o puede administrarse adicionalmente al tratamiento estándar. En el caso de un uso adicional de la composición farmacéutica, la composición farmacéutica puede administrarse antes, simultáneamente o después de una terapia estándar. La terapia estándar puede ser una terapia de reperfusión y la composición farmacéutica puede administrarse antes, simultáneamente o después de la terapia de reperfusión.

20 Resulta adicionalmente preferente que la composición farmacéutica se administre una vez o más de una vez. Lo anterior comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 veces. El periodo de tiempo para la administración de la composición farmacéutica no está limitado. Preferentemente, la administración no excede 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 semanas.

25 Una dosis única de la composición farmacéutica puede administrarse, independientemente de la cantidad total de dosis administradas o el periodo de tiempo respectivo de administración, en forma de una o más inyecciones y/o infusiones de bolo.

30 El primer a cuarto aspectos de la presente invención se basan en la observación de los presentes inventores de que el Factor 1 (y el Factor 2) es una potente molécula proangiogénica *in vitro* e *in vivo*. De acuerdo con lo anterior, las proteínas, ácidos nucleicos y vectores indicados anteriormente también se encuentran contemplados para la utilización *ex vivo*, que puede ser terapéutica, p. ej., para la estimulación *ex vivo* de las células indicada anteriormente o para la utilización en aplicaciones de cultivo celular.

35 Sin embargo, la observación de la actividad proangiogénica de Factor 1 y Factor 2 condujo a los presentes inventores a investigar si el Factor 1 y el Factor 2, respectivamente, son dianas para la terapia antiangiogénica. Los inventores tuvieron éxito en la demostración de que la inhibición del Factor 1 o la inhibición del Factor 2 puede utilizarse para inhibir la angiogénesis.

40 Se utilizan estrategias antiangiogénicas para tratar afecciones cancerosas y otros trastornos, tales como la degeneración macular asociada a la edad, en la que la angiogénesis contribuye a la progresión de la enfermedad (ver, p. ej., Ferrara N y Kerbel RS (2005) *Nature*: 438:967-974 o Potente M, et al. (2011) *Cell*: 146(6):873-887). De acuerdo con lo anterior, se dan a conocer propiedades antiangiogénicas de los inhibidores del Factor 1 y del Factor 2. En estos casos, se aplican igualmente las definiciones proporcionadas anteriormente en el apartado de definiciones. Además, las definiciones específicas proporcionadas en la descripción del primer a cuarto aspectos, así como las realizaciones preferentes, p. ej., del término «vector» y de vectores preferentes también se aplican a los casos siguientes, a menos que el contexto de su uso indique claramente lo contrario.

45 También se da a conocer, aunque no forma parte de la presente invención, un inhibidor de la proteína Factor 1 y/o 2 para el uso médico, preferentemente en el tratamiento o prevención de una enfermedad en la que la angiogénesis contribuye al desarrollo o progresión de la enfermedad. El término «inhibidor» se utiliza ampliamente para referirse a compuestos que interfieren con la actividad proangiogénica del Factor 1 o Factor 2. Un inhibidor puede actuar sobre la transcripción y/o traducción del ARNm codificante del Factor 1 o del Factor 2, impidiendo de esta manera su producción celular y, de esta manera, la secreción a la circulación y/o al sitio de desarrollo o progresión de enfermedad. Un inhibidor también puede actuar uniéndose específicamente a la proteína Factor 1 o Factor 2 o a proteínas celulares a las que se une específicamente la proteína Factor 1 o Factor 2, preferentemente sus receptores celulares. Dicha unión puede impedir o dificultar la interacción natural del Factor 1 o Factor 2 con otras proteínas celulares, preferentemente sus receptores celulares respectivos. El experto en la materia conoce perfectamente cómo interferir con la unión entre un receptor y su agonista, y puede utilizar este conocimiento para diseñar inhibidores adecuados del Factor 1 y del Factor 2. Además, puede derivarse un inhibidor de la proteína Factor 1 o Factor 2 misma mediante delección o mutación de aquellas partes de la proteína Factor 1 o Factor 2, respectivamente, que ejercen la función proangiogénica del Factor 1 o Factor 2. Dicho Factor 1 o Factor 2 inactivo por mutación o delección competirá con el Factor 1 y el Factor 2 de tipo salvaje para sus parejas de unión naturales. Un compuesto que interfiera con la actividad proangiogénica de Factor 1 o Factor 2 reduce la actividad en por lo menos 20 %, preferentemente en por lo menos 30 %, más preferentemente en por lo menos 40 %. En el contexto de inhibidores que se unen específicamente a Factor

1 o Factor 2 o que comprenden, esencialmente consisten, o consisten en mutantes o fragmentos de Factor 1 y Factor 2, respectivamente, resulta preferente que ejerzan este nivel de inhibición de la proteína Factor 1 o la proteína Factor 2 a una concentración equimolar. Un ensayo preferente que puede utilizarse para determinar la inhibición de la actividad proangiogénica se describe en el Ejemplo 10 en la presente memoria. Con el fin de determinar si un inhibidor dado presenta dicha actividad en una cantidad equimolar, deben determinarse las cantidades molares de Factor 1 y 2, respectivamente, y de los inhibidores respectivos. El Factor 1 según la SEC ID nº 1 presenta un peso molecular (PM) de 15,84 kD y el Factor 2 según la SEC ID n.º 3 presenta un PM de 21,57 kD y una IgG presenta un peso molecular aproximado de 150 kD. De esta manera, 100 ng de Factor 1 y 947 ng de IgG específica de Factor 1 son aproximadamente equimolares, y 100 ng de Factor 2 y 695 ng de IgG específica de Factor 2 son aproximadamente equimolares. Resulta evidente de la fig. 12, paneles A y B, respectivamente, que los anticuerpos específicos de Factor 1 y Factor 2 proporcionados en la presente memoria son inhibidores de la proteína Factor 1 o de la proteína Factor 2 en ese sentido. En el contexto de inhibidores que interfieren con la transcripción y/o traducción de ARNm codificante de Factor 1 o Factor 2, el nivel de inhibición se mide preferentemente basándose en la proteína producida en una célula que produce naturalmente Factor 1 o Factor 2. El experto en la materia conocerá perfectamente que puede utilizarse un gran número de métodos para medir las cantidades de ARNm codificante de Factor 1 o Factor 2, así como proteínas Factor 1 o Factor 2, al evaluar la capacidad de un compuesto de interferir con la transcripción y/o traducción de ARNm codificante de Factor 1 o Factor 2. Preferentemente, la proteína Factor 1 comprende, esencialmente consiste, o consiste en la secuencia de aminoácidos según la SEC ID n.º 1 y el Factor 2 comprende, esencialmente consiste, o consiste en la secuencia de aminoácidos según la SEC ID n.º 3 o una variante de la misma, que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80% respecto a SEC ID n.º 1 o 3.

Resulta preferente que el inhibidor dado a conocer en la presente memoria sea una proteína que comprenda, esencialmente consista, o que consista en un fragmento inhibidor o mutante inhibidor de la secuencia de aminoácidos según la SEC ID n.º 1 o 3, o de una variante de la misma que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80 % respecto a la secuencia de aminoácidos según la SEC ID n.º 1 o 3. Es bien conocido de la técnica que las proteínas que ejercen su función mediante interacción proteína-proteína mediante un receptor comprenden dominios que resultan necesarios para la unión al receptor, y dominios que inducen que el receptor transmita una señal al interior de la célula. De esta manera, el experto en la materia conoce perfectamente cómo generar fragmentos o mutantes inhibidores de dichas proteínas de unión a receptor. Por ejemplo, puede generarse una serie de proteínas Factor 1 o Factor 2 truncadas N- y/o C-terminalmente y someterse a ensayo para su actividad proangiogénica en un ensayo tal como se describe en el Ejemplo 2. Aquellos fragmentos que ya no muestren actividad proangiogénica seguidamente se someten a ensayo en un ensayo tal como se describe en el Ejemplo 10, para su capacidad de inhibir la actividad proangiogénica de la proteína Factor 1 o 2. Los mutantes del Factor 1 y del Factor 2 pueden generarse tal como es conocido de la técnica, p. ej., mediante mutagénesis de escaneo de alaninas. En el escaneo de alaninas, se genera una serie de mutantes en la que cada mutante comprende 1, 2, 3 o más aminoácidos, que han sido mutados a alanina (denominados «casetes») y en donde los mutantes difieren en las posiciones de los casetes dentro del Factor 1 o 2. Los mutantes de Factor 1 o 2 que han perdido su actividad proangiogénica nuevamente pueden identificarse tal como se describe en el Ejemplo 2. Los mutantes inhibidores seguidamente pueden identificarse mediante la utilización de un ensayo tal como se describe en el Ejemplo 10.

El inhibidor puede ser un ligando, de unión específicamente a la secuencia de aminoácidos según SEC ID n.º 1 o 3, o de una variante de la misma, que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80 % respecto a la secuencia de aminoácidos según la SEC ID n.º 1 o 3, o respecto al receptor que interactúa naturalmente con el Factor 1 o 3, o una variante de los mismos, que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80 % respecto a la secuencia de aminoácidos según la SEC ID n.º 1 o 3. El término «ligando» tal como se utiliza en la presente memoria puede referirse a una fracción química que se une específicamente al antígeno especificado. Los ligandos preferentes son ligandos basados en aminoácido, como inmunoglobulinas, preferentemente anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y proteínas de tipo anticuerpo. Alternativamente, los ligandos pueden ser peptidomiméticos.

El término «inmunoglobulina (Ig)» se utiliza en la presente memoria para referirse a glucoproteínas que confieren inmunidad de la superfamilia de inmunoglobulinas. Las «inmunoglobulinas de superficie» se unen a la membrana de las células efectoras mediante su región transmembrana y comprenden moléculas tales como, aunque sin limitación, receptores de células B, receptores de células T, proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I y II, microglobulina beta-2 (β 2M), CD3, CD4 y CD8. Habitualmente, el término «anticuerpo» tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a inmunoglobulinas secretadas que carecen de la región transmembranal y pueden, de esta manera, ser liberadas al torrente sanguíneo y cavidades corporales. Los anticuerpos se agrupan en diferentes isótipos basándose en la cadena pesada que posean. Existen cinco tipos de cadena pesada de Ig en el ser humano, denotados por las letras griegas α , δ ϵ , γ y μ . El tipo de cadena pesada presente define la clase de anticuerpo, es decir, estas cadenas se encuentran en los anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, realizando cada uno de ellos diferentes funciones, y dirigiendo la respuesta inmunitaria apropiada contra diferentes tipos de antígeno. Las diferentes cadenas pesadas difieren en tamaño y composición: α y γ comprenden aproximadamente 450 aminoácidos, mientras que μ y ϵ presentan aproximadamente 550 aminoácidos (Janeway et al. (2001) Immunobiology, Garland Science). Los anticuerpos comprenden cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente memoria como HCVR o VH, por sus siglas en inglés) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada cadena

ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente memoria como LCVR o VL, por sus siglas en inglés) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), con regiones intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR, por sus siglas en inglés). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR dispuestos de extremo aminoterminal a extremo carboxiterminal en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las CDR para las cadenas pesada y ligera pueden determinarse tal como es conocido de la técnica. Por ejemplo, puede utilizarse el conjunto de reglas siguiente para encontrar las CDR dentro de una secuencia de cadena ligera y pesada de anticuerpo, respectivamente.

10 CDR-1 de cadena ligera: Inicio: aprox. el residuo 24 antes de CDR-1, siempre una Cys; residuo después de CDR1 siempre un Trp. Normalmente Trp-Tyr-Gln, aunque también, Trp-Leu-Gln, Trp-Phe-Gln, Trp-Tyr-Leu; longitud: 10 a 17 residuos

15 CDR-2 de cadena ligera: Inicio: siempre 16 residuos después del final de L1; los residuos antes generalmente de Ile-Tyr, aunque también, Val-Tyr, Ile-Lys, Ile-Phe; longitud: siempre 7 residuos;

20 CDR-3 de cadena ligera: Inicio: siempre 33 residuos después del final de CDR-2; residuos anteriores siempre Cys; residuos posteriores siempre Phe-Gly-XXX-Gly; longitud: 7 a 11 residuos

25 CDR-1 de cadena pesada: Inicio: aprox. el residuo 26, siempre 4 después de una Cys (basándose en la definición de AbM de Chothia; según la definición de Kabat se inicia 5 residuos después); residuos anteriores siempre Cys-XXX-XXX-XXX; residuos posteriores siempre un Trp. Normalmente Trp-Val, aunque también Trp-Ile, Trp-Ala; longitud: 10 a 12 residuos [definición de AbM, la definición de Chothia excluye los últimos 4 residuos];

30 CDR-2 de cadena pesada: Inicio: siempre 15 residuos después del final de la definición de AbM/Kabat, de CDR-1 de cadena pesada; residuos anteriores: normalmente Leu-Glu-Trp-Ile-Gly, aunque existen variaciones; residuos después de Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala; longitud según definición de Kabat: 16 a 19 residuos (definición según AbM; la definición de Chothia finaliza 7 residuos antes).

35 CDR-3 de cadena pesada: Inicio: siempre 33 residuos después del final de CDR-2 de cadena pesada (siempre 2 residuos aminoácidos después de una Cys); residuos anteriores siempre Cys-XXX-XXX (normalmente Cys-Ala-Arg); residuos posteriores siempre Trp-Gly-XXX-Gly; longitud: 3 a 25 residuos. Este conjunto de reglas es conocido por el experto en la materia y también puede encontrarse en <http://www.bioinf.org.uk/abs/#cdrid>.

40 La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir anticuerpos que presentan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los mAb humanos pueden incluir residuos aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica de sitio in vitro o mediante mutación somática in vivo), por ejemplo en las CDR. Sin embargo, la expresión «anticuerpo humano», tal como se utiliza en la presente memoria, no pretende incluir «anticuerpos humanizados» en el que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero (p. ej., el ratón) han sido injertadas en secuencias de FR humano. Los anticuerpos humanos también incluyen anticuerpos aislados a partir de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas.

45 La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición molecular. Un anticuerpo monoclonal muestra especificidad y afinidad de unión únicas para un epítopo particular. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse con un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano, p. ej., un ratón, fusionado con una célula inmortalizada. La expresión «anticuerpo humano», tal como se utiliza en la presente memoria, incluye todos los anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aislan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (p.ej., un ratón) que es transgénico o transcromosómico con respecto a los genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos, (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, p.ej., de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatorial recombinante, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualesquier otros medios que implican el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina con otras secuencias de ADN. Tal como se utiliza en la presente memoria, un «anticuerpo heterólogo» se define en relación a un organismo transgénico que produce dicho anticuerpo. Dicho término se refiere a un anticuerpo que presenta una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácidos nucleicos codificante que corresponde a la encontrada en un organismo que no consiste en el organismo transgénico, y que se deriva generalmente de una especie diferente del organismo transgénico. Tal como se utiliza en la presente memoria, un «anticuerpo heterohíbrido» se refiere a un anticuerpo que presenta cadenas ligeras y pesadas que se originan en diferentes organismos. Por ejemplo, un anticuerpo que presenta una cadena pesada humana asociada a una cadena ligera humana es un anticuerpo heterohíbrido.

55 La expresión «fragmentos de unión a antígeno» se refiere a fragmentos de un anticuerpo que conservan la función de unión específica a un antígeno o proteína antigénica pero que no presentan algunas o todas las demás características estructurales de un anticuerpo o constructos artificiales que comprenden partes de anticuerpos. Entre los ejemplos preferentes de fragmentos de unión a antígeno se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los siguientes: fragmentos Fab, fragmentos Fc, fragmento Fab', F(ab')₂, anticuerpos de dominio único (sdAb, por sus siglas en

inglés), nanocuerpos, Fv de cadena sencilla, fragmentos variables de cadena sencilla divalente (di-scFv, por sus siglas en inglés), scFv en tandem, diacuerpos, diacuerpos de cadena sencilla (scDB, por sus siglas en inglés), triacuerpos, anticuerpos Bi-específicos acopladores de células T (BiTE, por sus siglas en inglés), o moléculas de redireccionamiento de afinidad dual (moléculas DART, por sus siglas en inglés).

Los «fragmentos Fab» (también denominados «parte Fab» o «región Fab»), cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un «fragmento Fc» residual (también denominado «parte Fc» o «región Fc») cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar con facilidad. La expresión «fragmento Fab», que se refiere a un fragmento Fab que adicionalmente comprende la región bisagra de una molécula de Ig, mientras que «fragmentos F(ab')₂» se entiende que comprende dos fragmentos Fab' unidos químicamente o conectados mediante un enlace disulfuro. Aunque sdAb (Desmyter et al., 1996) y "nanocuerpos" solo comprenden un único dominio V_H, los fragmentos "Fv de cadena sencilla (scFv)" comprenden el dominio variable de cadena pesada unido mediante un péptido conector corto al dominio variable de cadena ligera (Huston et al. 1988). Los di-scFv pueden construirse mediante la unión de scFv (scFvA-scFvB). Lo anterior puede llevarse a cabo mediante la producción de una sola cadena peptídica con dos regiones V_H y dos regiones V_L, rindiendo «scFv en tandem» (V_HA-V_LA-V_HB-V_LB). Otra posibilidad es la creación de scFv con conectores que son excesivamente cortos para que las dos regiones variables se plieguen juntas, forzando a los scFv a dimerizarse. Normalmente se utilizan conectores con una longitud de 5 residuos para generar dichos dímeros. Este tipo se conoce como «diacuerpos». Los conectores todavía más cortos (uno o dos aminoácidos) entre un dominio V_H y un dominio V_L conducen a la formación de trímeros monoespecíficos, denominados «triacuerpos» o «tricuerpos». Los anticuerpos biespecíficos se forman mediante la expresión de dos cadenas con la organización V_HA-V_LB y V_HB-V_LA o V_LA-V_HB y V_LB-V_HA, respectivamente. Los diacuerpos de cadena sencilla (scDb) comprenden un fragmento V_HA-V_LB y un fragmento V_HB-V_LA que se unen mediante un péptido conector (P) de 12 a 20 aminoácidos, preferentemente de 14 aminoácidos, (V_HA-V_LB-P-V_HB-V_LA). Los «anticuerpos Bi-específicos acopladores de células T (BiTE)» son proteínas de fusión que consiste en dos scFv de diferentes anticuerpos, en los que uno de los scFv se une a células T mediante el receptor de CD3 y el otro se une a una célula tumoral mediante una molécula específica tumoral (Kufer et al., 2004). Las moléculas de redireccionamiento de afinidad dual (moléculas «DART») son diacuerpos estabilizados adicionalmente mediante un puente disulfuro C-terminal.

La expresión «proteína de tipo anticuerpo» se refiere a una proteína que presenta propiedades similares a las de un anticuerpo en el aspecto de que se une a un antígeno o proteína antigénica sin necesariamente presentar las características estructurales de un anticuerpo. Las proteínas de tipo anticuerpo pueden existir naturalmente o pueden diseñarse artificialmente, p. ej., mediante biotecnología. Entre los ejemplos de proteínas de tipo anticuerpo naturales se incluyen, aunque sin limitación, proteínas de unión a antígeno, tales como, p. ej., la familia de las lipocalinas, que representa una familia de proteínas diversas que normalmente sirven para el almacenamiento o transporte de compuestos fisiológicamente importantes. Comparten un barril conservado de ocho cadenas β antiparalelas como su motivo de plegamiento central y comprenden en un extremo de esta estructura de barril, seis bucles hipervariables que están conectados a cada par de cadenas β. Dichos bucles forman la entrada al bolsillo de unión. La diversidad estructural entre los miembros de la familia de lipocalinas refleja las diferentes formas y propiedades químicas de su pareja de unión. De esta manera, aunque están compuestas de un única cadena polipeptídica y son de tamaño mucho menor que las inmunoglobulinas, muestran un enorme potencial de unirse a antígenos de diferentes especificidades. Entre los ejemplos de proteína de tipo anticuerpo diseñadas artificialmente se incluyen las proteínas basadas en andamiaje que se generan mediante fusión de péptidos de afinidad conocida para una determinada diana o mediante inserción de dichos péptidos en una proteína de andamiaje para combinar las propiedades de unión del péptido con las características favorables deseadas del portador de andamiaje. El experto en la materia conoce un gran número de tales proteínas basadas en andamiaje. La expresión «proteína de andamiaje» tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una proteína que posee rigidez estructural, es decir, que se pliega en una estructura terciaria estable. Los aminoácidos de una proteína de andamiaje es probable que ocupen una posición tridimensional definida dentro de la proteína de andamiaje. De esta manera, en el caso de que se sustituya uno o más de los aminoácidos de una proteína de andamiaje por un polipéptido de una longitud adecuada, el polipéptido ocupará posiciones similares a las sustituidas. Lo anterior permite situar un polipéptido dado en una ubicación y/u orientación tridimensional definida dentro de la proteína de andamiaje. De acuerdo con lo anterior, pueden utilizarse proteínas de andamiaje como una alternativa a los anticuerpos para el reconocimiento molecular (ver, p. ej., Skerra A.: (2007) Curr. Opin. Biotechnol. 2007, 18:295-304 o Skerra A. (2000) J. Mol. Recognit. 2000, 13:167-187). Un ejemplo de dicha proteína de andamiaje es el dominio SH3 Fyn, que comprende dos dominios que podrían mutarse para transferir nueva especificidad de unión al dominio SH3. Los métodos para seleccionar los dominios SH3 Fyn que se unen específicamente a un antígeno dado se dan a conocer en, p. ej., el documento n.º WO 2000/072742 o en el documento n.º WO 2008/022759.

En el contexto de la presente exposición, el término «peptidomimético» se utiliza para referirse a cualquier molécula cuyos elementos esenciales (farmacóforo) mimeticen un péptido o proteína natural en el espacio 3D y que retengan la capacidad de interactuar con la diana biológica y de producir el mismo efecto biológico. Entre los peptidomiméticos se incluyen cadenas de tipo proteína pequeñas diseñadas para mimetizar un péptido que puede obtenerse normalmente mediante modificación de un péptido existente, o mediante el diseño de sistemas similares que mimetizan péptidos, tales como, p. ej., peptoides y péptidos β. Con independencia del enfoque, la estructura química alterada está diseñada para ajustar las propiedades moleculares ventajosamente en el aspecto de que, p. ej., se incrementa o se reduce la estabilidad o la actividad biológica. Las modificaciones correspondientes implican cambios

en el péptido que no ocurrirá naturalmente, incluyendo, aunque sin limitación, alteraciones del esqueleto y la incorporación de aminoácidos no naturales.

§ Las expresiones «unión específica» o «que se une específicamente» a un antígeno, p. ej., Factor 1 o Factor 2, se refieren a la capacidad de un ligando de unirse a un determinante antigénico de un antígeno con alta afinidad. En ese contexto, «alta afinidad» se refiere a que la K_d para la interacción es inferior a 1×10^{-5} M, preferentemente inferior a 1×10^{-6} M, más preferentemente inferior a 1×10^{-7} , todavía más preferentemente inferior a 1×10^{-8} M y lo más preferentemente, inferior a 1×10^{-9} M.

10 Los anticuerpos preferentes para el uso son anticuerpos monoclonales, preferentemente anticuerpos humanos o humanizados.

15 El inhibidor puede ser un ácido nucleico que inhiba o impida la transcripción y/o traducción de un ARNm codificante de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos según la SEC ID n.º 1 o 3, o de una variante de la misma, que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80 % respecto a la secuencia de aminoácidos según la SEC ID n.º 1 o 3. El experto en la materia conocerá perfectamente cómo determinar la secuencia de dichos ácidos nucleicos basándose en la secuencia genómica codificante de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos según la SEC ID n.º 1 o 3. Un ejemplo de dichos ácidos nucleicos inhibidores son los ARN interferentes pequeños (ARNip) específicos del ARNm codificante de Factor 1 o Factor 2.

20 En aquellos casos en que el inhibidor es una proteína que puede estar codificada por un ácido nucleico, está contemplado que el inhibidor se administra mediante la provisión de un ácido nucleico codificante del inhibidor. De acuerdo con lo anterior, se da a conocer, además, aunque no forma parte de la presente invención, un ácido nucleico codificante del inhibidor tal como se da a conocer en la presente memoria, anteriormente, para la utilización en el tratamiento o la prevención de una enfermedad en la que la angiogénesis contribuye al desarrollo o progresión de la enfermedad. El ácido nucleico puede comprender, además, cualquiera de los elementos descritos en el contexto del segundo aspecto de la presente invención.

25 De acuerdo con lo anterior, se da a conocer, además, aunque no forma parte de la presente invención, un vector que comprende el ácido nucleico tal como se da a conocer en la presente memoria, anteriormente, para la utilización en el tratamiento o la prevención de una enfermedad en la que la angiogénesis contribuye al desarrollo o progresión de la enfermedad. El término «vector» en el presente contexto presenta el mismo significado que el descrito anteriormente.

30 El vector puede ser un vector vírico. Entre los vectores víricos adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados (VVA), vectores alfavíricos, vectores víricos herpes, vectores del virus del sarampión, vectores del virus de la viruela, vectores víricos de la estomatitis vesicular, vectores retrovíricos y vectores lentivíricos. Además, también se da a conocer, aunque no forma parte de la presente invención, una composición farmacéutica que comprende el inhibidor tal como se da a conocer anteriormente en la presente memoria, el ácido nucleico respectivo o el vector respectivo, y opcionalmente un excipiente farmacéutico adecuado, para la utilización en el tratamiento o la prevención de una enfermedad en la que la angiogénesis contribuye al desarrollo o progresión de enfermedades. Dicha composición farmacéutica puede comprender, además, cualquiera de los ingredientes enseñados anteriormente.

35 La expresión «una enfermedad en la que la angiogénesis contribuye al desarrollo o progresión de enfermedad» tal como se utiliza en el contexto anterior se refiere a enfermedades en las que la proliferación de células que forman vasos sanguíneos ocurre al inicio, durante el desarrollo y/o durante la progresión de la enfermedad. Las células que forman vasos sanguíneos y que podrían proliferar incluyen células endoteliales que revisten el interior del vaso sanguíneo y las células de músculo liso que forman la pared del vaso sanguíneo. Ni las células endoteliales ni las células de músculo liso proliferan en un vaso sano. Dichas células proliferan, p. ej., en respuesta a una lesión o estímulos químicos como, p. ej., VEGF. La angiogénesis también se denomina «neovascularización» y caracteriza el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. En algunas enfermedades como las enfermedades de angiogénesis ocular, la formación aberrante de vasos sanguíneos es la causa de la enfermedad y ocurre en algunas enfermedades como los tumores benignos o malignos. La angiogénesis ocurre durante la progresión de la enfermedad y apoya la masa tumoral en crecimiento con oxígeno y nutrientes. En dichas enfermedades, la angiogénesis no es la causa de la enfermedad, pero facilita la progresión de la misma. La neovascularización de tumores malignos también contribuye a la progresión de la enfermedad al proporcionar a las células tumorales una ruta de escape de la masa tumoral, ayudando de esta manera a la metastatización.

40 Preferentemente, la enfermedad en la que la angiogénesis contribuye al desarrollo o progresión de la enfermedad es una enfermedad proliferativa. Las enfermedades proliferativas preferentes se seleccionan del grupo que consiste en tumores benignos, tumores malignos, artritis reumatoide, soriasis, enfermedades de angiogénesis ocular, síndrome de Osier-Webber, neovascularización de placas, injerto y estenosis postangioplastia, telangiectasia, articulaciones hemofílicas, angiofibroma, granulación de heridas, adhesiones intestinales, arterioesclerosis, escleroderma, cicatrices hipertróficas, enfermedad por arañoazo de gato, y úlceras, en particular, degeneración macular, cáncer adrenocortical, cáncer de vejiga, cáncer óseo, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer

colorrectal, cáncer endometrial, cáncer esofágico, cáncer ocular, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer laríngeo, cáncer hepático, cáncer pulmonar, melanoma, trastornos mieloproliferativos, cáncer de cuello, cáncer de piel no melanoma, cáncer ovárico, cáncer de próstata, hiperplasia prostática benigna, cáncer pancreático, cáncer rectal y cáncer testicular. Las enfermedades preferentes que van a tratarse son tumores benignos, tumores malignos y enfermedades de angiogénesis ocular.

Los presentes inventores han identificado que los anticuerpos dirigidos contra determinados epítopos del Factor 1 y Factor 2 interfieren con la función proangiogénica del Factor 1 y el Factor 2, respectivamente, es decir, son anticuerpos antagonistas. De acuerdo con lo anterior, también se da a conocer, aunque no forma parte de la presente invención, ligandos de Factor 1 y Factor 2, respectivamente, que inhiben la actividad proangiogénica del Factor 1 y del Factor 2, respectivamente. Resultan particularmente preferentes los anticuerpos o fragmentos de los mismos que inhiben la actividad proangiogénica del Factor 1 y del Factor 2, respectivamente. Los presentes inventores han podido proporcionar ejemplos de dichos anticuerpos inhibidores mediante la generación de anticuerpos que se unen específicamente a dominios expuestos en superficie de los Factores 1 y 2. Los ligandos que son capaces de unirse específicamente a dichos fragmentos de los Factores 1 y 2, respectivamente, también se dan a conocer. En el contexto del mismo, las definiciones proporcionadas en el apartado de definiciones generales y la definición específica en el presente contexto se aplican del mismo modo.

De acuerdo con lo anterior, también se da a conocer, aunque no forma parte de la invención, un ligando, preferentemente un anticuerpo o fragmento del mismo, o una proteína de tipo anticuerpo que se une específicamente a un epítopo de la proteína Factor 1 comprendida o que consiste en los aminoácidos 61 a 76 de la SEC ID n.º 1 o una región de otra proteína Factor 1 correspondiente a dicho epítopo.

También se da a conocer, aunque no forma parte de la invención, un ligando, preferentemente un anticuerpo o fragmento del mismo, o una proteína de tipo anticuerpo que se une específicamente a un epítopo de la proteína Factor 2 humana comprendida o que consiste en los aminoácidos 181 a 195 de la SEC ID n.º 3 o una región de otra proteína Factor 2 correspondiente a dicho epítopo.

La expresión «región de otra proteína Factor 1 o 2 correspondiente a dicho epítopo» puede referirse a una secuencia de aminoácidos de otra proteína Factor 1 o 2 que se alinea con las secuencias de aminoácidos indicadas del Factor 1 o 2 al utilizar herramientas estándares de alineación como, p. ej., ClustalW, y parámetros estándares, tal como se ha detallado anteriormente. Las figuras 6 a 11 muestran algunas de dichas alineaciones de las proteínas Factor 1 y 2. El experto en la materia podrá identificar fácilmente el segmento de la SEC ID n.º 2 que presenta la secuencia de aminoácidos CTIWRPQGKSYLYFTQ (SEC ID n.º 38) y determinar los aminoácidos correspondientes de otra proteína Factor 1.

Ejemplos

Los Ejemplos están diseñados para ilustrar adicionalmente la presente invención y ayudar a una mejor comprensión de la misma. No deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención en modo alguno.

Ejemplo 1:

En un ensayo clínico multicéntrico controlado con placebo uno de los inventores sometió a ensayo los efectos de la infusión intracoronaria de células de médula ósea autóloga en pacientes con IAM (BOOST-2, n.º de identificación de ensayos controlados ISRCTN17457407). En el ensayo, se obtuvieron aspirados de médula ósea de pacientes de IAM con fines de investigación. Se aislaron células de médula ósea CXCR4⁺ mediante separación celular magnética (MiniMACS™, Miltenyi Biotec). Tras dos etapas posteriores de purificación, se obtuvo una población celular enriquecida en CXCR4⁺ (pureza>95 % según se confirmó mediante citometría de flujo). A continuación, se aisló el ARN a partir de dichas células y se utilizó el ARN en un análisis de micromatrizes (Affymetrix GeneChip HG_U133 Plus 2.0). En un análisis bioinformático posterior, se identificaron las 4000 etiquetas de secuencia expresada (EST, por sus siglas en inglés) que se expresaban más fuertemente en las células de médula ósea CXCR4⁺ en la micromatriz. Se utilizó una serie de herramientas bioinformáticas para identificar factores secretados putativos entre aquellas EST que estaban caracterizadas por un péptido de señal N-terminal, ausencia de péptidos de señal mitocondrial o nuclear, ausencia de una secuencia de retención endoplasmática y ausencia de dominios transmembranales. En total se identificaron 283 factores secretados putativos; se encontró en NCBI Blast que 117 de ellos presentaban un homólogo de ratón. Los ADNc de los homólogos humanos se clonaron en plásmidos de expresión que seguidamente se transfecaron individualmente en células renales embrionarias humanas (HEK, por sus siglas en inglés). Las células HEK transfecadas se cultivaron en medio sin suero a fin de obtener sobrenadantes de cultivo acondicionados tras 30 horas. Los sobrenadantes acondicionados de células HEK se sometieron a ensayo individual para efectos proangiogénicos en ensayos miniaturizados de angiogénesis y efectos citoprotectores en ensayos de muerte celular de cardiomocitos. Este cribado resultó en la identificación de 2 proteínas secretadas: el «Factor 1» mostró efectos proangiogénicos y efectos citoprotectores en los ensayos anteriormente indicados; el «Factor 2» mostró efectos proangiogénicos en los ensayos anteriores.

Las secuencias identificadas en el cribado y los homólogos de ratón o humanos respectivos fueron:

Factor 1:

Se identificó el Factor 1 humano en el cribado y se utilizó en el Ejemplo 2 y en la figura 1:

Marco de lectura abierto 10 del cromosoma 19 de *Homo sapiens* (C19Orf10)

La secuencia de ácido nucleico codificante del Factor 1 humano se encuentra disponible en la secuencia de referencia de NCBI: NM_019107.3 (SEC ID n.º 6). El aminoácido del Factor 1 humano se ilustra en la fig. 6 (SEC ID n.º 2).

Se utilizó el homólogo de ratón en los Ejemplos 3 a 6 y en las figuras 2 a 5:

segmento de ADN de *Mus musculus*, cromosoma 17, Wayne State University 104, expresado (D17Wsu104e). La secuencia de ácidos nucleicos codificante del Factor 1 de ratón se encuentra disponible en la secuencia de referencia de NCBI: NM_080837.2 (SEC ID n.º 7). La secuencia de aminoácidos del Factor 1 de ratón se ilustra en la fig. 6 (SEC ID n.º 13).

Factor 2:

Se identificó el Factor 2 humano en su forma secretada en el cribado y se utilizó en el Ejemplo 2 y en la figura 1:

Marco de lectura abierto 63 del cromosoma 19 de *Homo sapiens* (C19Orf63), transcrita variante HSS1. La secuencia de ácido nucleico codificante del Factor 2 humano se encuentra disponible en la secuencia de referencia de NCBI: NM_175063.4 (SEC ID n.º 8). La secuencia de aminoácidos de la forma secretada del Factor 2 humano se ilustra en la fig. 8 (SEC ID n.º 4).

El Factor 2 humano en sus formas transmembranales:

Marco de lectura abierto 63 del cromosoma 19 de *Homo sapiens* (C19Orf63), transcrita variante HSS1. La secuencia de ácidos nucleicos codificante de la forma transmembranal del Factor 2 humano se encuentra disponible en la secuencia de referencia de NCBI: NM_206538.2 (SEC ID n.º 9). La secuencia de aminoácidos de la forma transmembranal del Factor 2 humano se ilustra en la fig. 10 (SEC ID n.º 5).

La secuencia de aminoácidos de una variante de la forma transmembranal del Factor 2 humano se encuentra disponible en GenBank: AY358710.1 (SEC ID n.º 34).

Se utilizó el homólogo de ratón de la forma secretada en los Ejemplos 4 a 6 y en las figuras 3 a 5: ARNm de péptido secretado 1 que contiene péptido de señal hematopoyético de *Mus musculus* (2310044H10Rik), alternativamente procesado. La secuencia de ácidos nucleicos codificante de la forma transmembranal del Factor 2 de ratón se encuentra disponible en GenBank: AY761096.1 (SEC ID n.º 10). La secuencia de aminoácidos de la forma secretada del Factor 2 de ratón se ilustra en la fig. 8 (SEC ID n.º 24).

El homólogo de ratón de la forma transmembranal:

gen RIKEN de ADNr 2310044H10 de *Mus musculus* (2310044H10Rik). La secuencia de ácidos nucleicos codificante de la forma transmembranal del Factor 2 de ratón se encuentra disponible en la secuencia de referencia de NCBI: NM_197991.2 (SEC ID n.º 11). La secuencia de aminoácidos de la forma transmembranal del Factor 2 de ratón se ilustra en la fig. 10 (SEC ID n.º 29).

Ejemplo 2:

Para confirmar las actividades proangiogénicas observadas en el cribado, se produjeron ambos factores (homólogos humanos codificados por las secuencias de ácidos nucleicos mostradas en las SEC ID n.º 6 y 8) en células COS7 como proteínas recombinantes etiquetadas con His. Tal como se muestra en la figura 1, el Factor 1 recombinante y el Factor 2 recombinante promovieron los efectos proangiogénicos dependientes de la dosis en células endoteliales humanas en cultivo.

Se adquirieron células endoteliales arteriales coronarias humanas (HCAEC, por sus siglas en inglés) y células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC, por sus siglas en inglés) de Provitro (Berlin, Alemania). Las células se cultivaron durante 24 horas en medio mínimo en la ausencia (control) y en presencia de suero de feto bovino al 10 % (FCS, por sus siglas en inglés), VEGF-A recombinante humano (R&D Systems) o diferentes concentraciones de Factor 1 humano recombinante (SEC ID n.º 2) o Factor 2 (SEC ID n.º 4), tal como se indica. (A) Se midió la proliferación de HCAEC mediante incorporación de bromodesoxiuridina. (B) Se evaluó la migración de HCAEC tras lesionar una monocapa confluyente de células endoteliales con una punta de pipeta. (C) Se evaluó la formación de una red de HUVEC en células cultivadas sobre Matrigel reducido en factores de crecimiento. N=3-5 experimentos independientes por condición; *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs. control (ver la figura 1).

Ejemplo 3:

Para confirmar los efectos protectores de cardiomiositos del Factor 1 observados en el cribado, se sometieron cardiomiositos ventriculares de ratas neonatales a lesión por isquemia-reperfusión simulada en la presencia o en ausencia de Factor 1 recombinante. Se produjo Factor 1 (homólogo de ratón codificado por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en la SEC ID n.º 7) en células COS7 como proteínas recombinantes etiquetadas con His. Tal como se muestra en la figura 2, el Factor 1 recombinante promovió efectos antiapoptóticos dependientes de la dosis en cardiomiositos en cultivo.

Se aislaron cardiomiositos ventriculares a partir de ratas Sprague-Dawley de 1 a 3 días de edad mediante centrifugación en gradiente de densidad de Percoll. Se expusieron los cardiomiositos a isquemia simulada durante 180 min (medio sin glucosa que contenía 2-desoxiglucosa en atmósfera de 5 % de CO₂/95 % de N₂) seguido de reperfusión simulada durante 60 min (nuevamente en medio que contenía glucosa en aire en 5 % de CO₂/95 % aire ambiente) en ausencia (control) o en presencia de GDF-15 humano recombinante (R&D Systems, citoquina antiapoptótica conocida) o diferentes concentraciones de Factor 1 de ratón recombinante, tal como se indica. Se evaluó la muerte celular mediante marcaje *in situ* de extremos con dUTP mediado por TdT (TUNEL). N=3 experimentos independientes por condición; *P<0,05 vs. control.

Ejemplo 4:

Para explorar el potencial terapéutico de Factor 1 y Factor 2 en el contexto del IAM, se generaron adenovirus codificantes de homólogos murinos de Factor 1 o Factor 2 (secuencias de ácidos nucleicos mostradas en las SEC ID n.º 7 y 10) y se sometieron a ensayo en un modelo de ratón de IAM. La expresión adenovírica de ambos factores resultó en la mejora de la función sistólica ventricular izquierda 28 días después del infarto. Lo anterior estaba asociado a un incremento de la densidad capilar en la zona marginal del infarto (figura 3).

Se clonaron los ADNc de Factor 1 o Factor 2 de ratón en adenovirus deficientes para la replicación utilizando el sistema de vector AdEasy XL (Stratagene). Como control se utilizó un adenovirus deficiente en replicación codificante de galactosidasa (lacZ). Se purificaron los virus con el kit de purificación de virus Adeno-X (BD Biosciences). Se anestesiaron ratones C57BL/6 macho de 10 a 12 semanas de edad y se ventilaron con isoflurano (al 1-2 %) y sometieron a ligación permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (DAI). Se inyectaron virus (5x10⁹ u.f.p.) en la cavidad ventricular izquierda (VI) inmediatamente después de la ligación DAI. (A) Se evaluó la función sistólica ventricular izquierda (cambio de superficie fraccional, FAC) mediante ecocardiografía transtorácica (Visualsonics) 28 días después de la ligación DAI (N=10-12 ratones por grupo). (B) Se cuantificó la densidad capilar positiva para isolectina en la zona marginal del infarto mediante microscopía fluorescente 28 días después de la ligación DAI (N=3 ratones por grupo). *P<0,05, **P<0,01 vs. control Ad. lacZ

Ejemplo 5:

Para investigar el potencial terapéutico del Factor 1 y del Factor 2 al aplicarlos como proteínas recombinantes en el contexto de IAM reperfundido (mimetizando la situación clínica en pacientes de IAM que reciben terapia de reperfusión), se sometieron ratones C57BL/6 macho de 10 a 12 semanas de edad a ligación coronaria durante 1 hora (isquemia) seguido de reperfusión durante 28 días. Los ratones se trataron s.c. con ambos factores durante los primeros 7 días después de la reperfusión. Se produjo Factor 1 y Factor 2 (homólogos de ratón; secuencias de aminoácidos según las SEC ID n.º 13 y 24) en células HEK293 como proteínas recombinantes etiquetadas con His. El tratamiento con Factor 1 recombinante o Factor 2 recombinante resultó en la mejora significativa de la función sistólica ventricular izquierda 28 días después del infarto. Lo anterior estaba asociado a un incremento significativo de la densidad capilar en la zona marginal del infarto (figura 4).

Se anestesiaron ratones C57BL/6 macho de 10 a 12 semanas de edad y se ventilaron con isoflurano (al 1-2 %) y sometieron a ligación transitoria de la arteria coronaria descendente anterior izquierda durante 1 hora, seguido de reperfusión durante 28 días. Los ratones recibieron una única inyección s.c. de Factor 1 o Factor 2 recombinante (10 µg cada uno) en el momento de la reperfusión (se inyectó PBS en los ratones de control). A lo anterior siguió una infusión s.c. continua durante 7 días de Factor 1 o Factor 2 recombinante utilizando minibombas Alzet (10 µg/día). Los ratones de control recibieron una infusión de PBS. (A) Se evaluó la función sistólica ventricular izquierda (cambio de superficie fraccional, FAC) mediante ecocardiografía transtorácica 28 días después de la reperfusión (N=10-13 ratones por grupo). (B) Se cuantificó la densidad capilar positiva para isolectina en la zona marginal del infarto mediante microscopía fluorescente 28 días después de la reperfusión (N=6 ratones por grupo). *P<0,05, **P<0,01 vs. control de PBS.

Ejemplo 6:

Para investigar si el Factor 1 o el Factor 2, al aplicarlos como proteínas recombinantes, pueden potenciar la supervivencia tras IAM reperfundido, los ratones fueron sometidos a ligación coronaria durante 1 hora seguido de reperfusión durante 28 días. Los ratones se trataron s.c. con ambos factores durante los primeros 7 días después de la reperfusión. Se produjo Factor 1 y Factor 2 (homólogos de ratón; SEC ID n.º 7 y 10) en células HEK293 como proteínas recombinantes etiquetadas con His. El tratamiento con Factor 1 recombinante o Factor 2 recombinante resultó en la mejora significativa de la supervivencia durante los primeros 28 días después del infarto (figura 5).

Se anestesiaron ratones C57BL/6 macho de 10 a 12 semanas de edad y se ventilaron con isoflurano (al 1-2 %) y sometieron a ligación transitoria de la arteria coronaria descendente anterior izquierda durante 1 hora, seguido de reperfusión durante 28 días. Los ratones recibieron una única inyección s.c. de Factor 1 o Factor 2 recombinante (10 µg cada uno) en el momento de la reperfusión (se inyectó PBS en los ratones de control). A lo anterior siguió una infusión s.c. continua durante 7 días de Factor 1 recombinante o

Factor 2 recombinante utilizando minibombas Alzet (10 µg/día). Los ratones de control recibieron una infusión de PBS. Se realizó una inspección diaria de los ratones durante 28 días para evaluar la supervivencia postinfarto. N=29 ratones tratados con PBS; N=25 ratones tratados con Factor 1; N=15 ratones tratados con Factor 2.

Ejemplo 7:

Se identificaron secuencias homólogas de la proteína codificada por C19Orf10 humano con el algoritmo BLASTP en http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome. SEC ID nº 2 sirvió de matriz.

Los parámetros utilizados eran los parámetros por defecto: 11 Extensión: 1, ajustes composicionales=un ajuste de matriz de puntuaciones composicionales condicionadas junto con la base de datos de secuencias de proteína no redundantes (nr).

A partir de las secuencias identificadas, se seleccionaron ejemplos de diferentes especies de vertebrado, principalmente de mamífero, aunque también se seleccionó un ejemplo de anfibio, de ave y de pez. Las secuencias respectivas se enumeran en la Tabla 1.

Las secuencias de aminoácidos seleccionadas se alinearon utilizando el algoritmo CLUSTAW2 en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. Los parámetros respectivos utilizados fueron los parámetros por defecto: tipo de alineación=lenta, matriz de pesos de proteína=Gonnet, apertura de hueco=10, extensión de hueco=0,20, distancias de hueco=5, ningún hueco terminal=no; Opciones de salida: formato=AIn con números, Orden=alineado. Las múltiples alineaciones obtenidas se muestran en la figura 6 para todas las secuencias, y en la figura 7, para las secuencias de mamífero.

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos homólogas del Factor 1 humano identificado con el algoritmo BLASTP. La secuencia de *Homo sapiens* sirvió de matriz.

Nº de acceso	Origen	Puntuación total	Cobertura de búsqueda	Max. ident.	SEC ID nº
NP_061980.1	<i>Homo sapiens</i>	359	100 %	100 %	2
EHH29500.1	<i>Macaca mulatta</i>	357	100 %	99 %	12
NP_543027.1	<i>Mus musculus</i>	280	100 %	84 %	13
NP_001001164.1	<i>Bos taurus</i>	305	100 %	89 %	14
XP_003421710.1	<i>Loxodonta africana</i>	296	100 %	87 %	15
EHB15128.1	<i>Heterocephalus glaber</i>	294	100 %	87 %	16
AES10565.1	<i>Mustela putorius furo</i>	289	100 %	91 %	17
NP_001006342.1	<i>Gallus gallus</i>	209	100 %	60 %	18
XP_003440079.1	<i>Oreochromis niloticus</i>	185	100 %	53 %	19
NP_001093679.1	<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	182	91 %	55 %	20

Ejemplo 8:

Se buscaron secuencias de homólogos de la proteína codificada por la variante de corte y empalme HSS1 de C19Orf63 humano con el algoritmo BLASTP en http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome. SEC ID nº 4 sirvió de matriz.

Los parámetros utilizados eran los parámetros por defecto: 11 Extensión: 1, ajustes composicionales=un ajuste de matriz de puntuaciones composicionales condicionadas junto con la base de datos de secuencias de proteína no redundantes (nr).

A partir de las secuencias identificadas, se seleccionaron ejemplos de diferentes especies de vertebrado, principalmente de mamífero, aunque también se seleccionó una secuencia de anfibio y una de pez. Las secuencias respectivas se enumeran en la Tabla 2.

Las secuencias de aminoácidos seleccionadas se alinearon utilizando el algoritmo CLUSTAW2 en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. Los parámetros respectivos utilizados fueron los parámetros por defecto: tipo de alineación=lenta, matriz de pesos de proteína=Gonnet, apertura de hueco=10, extensión de hueco=0,20, distancias de hueco=5, ningún hueco terminal=no; Opciones de salida: formato=AIn con números, Orden=alineado. Las múltiples alineaciones obtenidas se muestran en la figura 8 para todas las secuencias, y en la figura 9, para las secuencias de mamífero.

10 Tabla 2: secuencias de aminoácidos homólogas de la forma secretada del Factor 2 humano identificado con el algoritmo BLASTP. La secuencia de *Homo sapiens* sirvió de matriz.

Nº de acceso	Origen	Puntuación total	Cobertura de búsqueda	Max. ident.	SEC ID nº
NP_778233.4	<i>Homo sapiens</i>	511	100 %	100 %	4
AFE66256.1	<i>Macaca mulatta</i>	503	100 %	98 %	21
XP_003465531.1	<i>Cavia porcellus</i>	434	100 %	91 %	22
XP_863321.1	<i>Canis lupus familiaris</i>	427	100 %	91 %	23
AAV30544.1	<i>Mus musculus</i>	401	93 %	86 %	24
XP_001494158.1	<i>Equus caballus</i>	429	100 %	95 %	25
AAI41719.1	<i>Xenopus laevis</i>	275	89 %	61 %	26
NP_001157390.1	<i>Danio rerio</i>	233	80 %	55 %	27

Ejemplo 9:

15 Se buscaron secuencias de homólogos de la proteína codificada por la variante de corte y empalme HSS1 de C19Orf63 humano con el algoritmo BLASTP en http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome. SEC ID nº 5 sirvió de matriz.

20 Los parámetros utilizados fueron los parámetros por defecto: 11 Extensión: 1, ajustes composicionales=un ajuste de matriz de puntuaciones composicionales condicionadas junto con la base de datos de secuencias de proteína no redundantes (nr).

25 A partir de las secuencias identificadas, se seleccionaron ejemplos de diferentes especies de vertebrado, principalmente de mamífero, aunque también se seleccionó una secuencia de anfibio y una de pez. Las secuencias respectivas se enumeran en la Tabla 3.

30 Las secuencias de aminoácidos seleccionadas se alinearon utilizando el algoritmo CLUSTAW2 en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. Los parámetros respectivos utilizados fueron los parámetros por defecto: tipo de alineación=lenta, matriz de pesos de proteína=Gonnet, apertura de hueco=10, extensión de hueco=0,20, distancias de hueco=5, ningún hueco terminal=no; Opciones de salida: formato=AIn con números, Orden=alineado. Las múltiples alineaciones obtenidas se muestran en la figura 10 para todas las secuencias, y en la figura 11, para las secuencias de mamífero.

35 Tabla 3: secuencias de aminoácidos homólogas de la forma transmembranal del Factor 2 humano identificado con el algoritmo BLASTP. La secuencia de *Homo sapiens* sirvió de matriz.

Nº de acceso	Origen	Puntuación total	Cobertura de búsqueda	Max. ident.	SEC ID nº
NP_996261.1	<i>Homo sapiens</i>	527	100 %	100 %	5
XP_001173798.1	<i>Pan troglodytes</i>	520	100 %	99 %	28
AAH20179.1	<i>Mus musculus</i>	421	93 %	87 %	29
EHB05689.1	<i>Heterocephalus glaber</i>	426	93 %	92 %	30
XP_003406885.1	<i>Loxodonta africana</i>	380	93 %	92 %	31
NP_988902.1	<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	310	89 %	64 %	32
NP_001157390.1	<i>Danio rerio</i>	223	77 %	54 %	33

Ejemplo 10:

40 Se cultivaron células endoteliales arteriales coronarias humanas (HCAEC, de Provitro) en matraces T75 en medio EGM-2 (Lonza) complementado con FCS al 10 % (Biochrom). Se utilizaron las células de los pases 3 a 6. Antes de la estimulación con diversos agentes, las células se cultivaron durante la noche en MCDB131 (Life Technologies) que contenía FCS al 2 %. A continuación, se sembraron HCAEC en placas de 96 pocillos (5×10^3 células por pocillo) y se

estimularon con Factor 1 humano recombinante, Factor 2 humano recombinante o VEGF (control positivo) en la presencia o en ausencia de diferentes concentraciones de anticuerpo de conejo anti-Factor 1, anticuerpo de conejo anti-Factor 2, o IgG de control durante 16 h. Los anticuerpos fueron generados por Eurogentec y se generaron contra polipéptidos que contenían el Factor 1 humano (CTIWRPQGKSYLYFTQ, SEC ID n.º 38, es decir, los aminoácidos 61 a 76 de SEC ID n.º 1) o Factor 2 (CEQAQKAKNPQEKSF; SEC ID n.º 39, es decir, los aminoácidos 181 a 195 de SEC ID n.º 3 más una Cys N-terminal). Se midió la proliferación celular con un inmunoensayo colorimétrico de incorporación de BrdU (Roche). Los datos se presentan en la figura 12 (panel A: Factor 1; panel B: Factor 2; los datos son de medias ± SEM de 3 a 6 experimentos).

REIVINDICACIONES

1. Proteína que comprende la secuencia de aminoácidos según la SEC ID nº 1, o un fragmento o una variante de la misma, para la utilización como un medicamento, en la que el fragmento o variante (i) presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la SEC ID n.º 1, en toda la longitud de la SEC ID n.º 1, y en la que el fragmento o variante (ii) muestra potencial antiapoptótico y protege las células o tejidos frente a la muerte celular apoptótica, en donde el potencial antiapoptótico es por lo menos 50 % del potencial apoptótico de la proteína con la secuencia de aminoácidos según la SEC ID n.º 1.
2. Proteína o el fragmento o variante para la utilización según la reivindicación 1, en donde el medicamento está destinado a la utilización en:
 - (i) el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en atrofia, hipoplasia, daño, lesión, isquemia, preferentemente isquemia del corazón, daño por reperfusión, preferentemente daño por reperfusión del corazón, traumatismo, sobrecarga mecánica, intoxicación, cirugía, cardiomiopatía primaria o adquirida, disfunción contráctil postisquémica, infarto de miocardio, preferentemente infarto agudo de miocardio, angina de pecho, insuficiencia cardíaca, inflamación del corazón y trastorno del músculo esquelético, en donde el trastorno del músculo esquelético se selecciona del grupo que consiste en distrofia muscular, debilidad muscular, atrofia muscular, miositis, enfermedad del núcleo central, miopatía nemalínica (bastones), miopatía centronuclear, miopatía miotubular, miopatía miotubular centronuclear, oftalmoplejía ocular y miopatía mitocondrial,
 - (ii) la mejora de la función sistólica ventricular izquierda tras infarto de miocardio, o
 - (iii) la protección de los cardiomiositos frente a la apoptosis en un paciente.
3. Proteína para la utilización según la reivindicación 1 o 2, en la que la proteína comprende la SEC ID n.º 2 o un fragmento de la SEC ID nº 2 que presenta una delección de hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 30 aminoácidos, preferentemente en la que la delección se encuentra en el extremo N-terminal.
4. Proteína para la utilización según la reivindicación 1 o 2, en la que la proteína comprende la SEC ID n.º 1.
5. Proteína para la utilización según la reivindicación 1 o 2, en la que la proteína consiste en la SEC ID n.º 1.
6. Proteína o el fragmento o variante para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el medicamento está destinado a la utilización en el tratamiento de la cardiomiopatía primaria, preferentemente la cardiomiopatía hereditaria o la cardiomiopatía causada por mutaciones espontáneas.
7. Proteína o el fragmento o variante para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o un fragmento o una variante del mismo, para la utilización en el tratamiento de cardiomiopatía adquirida, preferentemente cardiomiopatía isquémica causada por enfermedades arteriales coronarias, ateroescleróticas o de otro tipo, cardiomiopatía causada por infección o intoxicación del miocardio, enfermedad cardíaca hipertensiva causada por hipertensión arterial pulmonar y/o hipertensión arterial y enfermedades de las válvulas cardíacas.
8. Proteína o el fragmento o variante para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la cardiomiopatía se selecciona del grupo que consiste en cardiomiopatía hipertrófica (HCM o HOCM), cardiomiopatía ventricular derecha arritmogénica (ARVC), miopatía mitocondrial no compactada ventricular aislada, cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiomiopatía restrictiva (RCM), cardiomiopatía de Takotsubo, endocarditis de Loeffler, cardiomiopatía diabética, cardiomiopatía alcohólica o cardiomiopatía asociada a obesidad.
9. Ácido nucleico codificante de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos según la SEC ID nº 1, o un fragmento o una variante de la misma, para la utilización como un medicamento, en la que el fragmento o variante (i) presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a SEC ID n.º 1 en toda la longitud de SEC ID n.º 1, y en la que el fragmento o variante (ii) muestra potencial antiapoptótico y protege las células o tejidos frente a la muerte celular apoptótica, en donde el potencial antiapoptótico es por lo menos 50 % del potencial apoptótico de la proteína con la secuencia de aminoácidos según la SEC ID n.º 1.
10. Vector que comprende un ácido nucleico codificante de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos según la SEC ID nº 1, o un fragmento o una variante de la misma, para la utilización como un medicamento, en el que el fragmento o variante (i) presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a SEC ID n.º 1 en toda la longitud de la SEC ID n.º 1, y en el que el fragmento o variante (ii) muestra potencial antiapoptótico y protege las células o tejidos frente a la muerte celular apoptótica, en donde el potencial

antiapoptótico es por lo menos 50 % del potencial apoptótico de la proteína con la secuencia de aminoácidos según la SEC ID n.º 1.

11. Composición farmacéutica para la utilización como un medicamento, comprendiendo dicha composición:
 - (i) la proteína o el fragmento o variante según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8,
 - (ii) el ácido nucleico según se define en la reivindicación 9, o
 - (iii) el vector según se define en la reivindicación 10, y
- 10 optionalmente un excipiente farmacéutico adecuado.
12. Composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 11, en la que dicha composición farmacéutica está formulada para la administración por vía oral, intravenosa, intramucosa, intraarterial intramuscular o intracoronaria.
13. Composición farmacéutica para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, formulada para la administración antes, simultáneamente o después de una terapia de reperfusión.
14. Composición farmacéutica para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, en la que la administración se lleva a cabo mediante una o más inyecciones y/o infusiones de bolo.

Figura 1

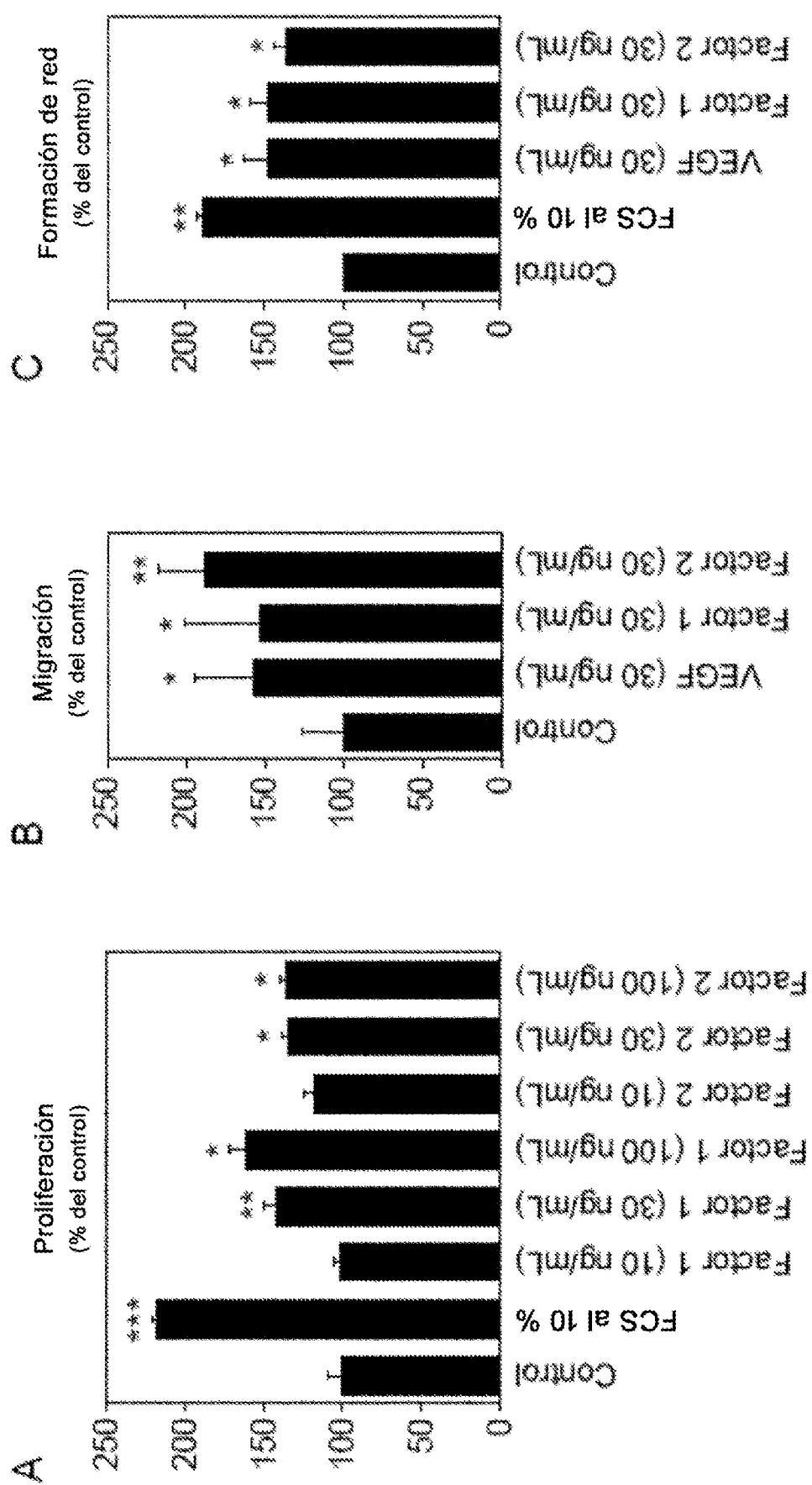


Figura 2

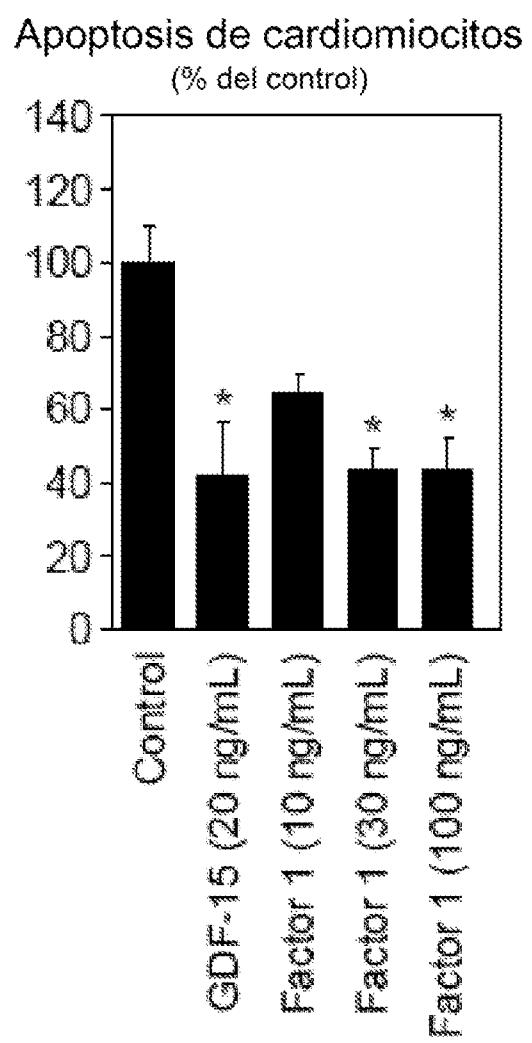


Figura 3

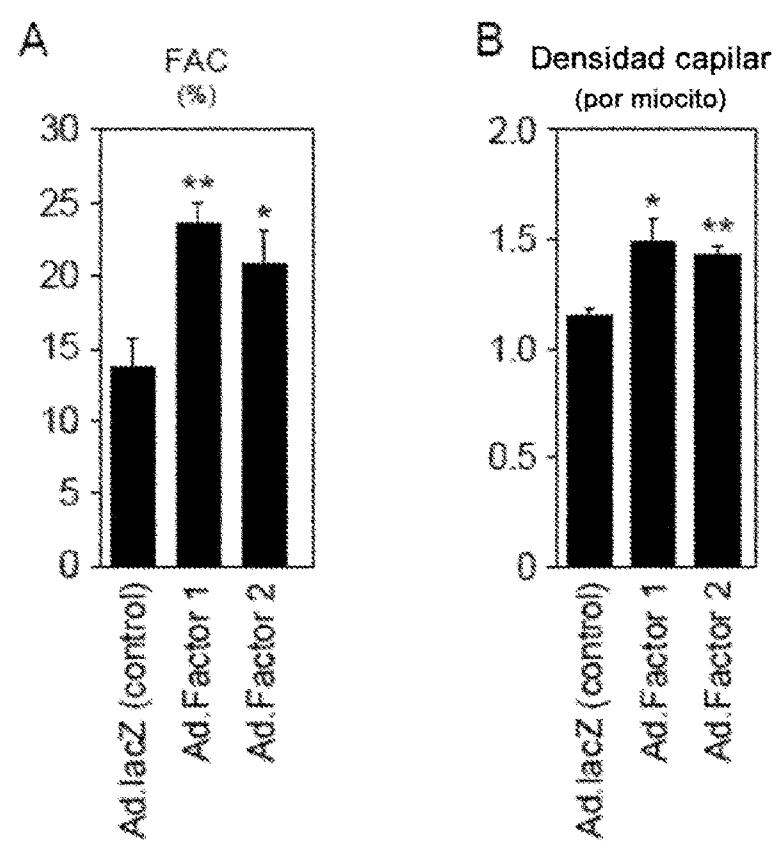


Figura 4

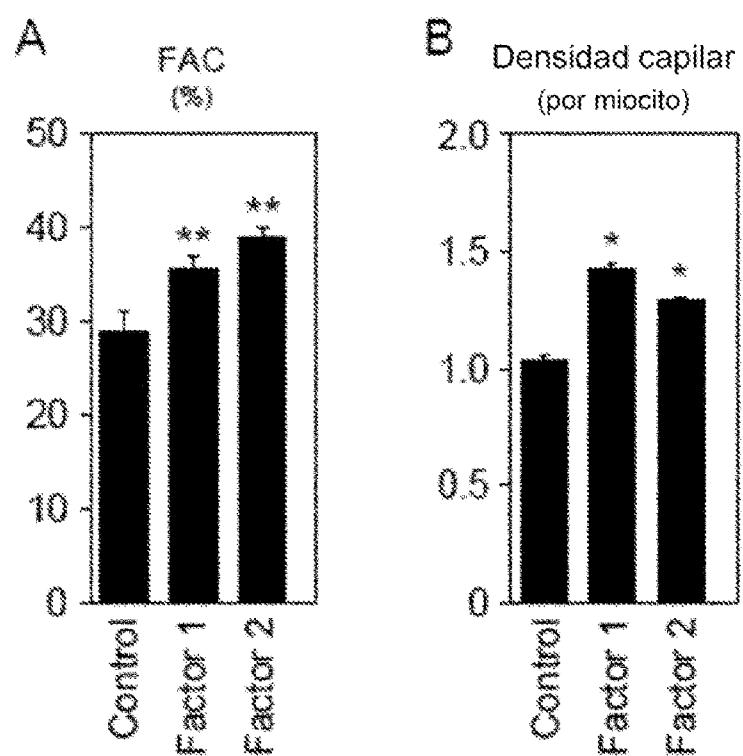


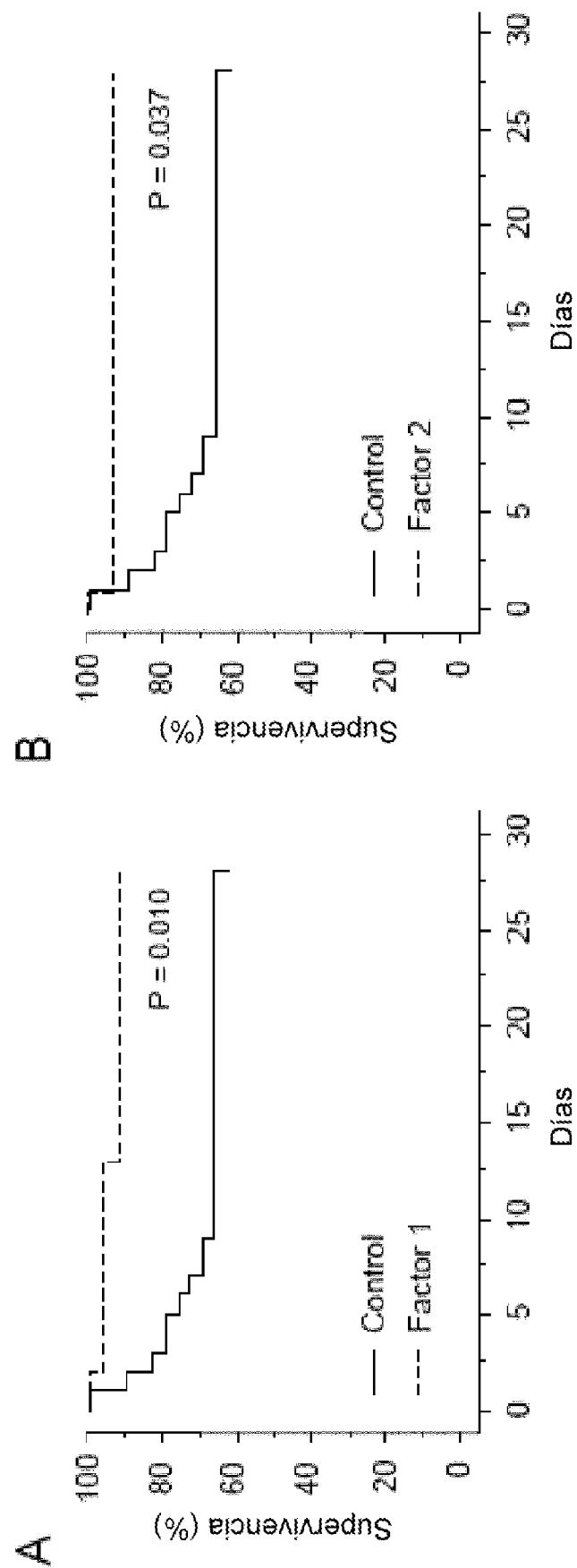
Figura 5

Figura 6

CLUSTAL 2.1 alineación de múltiples secuencias

SEQ_ID_NO_2	MAAPSGGUNG-VGASLWAALLLGAVALRPAEAVSEPTTVAFDVRPGGVVHSFSHNVCPGD	59
SEQ_ID_NO_12	MAAPSGGUNG-VGASLWAALLLGAVALSFAEAVSEPTTVAFDVRPGGVVHSFSHNVCPGD	59
SEQ_ID_NO_14	MAAPSGRRNGSGGANLWWSLLAALALRPVETVSEPTTVAFDVRPGGVVHSFSQNVCPGD	60
SEQ_ID_NO_17	MAAPSERRNG-GGASLWAALLLAALALRPAAEVSEPTTVAFDVRPGGVVHSFSQNVCPGD	59
SEQ_ID_NO_15	MAAPRGRRNGSAGASMNGALLLAAVALRSVEAVSEPTTVAFDVRPGGVVHSFSHSAAGPD	60
SEQ_ID_NO_16	MAAPRGNSDG-CGGAWFAALLLAAVALRPAEAVSEPTTVAFDVRPGGVVHSFSQNVCPGD	59
SEQ_ID_NO_13	MAAPS-----GGFWTAVVLAAAALKLAAAVSEPTTVPFDVRPGGVVHSFSQDVCPGD	52
SEQ_ID_NO_18	MAAPCGRSSR----WLWAAAVPAAVLCIARAAEEASTAEFDVRPGGEVHFFSRSLG---	53
SEQ_ID_NO_20	MATYG-----IICAFLLLAVCS---AQEKSSSTEEDVRPGGLQHSFTSKLG---	44
SEQ_ID_NO_19	NARQSNTCAAG--WLAFLFALALIAARVPAEASEEQAFTVEFNVKPGGVVHTFSEGIG---	55
	** : * . : . . . * * ; * ; *** * * ; * :	
SEQ_ID_NO_2	KYTCMFTYASQGGTNEQUQMSLGTSEDHQHFTCTIWRPQCKSYLYFTQFKAEVRGAEIEY	119
SEQ_ID_NO_12	KYTCMFTYASQGGTNEQUQMSLGTSEDHQHFTCTIWRPQCKSYLYFTQFKAEVRGAEIEY	119
SEQ_ID_NO_14	KYTCVFTYASQGGTNEKUQMSLGTSEDHQHFTCTIWRPQCKSYLYFTQFKAEVRGAEIEY	120
SEQ_ID_NO_17	KYTCAFTYASQGGTNEKUQMSLGISEDHQHFTCTIWEFQGKSYLYFTQFRAEVRGAEIEY	119
SEQ_ID_NO_15	RFTCTFTYASQGGTNEQUQMSLGTSEDHQHFTCTIWRPQCKSYLYFTQFKAEVRGAQIEY	120
SEQ_ID_NO_16	KFTCTFTYASQGGTNEQUQMSLGTSEDHQHFTCTIWRPQCKSYLYFTQFKAEVHGAEIEY	119
SEQ_ID_NO_13	KFTCTFTYASQGGTNEQUQMSLGTSEDQHFTCTIWRPQCKSYLYFTQFKAELRGAEIEY	112
SEQ_ID_NO_18	DYTCTFTYAAQGGTNEQUQMNIGVSEDMILLFSCSVWRPQCKSYLFFTQFKAEVKGAKIEY	113
SEQ_ID_NO_20	DYACTFTYAAQGGTNEQUQMNIGVSEDMILLFSCSVWRPQCKSYLFFTQFKAEVTGGKIEF	104
SEQ_ID_NO_19	EYECSTFTYASQGGTNEQUILNSVGLTDDMRLFSCSVWRPQCKSYLFFTQFKAEKGTKIEY	115
	: * ***; :*****; * . : * : * ; * : *****; * ; * ; * : * ;	
SEQ_ID_NO_2	AMAYSKAAFEPESDVPLKTEEFEVTKTAVAHRGAFKAELSKLVIVAKASRTEL	173
SEQ_ID_NO_12	AMAYSKAAFEPESDVPLKTEEFEVTKTAVAHRGAFKAELSKLVIVAKASRTEL	173
SEQ_ID_NO_14	GMAYSKAAFEKESDVPLKNEEFEVTKTAVHRPGAFKAELSKLVIVAKASRTEL	174
SEQ_ID_NO_17	GMAYSKAAFEKESDVPLKSEEFEVTKTAVHRPGAFKAELSKLVIVAKASRTEL	173
SEQ_ID_NO_15	GMAYSKAAASERE3DVPLKSEEFEVTKTAVHRPGAFKAELSKLVIVAKASHSEL	174
SEQ_ID_NO_16	AMAYSKAAFEPESDVPLKNETFEVTKTAVSHRGAFKAELSKLVIVAKAEHSEL	173
SEQ_ID_NO_13	AMAYSKAAFEPESDVPLKSEEFEVTKTAVSHRGAFKAEELSKLVIWAKAARSEL	166
SEQ_ID_NO_18	AMAYSQAAVCAQSDIPLKQEEFEITETTVSHREGKFRFELLSKLMIVAKTPHDEL	167
SEQ_ID_NO_20	SEAYSQASSDGSSDVKLESSEYDVTDNWVSHRGPSFSSSLCKLVLVARSEHDEL	158
SEQ_ID_NO_19	ANAYSQSAAGGQSDVPLKPEEFTIGESTVTHDGKFSAQLSKLTVIGRTQKDEL	169
	. ***; : ** . *; : . . * *; * * . *; : . . ; : **	

Figura 7

CLUSTAL 2.1 alineación de múltiples secuencias

SEQ_ID_NO_2	MAAPSGGWNG-VGASLWAALLLGAVALRPAEAVSEPTTVAFDVRPGGVVHSFSHNVCVD 59
SEQ_ID_NO_12	MAAFSGGWNG-VGASLWAALLLGAVALSFAEAVSEPTTVAFDVRPGGVVHSFSHNVCVD 59
SEQ_ID_NO_15	MAAPRGRCRNGSAGASMNGALLAAVALRSVEAVSEPTTVAFDVRPGGVVHSFSHSAGCVD 60
SEQ_ID_NO_16	MAAPRCNSDG-CGGANFAALLAAVALRPAEAVSEPTTVAFDVRPGGVVHSFSQNVCVD 59
SEQ_ID_NO_14	MAAPSGRRNGSGGANLWVSLLLAAAALRPVETVSEPTTVAFDVRPGGVVHSFSQNVCVD 60
SEQ_ID_NO_17	MAAFSERRNC-GGASLWAALLAAAALRPAEAVSEPTTVAFDVRPGGVVHSFSQNVCVD 59
SEQ_ID_NO_13	MAAPS-----GGFWTAVVLAAAALKLAAAAYSEPTTVPFDVRPGGVVHSFSQDVCPGN 52 ***** . : : ; * . ** . : *****.*****:..***;
SEQ_ID_NO_2	KYTCMFTYASQGGTNEQQQMSLGTSEDHQHFTCTIWRPQGKSYLYFTQFKAEVRGAEIEY 119
SEQ_ID_NO_12	KYTCMFTYASQGGTNEQQQMSLGTSEDHQHFTCTIWRPQGKSYLYFTQFKAEVRGAEIEY 119
SEQ_ID_NO_15	RFTCTFTYASQGGTNEQQQMSLGTSEDHQHFTCTIWRPQGKSYLYFTQFKAEVRGAEIEY 120
SEQ_ID_NO_16	KFTCTFTYASQGGTNEQQQMSLGTSEDHQHFTCTIWRPQGKSYLYFTQFKAEVHGAEIEY 119
SEQ_ID_NO_14	KYTCVFTYASQGGTNEKQQMSLGTSEDHQHFTCTIWRPQGKSYLYFTQFKAEVRGAEIEY 120
SEQ_ID_NO_17	KYTCFTTYASQGGTNEKQQMSLGTSEDHQHFTCTIWRPQGKSYLYFTQFRAEVRGAEIEY 119
SEQ_ID_NO_13	KFTCTFTYASQGGTNEQQQMSLGTSEDHQHFTCTIWRPQGKSYLYFTQFKAELRGAEIEY 112 ; ; *** *****:***** *** *** ***** *****:***;***;***;***
SEQ_ID_NO_2	AMAYSKAAFERESDVPLKTEEFEVTKTAVAHRGAFKAELSKLVIVAKASRTTEL 173
SEQ_ID_NO_12	AMAYSKAAFERESDVPLKTEEFEVTKTAVAHRGAFKAELSKLVIVAKASRTTEL 173
SEQ_ID_NO_15	GMAYSKAASERESDVPLKNEEFEVTKTAVAHRGAFKAELSKLVIVAKASHSEL 174
SEQ_ID_NO_16	AMAYSKAAFERESDVPLKNEEFEVTKAAVAHRGAFRAELSKLVIVAKEAHSEL 173
SEQ_ID_NO_14	GMAYSKAAFERESDVPLKNEEFEVTKTAVFHRPGAFKAELSKLVIVAKATRSEL 174
SEQ_ID_NO_17	GMAYSKAAFERESDVPLKSEEFEVTKTAVSHRGAFKAELSKLVIVAKASRSEL 173
SEQ_ID_NO_13	AMAYSKAAFERESDVPLKSEEFEVTKTAVSHRGAFKAELSKLVIVAKAARSEL 166 .***** *;*****,*;*****:;* *****:*****:***** :;:***

Figura 8

CLUSTAL 2.1 alineación de múltiples secuencias

SEQ_ID_NO_4	-----MAAASAGAT-RLLLLLMAVAAPSRARGSGCRAFTGARGAGAEGREGEACGTVGLL	55
SEQ_ID_NO_21	-----MAATSGGAT-RLLLLLMAVAAPSRARGSGCRAFTGARGAGAEGREGEACGTVGLL	55
SEQ_ID_NO_25	-----MAAAACAGAT-RLLLLLMAAAAPSRARGSGCRAFTGARGAGAEGREGEACGTVGLL	55
SEQ_ID_NO_23	-----MAAAGAVVT-RLFLLLMAAAAPSRARGSGCRAFTGAGAEGREGEACGTVGLL	55
SEQ_ID_NO_22	-----MAAACAGAP-RLLLLLIVAAAPSRARGSSCRAFTGAGAEGREGEACGTVGLL	55
SEQ_ID_NO_24	-----MVAAGAGVY-RLLVLLMVAAAPSRARGSGCRAFTGAGAEGREGEACGTVGALL	55
SEQ_ID_NO_26	GGQRAGPLSSIVTGNCWVWIALFFLAVTAQGSVCRLKTG-----DGRSE3CGTN-LE	53
SEQ_ID_NO_27	-----MAPIEVLS---LVL PILSTVFLLTQFGEUNNGRRS----GDAVNTDFSGFS-VP	47
	: : * : : : * : : : : * : :	
SEQ_ID_NO_4	LEHSFEIDD SANFRKRGSL LUN-QQDGTL SLSQRQLSEEERGR LRDVAALNGLYRVRIPR	114
SEQ_ID_NO_21	LEHSFEIDD SANFRKRGSL LUN-QQDGTL SLSQRQLSEEERGR LRDVAALNGLYRVRVPR	114
SEQ_ID_NO_25	LEHSFEIDD SANFRKRGSL LUN-QQDGTL SLSQRQLSEEERGR LRDVAALNGLYRVRVPR	114
SEQ_ID_NO_23	LEHSFEIDD SAHFPRKRGSL LUN-QQDGTL SLSQRQLSEEERGR LRDVAALNGLYRVRVPQ	114
SEQ_ID_NO_22	LEHSFEIDD TAQFRKRGSL LUN-QQDGTL SLSQRQLSEEERGR LRDVAALNGLYRVRVPR	114
SEQ_ID_NO_24	LEHSFELGDGANFQKRGLL LUN-QQDGTL SATQRQLSEEERGR LRDVAAVNGLYRVRVPR	114
SEQ_ID_NO_26	LEHSFELDDSIHFTKRGSL FWSGTAEQSISI LQKQLTEDERWKL RDIAANLNGLYRIRIPR	113
SEQ_ID_NO_27	LEHSFEVDDVFRFRLRGALQFRGGREMSVYLSQNQLSEKDRNLKDVAAVDGLYRIRVPR	107
	*****:.* .* ** * : : : : * .**.*.;*. *;*;* ;:****;*:":	
SEQ_ID_NO_4	R---PGALDGLEAGGYVSS FVPACSLV ESHLSDQ LTLHVDVAGNVVGVSVVTHPGGC RGH	171
SEQ_ID_NO_21	R---PGALDGLEAGGYVSS FVPACSLV ESHLSDQ LTLHVDVAGNVVGVSVVTHPGGC RGH	171
SEQ_ID_NO_25	R---PGTPDGLEAGGYVSS FVPACSLV ESHLSDQ LTLHVDVAGNVVGVSVVTHPGGC RGH	171
SEQ_ID_NO_23	R---PGVPDGAEAGGYVSS FVPACSLV ESHLSDQ LTLHVDVAGNVVGVSVVTHPGGC RGH	171
SEQ_ID_NO_22	R---PGALDSAEAGGYVSS FVPACSLV ESHLSDQ LTLHVDVAGNVVGVSVVTHPGGC RGH	171
SEQ_ID_NO_24	R---PGTLDGSEAGGHVSS FVPACSLV ESHLSDQ LTLHVDVAGNVVGLSVVVYPGGCRGS	171
SEQ_ID_NO_26	K---LGITE--EANEYVTS FVRACSMV ESHLSD EITVHTDL SGNVIGSIVTFPGSCNGA	168
SEQ_ID_NO_27	VSLQWDROTERQYEGYLTA FVRACALV ESHLSD VITLHDVSGYVICISIVTIPGSCRG	167
	: : : : * * : : * * * * ; * : * : * * : * : * ; * , * , *	
SEQ_ID_NO_4	EVED-VD LEL FNT SVQL QPPTA FG PETA AFIER LEME QAQ KAK NPQE QKS FF A KYW HII	230
SEQ_ID_NO_21	EVED-VD LEL FNT SVQL QPPTA FG PETA AFIER LEME QAQ KAK NPQE QKS FF A KYW HII	230
SEQ_ID_NO_25	EVED-VD LEL FNT SVQL QPPTA FG PETA AFIER LEME QAQ KAK NPQE QKS FF A KYW HLI	230
SEQ_ID_NO_23	EVED-VD LEL FNT SVHL QPPTA FG PETA AFIER LEME QAQ KAK NPQE QKS FF A KYW HLV	230
SEQ_ID_NO_22	EVED-VD LEL FNT SVRL RPP GTAP G PETA AFIER LEME QAQ KAK NPQE QKS FF A KYW HLI	230
SEQ_ID_NO_24	EVED-ED LEL FNT SVQL RPP STAP G PETA AFIER LEME QAQ KAK NPQE QKS FF A KYW HLI	230
SEQ_ID_NO_26	EVED-VD LEM FNT TIVHM QUP IPA AVPETA AFIER LEME QAQ KAK NPQE QKS FF A KYW M YI	227
SEQ_ID_NO_27	EVEDEV D LEV FNT TIVM A PVT APV PETA PY IER MEMEMEMEKKGKNPQE QKS FF A KYW YLI	227
	***** ***;***: : * .* . ****;***;*** ;* .*****:***** :	
SEQ_ID_NO_4	LGGAVL LTALR PAAPGP APPP QEA----- 254	
SEQ_ID_NO_21	LGGAVL LTALR PAAPGP APPP QEA----- 254	
SEQ_ID_NO_25	LGGAVL LTALR PAAPGP APPP QEA----- 254	
SEQ_ID_NO_23	LGGAVL LTALR PAAPGP PTFF QEA----- 254	
SEQ_ID_NO_22	LGGAVL LTALR PAAPGP PTFF QEA----- 254	
SEQ_ID_NO_24	LGGAVL LTALR PAAPGP PAPTEA----- 254	
SEQ_ID_NO_26	IPVVLFLMMGASDAGNOGGNGGGGGGGGR----- 256	
SEQ_ID_NO_27	LGGAVFLMATSQAQT PPGCAREQS----- 251	
	: . : * . : . .	

Figura 9

CLUSTAL 2.1 alineación de múltiples secuencias

SEQ_ID_NO_4	MAAASACATRLLLMAVAAPSARGSGCRAFTGARGAGAEGREGEACGTVGLLLEHsf	60
SEQ_ID_NO_21	MAATSCGATRLLLMAVAAPSARGSGCRAFTGARGAGAEGREGEACGTVGLLLEHsf	60
SEQ_ID_NO_25	MAAAAGAGATRLLLMAAAAPSARGSGCRPGTAARGAGAEGREGECCGPVGLLLEHsf	60
SEQ_ID_NO_23	MAAAAGAVVTRFLFLLMAAAAPSARGSGCRSGAALRGAGAEGRESEGCCTVGLLLEHsf	60
SEQ_ID_NO_22	MAAAAGAGAFRLLLTLVAAAPSFARGSSCRAGAAATRGVGAEGREGE3CGTVGLLEHsf	60
SEQ_ID_NO_24	MVAAGAGVTRLLVLLMVAAPSFARGSGCRVGASARGTGA0GREAEGCCTVALLLEHsf	60
	,;... . . #*:;***:.,*****:****, ** :. **.**:#**,*.*,**,*.*****	
SEQ_ID_NO_4	EIDDSANFRKRGSLUNQDGTLSLSQRQLSEEERGRRLRDVAALNGLYRVRVPERRGALD	120
SEQ_ID_NO_21	EIDDSANFRKRGSLUNQDGTLSLSQRQLSEEERGRRLRDVAALNGLYRVRVPERRGALD	120
SEQ_ID_NO_25	EIDDNAHFRKRGSLUNQDGTLSLSQRQLSEEERGRRLRDVAALNGLYRVRVPERRGTPD	120
SEQ_ID_NO_23	EIDDSAHFRKRGSLUNQDGTLSLSQRQLMEEEERGRRLRDVAALNGLYRVRVPQRPGVPD	120
SEQ_ID_NO_22	EIDDTAQFRKRGSLUNQDGTLSLSQRQLMEEEERGRLEDVAALNGLYRVRVPFEPGALD	120
SEQ_ID_NO_24	ELGDGANFQKRGLLLWNQDGTLSATQRQLSEEERGRLPDVAAVNGLYRVRVPFEPGTLD	120
	;, *;*:**** *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****,*	
SEQ_ID_NO_4	GLEAGGYVSSFVPACSLVESHLDQLTLHVDVAGNWWGVSVVTHPGGCRGHEVEDVDLEL	180
SEQ_ID_NO_21	GLEASGYVSSFVPACSLVESHLDQLTLHVDVAGNWWGVSVVTHPGGCRGHEVEDVDLEL	180
SEQ_ID_NO_25	GLEAGCYVSSFVPACSLVESHLDQLTLHVDVAGNWWGVSVVTHPGGCRGHEVEDVDLEL	180
SEQ_ID_NO_23	GAEAGGYVSSFVPACSLVESHLDQLTLHVDVAGNWWGVSVVTHPGGCRGHEVEDVDLEL	180
SEQ_ID_NO_22	SAEAGGYVSSFVPACSLVESHLDQLTLHVDVAGNWWGVSVVTHPGGCRGHEVEDVDLEL	180
SEQ_ID_NO_24	GSEAGGHVSSFVPACSLVESHLDQLTLHVDVAGNWWGLSVVVYPGGCRGSEVEDEDLEL	180
	* **,*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
SEQ_ID_NO_4	FNTSVQLQPPTTAPGPETAAFIERLEMEQAQKAKNPQEOKSFFAKYWHILGGAVLITAL	240
SEQ_ID_NO_21	FNTSVQLQPPTTAPGPETAAFIERLEMEQAQKAKNPQEOKSFFAKYWHILGGAVLITAL	240
SEQ_ID_NO_25	FNTSVQLQPFVTAPGPETAAFIERLEMEQAQKAKNPQEOKSFFAKYWHILGGAVLITAL	240
SEQ_ID_NO_23	FNTSVHLUPPATAPGPETAAFIERLEMEQAQKAKNPQEOKSFFAKYWHVLGGAVLITAL	240
SEQ_ID_NO_22	FNTSVLERPPGTAPGPETAAFIERLEMEQAQKAKNPQEOKSFFAKYWHLGGAVLITAL	240
SEQ_ID_NO_24	FNTSVQLRPPSTAPGPETAAFIERLEMEQAQKAKNPQEOKSFFAKYWHLGGAVLITAL	240
	*****:;*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
SEQ_ID_NO_4	RPAAPGPAPPPQEA 254	
SEQ_ID_NO_21	RPAAPGPAPPPQEA 254	
SEQ_ID_NO_25	RPAAPGPAPPPQEA 254	
SEQ_ID_NO_23	RPAAPGPPTPPPQEA 254	
SEQ_ID_NO_22	RPAAPGPPTPPPQEA 254	
SEQ_ID_NO_24	RPAAPGPAPAPTEA 254	
	*****:;*,* ***	

Figura 10

CLUSTAL 2.1 alineación de múltiples secuencias

SEQ_ID_NO_5 --MAA-----ASAGATRL--LLLLLMAVAAPSRARGSGCRA GTGARGAGAE GREGEAC 49
 SEQ_ID_NO_28 --MAA-----ASAGATRL--LLLLLMAVAAPSRARGSSCRA GTGARGAGAE GREGEAC 49
 SEQ_ID_NO_31 --MAA-----AGAGATRL--LLLLLMAAAAPSRARGSSCRA GAATRGAGAE GREMEGC 49
 SEQ_ID_NO_30 MVMAA-----SCASA3RL--LLLLLIVAAAPSRARGSGCRA GAAAARCVGAE GRECESC 51
 SEQ_ID_NO_29 --MVA-----AGAGVTRL--LVLLLIVAAAPSRARGSGCRVGASARGTGA DGREAEGCC 49
 SEQ_ID_NO_32 --MAAGCLVQQRAGFLSDKLSGYCUWLLPPLLWATAQAQSVCRLKTG-----DGHDSESC 52
 SEQ_ID_NO_33 --MAP-----IRVLSLVLPISTVPLLTQFGE CNNGPR-----GDAVTDYFS 42
 *.. :: :: :: . *. . . : .

 SEQ_ID_NO_5 GTVGLLLEHSFEIDD SANFRKRGSSLWN-QQDGTLSQLSQRQLSEEERGRLPDVAALNGLY 108
 SEQ_ID_NO_28 GTVGLLLEHSFEIDD SANFRKRGSSLWN-QQDGTLSQLSQRQLSEEERGRLPDVAALNGLY 108
 SEQ_ID_NO_31 GTVGLLLEHSFEIDDAAHFRKRGSSLWN-QQDGTLSPSQ RQLSEEERGRLPDVAALNGLY 108
 SEQ_ID_NO_30 GTVGLLLEHSFEIDDAAHFRKRGSSLWN-QQDGTLSPSQ RQLSEEERGRLPDVAALNGLY 110
 SEQ_ID_NO_29 GTVALLLEHSFELGDGANFQURKRGSSLWN-QQDGTLSATQRQLSEEERGRLPDVAAVMGLY 108
 SEQ_ID_NO_32 GTM-LLEHSFELDDSTHF KRGSSLWNSGTAEQSISI LQKQLTEDERNKL RDIANLNGLY 111
 SEQ_ID_NO_33 GFS-VPLEHSFEVDVPRFRLRGALQFRGGRENSVYLSQNQLSEKD PNTLKDVAAVDGLY 101
 * : *****: * .*: **: * : : : : *.*:*.:. *. *;*: * : :****

 SEQ_ID_NO_5 RVRI PRR---PGALDGLEAGGYVSSFVACSLVESHLS DQLTLHVDVAGNVVGVS VVTHP 165
 SEQ_ID_NO_26 RVRI PRR---PGALDGLEAGGYVSSFVACSLVESHLS DQLTLHVDVAGNVVGVS VVTQP 165
 SEQ_ID_NO_31 RVRV PRR---PGAFEGPEAGGYVSSFVACSLVESHLS DQLTLHVDVAGNVVGVS VVTLP 165
 SEQ_ID_NO_30 RVRV PRR---PGALDSSEAGGYVSSFVACSLVESHLS DQLTLHVDVAGNVVGVS VVTDP 167
 SEQ_ID_NO_29 RVRV PRR---FGTLDGSEAGGHVSSFVACSLVESHLS DQLTLHVDVAGNVVGLS VVTYP 165
 SEQ_ID_NO_32 RIRV PRK---LGITE--EANEYVTSFVRACSMVESHLS DQISVHTDISGMVVGISIVTIP 166
 SEQ_ID_NO_33 RIRV PRVSLQVDRQTERQYEGYLTA FVRACALVESHLS DVLTHTDVSGYVIGISIVTIP 161
 ;:*** . : : : : : *;*:***:***** : : : . * : *;*:*** . *;

 SEQ_ID_NO_5 GGCRCHEVED-VDLELFNTSVQLQPPTTAPGPETAA FIERLEMEQAQKAKNPQE QKSFFA 224
 SEQ_ID_NO_28 GGCRCHEVED-VDLELFNTSVQLQPPTTAPGPETAA FIERLEMEQAQKAKNPQE QKSFFA 224
 SEQ_ID_NO_31 GGCRCGYEVED-VDLELFNTTVQLQPPTTAPGPETAA FIERLEMEQAQKAKNPQE QKSFFA 224
 SEQ_ID_NO_30 GGCRCHEVED-VDLELFNTSVQLQPPTTAPGPETAA FIERLEMEQAQKAKNPQE QKSFFA 226
 SEQ_ID_NO_29 GGCRCGSEVED-EDLELFNTSVQLRPPSTAPGPETAA FIERLEMEQAQKAKNPQE QKSFFA 224
 SEQ_ID_NO_32 GSCNGAEVED-VDLEMFTNTVYICQPIAAAVPETAA FIERLEMEQAQKAKNPQE QKSFFA 225
 SEQ_ID_NO_33 GSCRCGIEVEDEVDLEVFNTTISVMAPVTAPVPETAPYIERMEMEMEMEKKGKMPQE QKSFFA 221
 ..** **** *;*.**: : * ;*. ****. :****:**** ;*,*****

 SEQ_ID_NO_5 KYWMYIIIPVWLFLMMGAPDTGGQGGGGGGGGGGGGGGR 262
 SEQ_ID_NO_28 KYWMYIIIPVWLFLMMGAPDTGGQGGGGGGGGGGGGGGR 262
 SEQ_ID_NO_31 KYWMYIIIPVWLFLMMGAPDTGGQGGGGGGGGGGGGGGR 262
 SEQ_ID_NO_30 KYWMYIIIPVWLFLMMGAPDTGGQGGGGGGGGGGGGGGR----- 258
 SEQ_ID_NO_29 KYWMYIIIPVWLFLMMGAPDTGGQGGGGGGGGGGGGR----- 258
 SEQ_ID_NO_32 KYWMYIIIPVWLFLMMGASDAGMGGGGGGGGGGGGGGR 263
 SEQ_ID_NO_33 KYWYLILGGAVFLMATSSAUTP-FGGAREQS----- 251
 *** .: .:*** .: .: .: ** .:

Figura 11

CLUSTAL 2.1 alineación de múltiples secuencias

SEQ_ID_NO_5 --MAAASAGATRLLL LLLMAVAAPSARSGCRAFTGARGAGAEGREGEACTVGLLLEH 58
 SEQ_ID_NO_28 --MAAASAGATRLLL LLLMAVAAPSARSGCRAFTGARGAGAEGREGEACTVGLLLEH 58
 SEQ_ID_NO_31 --MAAACAGATRLLL LLLMAAAAPSARSGCRAFTGARGAGAEGREMEGGCTVGLLLEH 58
 SEQ_ID_NO_30 MVAASGASASRLLL LLLIVAAAPSARSGCRAFTGARGAGAEGREGESCTVGLLLEH 60
 SEQ_ID_NO_29 --MVAAGAGVTRLLVLLLMVAAPSRARSGCRAFTGARGAGAEGREGEACTVGLLLEH 58
 ..*...****;***;..*****.**.*.;**.**;*** *,*,**,*

 SEQ_ID_NO_5 SFEIDD SANFRKRGSSLUNQDGTLSL5QRQLSEERGRRLFDVAALNGLYRVRIPRRPGA 118
 SEQ_ID_NO_28 SFEIDD SANFRKRGSSLUNQDGTLSL5QRQLSEERGRRLFDVAALNGLYRVRIPRRPGA 118
 SEQ_ID_NO_31 SFEIDD AMHFRKRGSSLUNQDGTLSL5QRQLSEERGRRLRDVAALNGLYRVRVPRRPGA 118
 SEQ_ID_NO_30 SFEIDD AAMHFRKRGSSLUNQDGTLSL5QRQLSEERGRRLRDVAALNGLYRVRVPRRPGA 120
 SEQ_ID_NO_29 SFELGD GANFQKRGSSLUNQDGTLSATQBLSEERGRRLRDVAAVNGLYRVRVPRRPGT 118
 .*. ;*:**;*****;*****;*****;*****;*****;

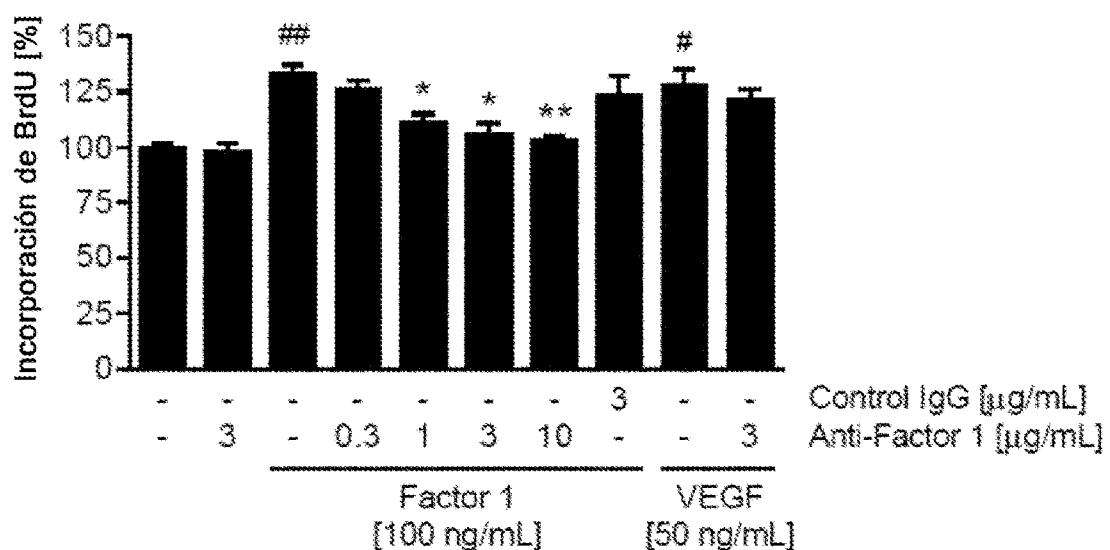
 SEQ_ID_NO_5 LDGLEAGGYVSSFVACSLVESHLSDQITLHVDWAGNVVGVSVTHPGGCRGHEVEDVDL 178
 SEQ_ID_NO_28 LDGLEAGGYVSSFVACSLVESHLSDQITLHVDWAGNVVGVSVTPQPGGCRGHEVEDVDL 178
 SEQ_ID_NO_31 PEGPEAGGYVSSFVACSLVESHLSDQITLHVDWVGNVVGVSVTLPGGCRGHEVEDVDL 178
 SEQ_ID_NO_30 LDSSEAGGYVSSFVACSLVESHLSDQITLHVDWAGNVVGVSVTDPGGCRGHEVEDVDL 160
 SEQ_ID_NO_29 LDGSEAGGHVSSFVACSLVE SHLSDQITLHVDWAGNVVGLSVVYPGGCRGSEVEDEDL 178
 :. ****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****

 SEQ_ID_NO_5 ELFNTSVQLQPPTTAPGPETAAFIERLEMEQAQKAKNPQEQKSFFAKYUWYIIPVVLFLM 238
 SEQ_ID_NO_28 ELFNTSVQLQPPTTAPGPETAAFIERLEMEQAQKAKNPQEQKSFFAKYUWYIIPVVLFLM 238
 SEQ_ID_NO_31 ELFNTTVQLQPPTTAPGPETAAFIERLEMEQAQKAKNPQEQKSFFAKYUWYIIPVVLFLM 238
 SEQ_ID_NO_30 ELFNTSVQLQPPTTAPGPETAAFIERLEMEQAQKAKNPQEQKSFFAKYUWYIIPVVLFLM 240
 SEQ_ID_NO_29 ELFNTSVQLRPPSTAPGPETAAFIERLEMEQAQKAKNPQEQKSFFAKYUWYIIPVVLFLM 238
 .*.** **;*****;*****;*****;*****;*****;*****

 SEQ_ID_NO_5 MSGAPDTGGQQGGGGGGGGGGSGR 262
 SEQ_ID_NO_28 MSGAPDTGGQQGGGGGGGGGGGGSGR 262
 SEQ_ID_NO_31 MSGAPDTGGQQGGGGGGGGGGGGSGR 262
 SEQ_ID_NO_30 MSGAPDAGCQGGGGGGGGR----- 258
 SEQ_ID_NO_29 MSGAPDAGCQGGGGGGGGSGR----- 258
 *****-*****

Figura 12

A



B

