

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 822 924**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2015** **PCT/KR2015/010240**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2016** **WO16048105**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2015** **E 15843739 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2020** **EP 3199182**

54 Título: **Composición para prevenir o tratar una enfermedad arterial periférica utilizando el factor de crecimiento de hepatocitos y el factor 1 α derivado de células del estroma**

30 Prioridad:

26.09.2014 KR 20140129361

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.05.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

JEONG, JAE-GYUN;
LEE, JUNG HUN y
LEE, NAYEON

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 822 924 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición para prevenir o tratar una enfermedad arterial periférica utilizando el factor de crecimiento de hepatocitos y el factor 1 α derivado de células del estroma

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad arterial periférica, comprendiendo la composición: como principios activos, un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF; del inglés, hepatocyte growth factor) o una isoforma del mismo y un factor 1 α derivado de células del estroma (SDF-1 α); o polinucleótidos que codifican las proteínas.

10

Antecedentes de la técnica

La presente solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la solicitud de patente coreana N.º 10-2014-0129361 presentada en la Oficina de Propiedad Intelectual de Corea el 26 de septiembre de 2014. El estrechamiento u oclusión de los vasos sanguíneos debido a aterosclerosis o similar, causa las enfermedades cardiovasculares. Las enfermedades cardiovasculares se dividen en gran parte en la enfermedad arterial coronaria (EAC; en inglés, CAD) y la enfermedad arterial periférica (EAP; en inglés, PAD). Entre estas, la enfermedad isquémica de las extremidades es un tipo representativo de las enfermedades arteriales periféricas.

20

Hasta ahora, la utilización de fármacos para expandir los vasos sanguíneos o las operaciones quirúrgicas representan la mayoría del tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, en el caso de una enfermedad isquémica de las extremidades, el dolor provocado por el deterioro del cuerpo es tan fuerte que algunos pacientes toman un analgésico antipsicótico y si el deterioro corporal empeora, se amputan las piernas del paciente o los pacientes mueren. Por tanto, se necesita un tratamiento fundamental para ello.

25

Por otra parte, los vectores de expresión como sistemas de suministro de genes para terapia génica se describen en el documento WO 2000/040737. Además, el documento WO 2003/078568 desvela los efectos terapéuticos para la enfermedad isquémica de las extremidades posteriores utilizando el gen HGF.

30

Majka *et al.* (Folia histochemica et cytobiologica 44,3 (2006): 155-164) se refieren al SDF-1 solo y en cooperación con HGF, que regula la biología de las células de carcinoma cervical humano. Murohara *et al.* (Journal of cardiology 53,2 (2009): 155-163) se refiere a un tejido adiposo autólogo como una nueva fuente de células progenitoras para la angiogénesis terapéutica. El documento US 2013/095060 A1 se refiere a una composición farmacéutica para promover la angiogénesis y a un método de preparación y aplicaciones para la misma. El documento WO 2012/170495 A1 se refiere a métodos para reparar el daño tisular utilizando mutaciones resistentes a proteasas del factor-1 derivado de células del estroma. El documento WO 2012/027170 A1 se refiere a métodos para reparar el daño tisular utilizando mutantes resistentes a proteasas del factor-1 derivado de células del estroma. El documento WO 03/078568 A2 se refiere a un gen del factor de crecimiento de hepatocitos híbrido que tiene una eficacia de expresión elevada de dos heterotipos del factor de crecimiento de hepatocitos.

35

40

Descripción detallada de la invención**Problema técnico**

45

Los presentes inventores investigaron y se esforzaron en desarrollar fármacos capaces de prevenir o tratar una enfermedad arterial periférica. Como resultado, los presentes inventores verificaron que la utilización de: un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) o una isoforma del mismo y un factor 1 α derivado de células del estroma (SDF-1 α); o polinucleótidos que codifican las proteínas, en combinación, tienen un efecto terapéutico notable sobre una enfermedad arterial periférica respecto a la utilización individual de HGF, SDF-1 α o polinucleótidos que codifican las proteínas de los mismos y por tanto se completó la presente invención.

50

Por tanto, un aspecto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para utilizar en la prevención o tratamiento de una enfermedad arterial periférica.

55

Otro aspecto descrito en el presente documento es proporcionar un método para prevenir o tratar una enfermedad arterial periférica.

Otros propósitos y ventajas de la presente invención serán más obvios con la siguiente descripción detallada de la invención, las reivindicaciones y los dibujos.

60

Solución técnica

La invención proporciona una composición farmacéutica para utilizar en la prevención o tratamiento de una enfermedad arterial periférica (EAP), la composición farmacéutica que comprende: como principios activos, (a) un

65

factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) o una isoforma del mismo y un factor 1 α derivado de células del estroma (SDF-1 α); o (b) un polinucleótido que codifica HGF o una isoforma del mismo y un polinucleótido que codifica SDF-1 α .

Los presentes inventores investigaron y se esforzaron en desarrollar fármacos capaces de prevenir o tratar una enfermedad arterial periférica. Como resultado, los presentes inventores verificaron que la utilización de: un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) o una isoforma del mismo y un factor 1 α derivado de células del estroma (SDF-1 α); o polinucleótidos que codifican las proteínas, en combinación, tienen un efecto terapéutico notable sobre una enfermedad arterial periférica respecto a la utilización individual de HGF, SDF-1 α o polinucleótidos que codifican las proteínas de los mismos.

La estrategia terapéutica descrita en el presente documento se puede clasificar en gran medida dentro de dos grupos: terapia de proteínas y terapia génica. De acuerdo con la estrategia del agente terapéutico de proteínas descrita en el presente documento, se utilizan en combinación la proteína HGF o una isoforma de la misma y la proteína SDF-1 α . Por otra parte, de acuerdo con la estrategia de agente terapéutico génico descrita en el presente documento, se administran al menos una secuencia de nucleótidos que codifica HGF y al menos una secuencia de nucleótidos que codifica SDF-1 α . Al menos una secuencia de nucleótidos que codifica HGF y al menos una secuencia de nucleótidos que codifica SDF-1 α se podrían proporcionar como un nucleótido o polinucleótidos separados. Al menos una secuencia de nucleótidos que codifica HGF y al menos una secuencia de nucleótidos que codifica SDF-1 α se podrían proporcionar como polinucleótidos separados.

En adelante, la presente invención se describirá en detalle.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "isoforma de HGF" se refiere a un polipéptido de HGF que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a una secuencia de aminoácidos de HGF de origen natural en un animal, incluyendo todas las variantes alélicas. Por ejemplo, la expresión "isoforma de HGF" tiene un significado que incluye todos los de una forma normal o un tipo silvestre de HGF y diversos variantes de HGF (por ejemplo, variantes de corte y empalme y variantes de supresión).

Como se utiliza en el presente documento, el término "prevención" se refiere a todos los actos de supresión de una enfermedad arterial periférica o de retraso del progreso de una enfermedad arterial periférica mediante la administración de la composición descrita en el presente documento.

Como se utiliza en el presente documento, el término "tratamiento" se refiere a (a) la supresión del desarrollo de una enfermedad arterial periférica; (b) alivio de una enfermedad arterial periférica; y (c) eliminación de una enfermedad arterial periférica.

El HGF descrito en el presente documento puede incluir una proteína HGF humana recombinante. El HGF puede incluir la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

La isoforma del HGF puede incluir el HGF de longitud completa (flHGF) y el HGF variante suprimido (dHGF).

Como se utiliza en el presente documento, el término "flHGF" se puede referir a una secuencia de aminoácidos 1-728 de HGF animal; una secuencia de aminoácidos 1-728 de HGF de mamífero; o una secuencia de aminoácidos 1-728 de HGF humano.

Como se utiliza en el presente documento, el término "dHGF" se refiere a una variante suprimida de la proteína HGF producida por corte y empalme alternativo del gen HGF animal; y el gen HGF de mamífero. El dHGF descrito en el presente documento se refiere a HGF humano compuesto por 723 aminoácidos con la supresión de cinco aminoácidos (F, L, P, S y S) en el primer dominio kringle de la cadena alfa de la secuencia de HGF de longitud completa.

El HGF de longitud completa descrito en el presente documento puede incluir la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y el HGF variante suprimido descrito en el presente documento puede incluir la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

El SDF-1 α puede incluir la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o de la SEQ ID NO: 8.

Como se valida en los siguientes ejemplos, el cotratamiento de HUVEC con las proteínas de HGF y SDF-1 α promovió los grados de migración y angiogénesis de las células endoteliales vasculares más eficazmente, en comparación con el tratamiento con las proteínas solas y por tanto, se verificó que la coadministración de proteínas de HGF y SDF-1 α puede utilizarse eficazmente para la prevención o el tratamiento de una enfermedad arterial periférica.

Una isoforma de HGF puede estar codificada por secuencias de nucleótidos separadas o por una secuencia única de polinucleótidos. En el presente documento, la composición farmacéutica puede incluir dos o más polinucleótidos cuando una isoforma de HGF está codificada por polinucleótidos separados e incluye al menos un polinucleótido que incluye un polinucleótido único cuando una isoforma de HGF está codificada por el polinucleótido único. Los polinucleótidos pueden estar unidos operativamente a al menos una secuencia reguladora (por ejemplo, un promotor

o un potenciador) que regula la expresión de una isoforma de HGF.

Cuando las isoformas de HGF están codificadas por polinucleótidos separados, se puede construir un casete de expresión de dos maneras. De acuerdo con una primera manera, el casete de expresión se construye uniendo una secuencia reguladora de la expresión a una secuencia codificante (CDS) de cada isoforma. De acuerdo con una segunda manera, el casete de expresión se construye utilizando un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES; del inglés, internal ribosomal entry site), como "secuencia reguladora de la expresión - primera isoforma CDS - IRES - segunda isoforma CDS

- 10 - secuencia de terminación de la transcripción", o secuencia del péptido 2A, de la misma manera que "secuencia reguladora de la expresión - primera isoforma CDS - IRES - segunda isoforma CDS
- secuencia de terminación de la transcripción". El IRES permite que dos o más genes de interés se expresen en el mismo constructo al iniciar la traducción del gen en la secuencia IRES.

- 15 Cuando una isoforma de HGF está codificada por un único polinucleótido, el polinucleótido que codifica todas las isoformas está unido operativamente a una única secuencia reguladora de expresión única.

En la presente invención, una isoforma de HGF puede estar codificada por un gen HGF híbrido que expresa simultáneamente dos o más tipos diferentes de isoformas, por ejemplo, flHGF y dHGF.

- 20 El gen HGF híbrido puede incluir la secuencia que se corresponde con los exones 1 a 4 del gen HGF humano, el intrón 4 del gen HGF humano o una secuencia de fragmentos del mismo y una secuencia que se corresponde con los exones 5 a 18 del gen HGF humano.

- 25 El gen híbrido de HGF que incluye el intrón 4 tiene una longitud de 7113 pb e incluye la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7. El gen híbrido de HGF puede incluir selectivamente un fragmento del intrón 4 entre el exón 4 y el exón 5 del ADNc de HGF. El gen híbrido de HGF puede incluir la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5.

- 30 La "isoforma de HGF" como se describe en el presente documento y el gen HGF híbrido (por ejemplo, HGF-X7) se han presentado en el documento WO 2003/078568.

- Se interpreta que la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos de una isoforma de HGF utilizable en la presente invención incluye una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a una isoforma de HGF humano de tipo silvestre. La expresión "identidad sustancial" significa que, cuando se alinean la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos de una isoforma de HGF humano de tipo silvestre y cualquier secuencia de nucleótidos diferente para que se correspondan entre sí tanto como sea posible y las secuencias alineadas se analizan utilizando un algoritmo que se utiliza habitualmente en la técnica, la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos de una isoforma de HGF humano de tipo silvestre muestra al menos un 80% de identidad, preferentemente al menos un 90% de identidad y más preferentemente al menos un 95% de identidad. Los métodos de alineamiento para la comparación de secuencias se conocen en la técnica. Se describen varios métodos y algoritmos para el alineamiento en Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981); Needleman y Wunsch, J. Mol. Bio. 48:443 (1970); Pearson y Lipman, Methods in Mol. Biol. 24: 307-31 (1988); Higgins y Sharp, Gene 73: 237-44 (1988); Higgins y Sharp, CABIOS 5: 151-3 (1989); Corpet *et al.*, Nuc. Acids Res. 16: 10881-90 (1988); Huang *et al.*, Comp. Appl. BioSci. 8: 155-65 (1992) y Pearson *et al.*, Meth. Mol. Biol. 24: 307-31 (1994). La herramienta básica de búsqueda de alineamiento local (BLAST; del inglés, Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-10 (1990)) está disponible a través del Centro nacional para la información biotecnológica (NCBI) o similar y en internet, puede utilizarse junto con los programas de análisis de secuencias, tales como blastp, blastm, blastx, blastn y tblastx. Se puede acceder a BLAST a través de la web www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/. El método de comparación de identidad de secuencia que utiliza dicho programa se puede confirmar en www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html.

- 50 El polinucleótido que codifica SDF-1 α puede incluir la SEQ ID NO: 6.

- La enfermedad arterial periférica puede ser una enfermedad isquémica de las extremidades. Como se valida en los siguientes ejemplos, la composición descrita en el presente documento tiene un efecto de mantenimiento de un estado normal de forma continua, a diferencia del grupo de administración de pCK, el grupo de administración de pCK-SDF-1 α y administración de pCK-HGF, que muestra degradaciones en las afecciones de las patas traseras en los modelos de ratón de isquemia inducida.

- 60 Cada uno de los polinucleótidos descritos en el presente documento puede ser ADN desnudo o un nucleótido contenido en un sistema de suministro de genes. La composición aquí descrita se puede aplicar *in vivo* a través de diversos métodos de suministro que se conocen rutinariamente en el campo de la terapia génica y el sistema de suministro de genes incluye, por ejemplo, un vector, un plásmido o un vector vírico.

- (i) Plásmido (vector)

- 65 Puede utilizarse un plásmido (vector) como un sistema de suministro que suministra los polinucleótidos descritos en

el presente documento. El polinucleótido incluido en el vector está presente preferentemente en un casete de expresión adecuado. En el casete de expresión, el polinucleótido está, preferentemente, unido operativamente a un promotor.

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

En la presente invención, el promotor unido a la secuencia de polinucleótidos es uno que puede regular la transcripción de la secuencia de nucleótidos operando en células animales de acuerdo con un aspecto, células de mamíferos según otro aspecto y células humanas según un aspecto particular e incluye promotores derivados de virus de mamíferos y promotores derivados de genomas de células de mamíferos. Entre los ejemplos de los estos se pueden incluir el promotor de citomegalovirus (CMV), promotor tardío de adenovirus, promotor 7,5K del virus vaccinia, promotor SV40, promotor del HSV tk, promotor RSV, promotor EF1 alfa, promotor de metalotioneína, promotor de beta-actina, promotor del gen IL-2 humano, promotor del gen IFN humano, promotor del gen IL-4 humano, promotor del gen de linfotóxina humano y promotor del gen GM-CSF humano. De acuerdo con un aspecto descrito en el presente documento, el promotor utilizado en la presente invención es un promotor o un promotor EF1 alfa derivado del gen inmediato temprano (IE) del CMV humano (hCMV). De acuerdo con otro aspecto, el promotor utilizado en la presente invención es una región sin traducir 5' (UTR) que incluye un promotor/potenciador y la secuencia de los nucleótidos completos del exón 1 al nucleótido inmediatamente anterior al codón de iniciación ATG del exón 2, en el gen CMV IE.

El casete de expresión utilizado en la presente invención puede incluir una secuencia de poliadenilación y puede incluir, por ejemplo, un terminador de la hormona del crecimiento bovina (Gimmi, E. R., *et al.*, Nucleic Acids Res. 17: 6983-6998 (1989)), secuencia de poliadenilación derivada del SV40 (Schek, N., *et al.*, Mol. Cell Biol. 12: 5386-5393 (1992)), poliA de HIV-1 (Klasens, B. I. F., *et al.*, Nucleic Acids Res. 26: 1870-1876 (1998)), poliA de β -globina (Gil, A., *et al.*, Cell 49: 399-406 (1987)), poliA de HSV TK (Cole, C. N. y T. P. Stacy, Mol. Cell. Biol. 5: 2104-2113 (1985)) o poliA de virus polio (Batt, D. B y G. G. Carmichael, Mol. Cell. Biol. 15: 4783-4790 (1995)).

De acuerdo con otro aspecto, el vector pCK, pCP, pVAX1 o pCY se puede utilizar como un sistema de suministro de genes y de acuerdo con un aspecto particular, se puede utilizar un vector pCK. El vector pCK se desvela en detalle en el documento WO 2000/040737.

(ii) Retrovirus

Los retrovirus pueden introducir un gen de los mismos en el genoma de un hospedador para suministrar muchos materiales genéticos exóticos y tienen un amplio espectro de células infecciosas y por tanto, la mayoría de los retrovirus se utilizan como vectores de suministro de genes.

Para construir un vector de retrovirus, la secuencia de polinucleótidos se inserta en el genoma retroviral en lugar de la secuencia retroviral, produciendo así virus de replicación deficiente. Para la producción de viriones, se construye una línea celular de empaquetado que comprende los genes gag, pol y env pero no la secuencia de repetición terminal larga (LTR) y la secuencia ψ (Mann *et al.*, Cell, 33: 153-159 (1983)). Cuando el plásmido recombinante que incluye la secuencia de polinucleótidos, la secuencia de LTR y la secuencia ψ , se inserta en la línea celular, la secuencia ψ permite la producción de transcritos de ARN del plásmido recombinante y estos transcritos se empaquetan con virus, que, a continuación, se descargan a un medio (Nicolas y Rubinstein "Vectores retrovirales", En: "Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Rodríguez y Denhardt (Eds.), Stoneham: Butterworth, 494-513 (1988)). El medio que contiene los retrovirus recombinantes se recoge y concentra y a continuación, se utiliza como un sistema de suministro de genes.

Se ha publicado el suministro de genes que utiliza un vector retroviral de segunda generación. Kasahara *et al.*, fabricaron una variante del virus de la leucemia murina de moloney y produjeron una proteína quimérica que tenía nuevas características de unión insertando la secuencia de eritropoyetina (EPO) en un sitio de la envoltura de la variante (Science, 266: 1373-1376 (1994)). La secuencia de polinucleótidos también puede cargarse en el retrovirus según la estrategia de construcción de dicho vector retroviral de segunda generación.

(iii) Adenovirus

El adenovirus se ha empleado normalmente como vector de suministro de genes debido al genoma de tamaño medio, facilidad de ingeniería, un título alto, amplia gama de células diana y elevada infectividad. Ambos extremos del genoma contienen repeticiones terminales invertidas (ITR) de 100-200 pb, que son elementos cis necesarios para la replicación y el empaquetado del ADN. La región E1 (E1A y E1B) del genoma codifica proteínas responsables de la regulación de la transcripción del genoma vírico y la transcripción de genes de la célula hospedadora. Las regiones E2 (E2A y E2B) codifican las proteínas implicadas en la replicación del ADN vírico.

De los vectores adenovirales desarrollados hasta ahora, se utiliza normalmente un adenovirus de replicación deficiente que tiene una región E1 suprimida. Por otra parte, se elimina una región E3 de un vector adenoviral normal para

proporcionar un sitio de inserción para un gen exótico (Thimmappaya, B. *et al.*, Cell, 31: 543-551 (1982); y Riordan, J. R. *et al.*, Science, 245: 1066-1073 (1989)). Por tanto, la secuencia de polinucleótidos se inserta preferentemente en una región E1 suprimida (región E1A y/o región E1B) o una región E3 eliminada. Además, la secuencia de polinucleótidos también se puede insertar en una región E4 eliminada. En el presente documento, el término "supresión" utilizado en referencia a las secuencias del genoma vírico abarca la supresión completa de la secuencia correspondiente así como la supresión parcial de la misma. Además, el adenovirus puede empaquetar aproximadamente un 105 % del genoma de tipo silvestre y por tanto, puede empaquetar aproximadamente 2 kb adicionales de ADN (Ghosh- Choudhury *et al.*, EMBO J., 6: 1733-1739 (1987)). Por tanto, las secuencias exóticas anteriores insertadas en adenovirus pueden insertarse adicionalmente en el genoma adenovírico.

El adenovirus puede ser de cualquiera de los 42 serotipos y subgrupos A-F diferentes. De estos, el adenovirus de tipo 5 perteneciente al subgrupo C es el material de partida preferible para obtener el vector adenovírico. La información bioquímica y genética sobre el adenovirus tipo 5 es bien conocida. Los genes exóticos suministrados por el adenovirus se replican de la misma manera que en el episoma y por tanto, tienen baja genotoxicidad para las células hospedadoras. Por tanto, la terapia génica que utiliza el sistema de suministro de genes adenovíricos se considera segura.

(iv) Vector AAV

Los virus adenoasociados (AAV; del inglés, adeno-associated viruses) son capaces de infectar células no divididas y tienen la capacidad de infectar diversos tipos de células y por tanto, son adecuados como un sistema de suministro de genes de esta invención. Las descripciones detalladas para la utilización y la preparación del vector AAV se desvelan en las patentes de Estados Unidos n.º 5.139.941 y 4.797.368.

Los resultados de la investigación para AAV como sistema de suministro de genes se describen en LaFace *et al.*, Virology, 162: 483-486 (1988), Zhou *et al.*, Exp. Hematol. (Nueva York), 21: 928-933 (1993), Walsh *et al.*, J. Clin. Invest., 94: 1440-1448 (1994) y Flotte *et al.*, Gene Therapy, 2: 29-37 (1995). Recientemente, el vector AAV se ha aprobado para ensayos en fase I en seres humanos para el tratamiento de la fibrosis quística.

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

(v) Otros vectores víricos

Pueden utilizarse también otros vectores víricos para suministrar la secuencia de polinucleótidos al cuerpo. Los vectores derivados de virus, tales como el virus vaccinia (Puhlmann M. *et al.*, Human Gene Therapy 10:649-657 (1999); Ridgeway, "Vectores de expresión en mamíferos," En: "Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses. Rodríguez y Denhardt, eds. Stoneham: Butterworth, 467-492 (1988); Baichwal y Sugden, "Vectores para la transferencia de genes derivados de virus de ADN animales: expresión transitoria y estable de los genes transferidos", En: Kucherlapati R, Ed. Gene transfer. Nueva York: Plenum Press, 117-148 (1986) y Coupar *et al.*, Gene, 68: 1-10 (1988)), lentivirus (Wang G. *et al.*, J. Clin. Invest. 104(11): R55-62 (1999)) y virus del herpes simple (Chamber R., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 92:1411-1415 (1995)) pueden utilizarse en los presentes sistemas de suministro para suministrar los polinucleótidos de la invención en las células.

(vi) Liposomas

Los liposomas se forman espontáneamente por fosfolípidos suspendidos en el medio acuoso. El suministro de moléculas de ADN exóticas mediadas por liposomas ha tenido mucho éxito, como se describe en Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721: 185-190 (1982) y Nicolau *et al.*, Methods Enzymol., 149: 157-176 (1987). Los liposomas que atrapan la secuencia de polinucleótidos suministran la secuencia de polinucleótidos a las células al interactuar con las células a través de un mecanismo, tal como la endocitosis, la adsorción en las superficies celulares y la fusión con las membranas celulares plasmáticas.

En los casos en donde la secuencia de polinucleótidos se carga en una molécula de ADN recombinante desnuda o un plásmido (vector), la secuencia de polinucleótidos se puede introducir en las células mediante microinyección (Capecchi, M.R., Cell, 22: 479 (1980); y Harland y Weintraub, J. Cell Biol. 101: 1094-1099 (1985)), precipitación con fosfato de calcio (Graham, F.L. *et al.*, Virology, 52: 456 (1973); y Chen y Okayama, Mol. Cell. Biol. 7: 2745-2752 (1987)), electroporación (Neumann, E. *et al.*, EMBO J., 1: 841 (1982); y Tur-Kaspa *et al.*, Mol. Cell Biol., 6: 716-718 (1986)), transfección mediada por liposomas (Wong, T.K. *et al.*, Gene, 10: 87 (1980); Nicolau y Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721: 185-190 (1982); y Nicolau *et al.*, Methods Enzymol., 149: 157-176 (1987)), tratamiento con DEAE-dextrano (Gopal, Mol. Cell Biol., 5: 1188-1190 (1985)) y bombardeo de genes (Yang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 9568-9572 (1990)).

Cuando la secuencia de polinucleótidos se construye basándose en el vector vírico, la secuencia de polinucleótidos

se puede administrar a las células mediante varios métodos de infección vírico conocidos en la técnica. La infección de las células hospedadoras utilizando vectores víricos se describe en los documentos citados anteriormente.

El sistema de suministro de genes puede ser un vector.

5 El vector puede ser un plásmido. El plásmido puede ser el pCK. Los vectores recombinantes que incluyen un único polinucleótido que expresa dos o más isoformas de HGF utilizando el vector pCK se describen en detalle en los documentos WO 2000/040737 y WO 2003/078568.

10 La composición descrita en el presente documento puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable contenido en la composición se utiliza normalmente para la formulación y los ejemplos del mismo pueden incluir lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábica, fosfato cálcico, alginato, gelatina, silicato cálcico, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. La
15 composición farmacéutica puede contener adicionalmente, además de los ingredientes anteriores, un lubricante, un agente humectante, un agente edulcorante, un agente aromatizante, un emulsionante, un agente de suspensión, un conservante y similares. Los vehículos y preparaciones farmacéuticamente aceptables adecuados se describen en detalle en Remington's Pharmaceutical Sciences (19^a ed., 1995).

20 La composición farmacéutica descrita en el presente documento se puede administrar por vía parenteral. Por ejemplo, la composición farmacéutica de esta invención puede administrarse utilizando, por ejemplo, administración intravenosa, administración intraperitoneal, administración subcutánea, administración intradérmica, administración intraespinal, administración intratecal, administración intraventricular, administración parenquimatosa, administración intracraneal, administración intramuscular o administración local. La composición farmacéutica descrita en el presente
25 documento puede administrarse utilizando la administración intramuscular, administración intraespinal, administración intratecal, administración intraventricular, administración parenquimatosa o administración intracraneal.

La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede administrarse como una inyección. La dosis adecuada de la composición farmacéutica varía dependiendo de los factores, tales como el método de formulación, la
30 manera de administración, edad del paciente, peso corporal, género y gravedad de la enfermedad, tiempo de administración, vía de administración, tasa de excreción y sensibilidad a la respuesta y el facultativo experto habitualmente puede juzgar y prescribir fácilmente la dosis eficaz para el tratamiento o prevención deseados.

35 El HGF, una isoforma del mismo y SDF-1 α , se pueden administrar en una dosis de 10 ng a 100 mg de cada y los polinucleótidos que codifican las proteínas se administran en una dosis de 1 μ g a 100 mg de cada. Cuando el HGF, una isoforma del mismo, SDF-1 α o los polinucleótidos que lo codifican, se administran repetidamente una o más veces, la dosis puede ser igual o distinta para cada administración.

40 La composición farmacéutica se puede formular utilizando un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, de acuerdo con el método, que se puede realizar fácilmente por una persona con conocimientos ordinarios en la materia a la que pertenece la presente invención y la composición farmacéutica se puede preparar en una forma de dosificación unitaria o puede insertarse en un envase multidosis. Aquí, la forma de dosificación puede ser una solución en un medio aceitoso o acuoso, una suspensión, una emulsión, un extracto, un polvo, un gránulo, un comprimido o una cápsula y puede contener adicionalmente un dispersante o un estabilizante.
45

De acuerdo con otro aspecto descrito en el presente documento, se proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad arterial periférica, incluyendo el método una etapa de administración de una composición a un sujeto que lo necesite, conteniendo la composición, como principios activos, (a) un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) o una isoforma del mismo y un factor 1 α derivado de células del estroma (SDF-1 α); o (b) un polinucleótido que codifica HGF o una isoforma del mismo y un polinucleótido que codifica SDF-1 α .
50

Como se utiliza en el presente documento, el término "administración" o "administrar" se refiere a la aplicación directa de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición a un sujeto (es decir, un objeto) que necesita la composición, formando así la misma cantidad de la misma en el cuerpo del sujeto. Por tanto, el término "administrar" incluye la inyección de la composición alrededor de un sitio de lesión y por tanto, el término se utiliza con el mismo significado que el término "inyectar".
55

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" de la composición se refiere al contenido de la composición, que es suficiente para proporcionar un efecto terapéutico o preventivo a un sujeto a administrar y por tanto, el término tiene un significado que incluye "cantidad preventivamente eficaz". Como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" incluye al ser humano, ratón, rata, cobaya, perro, gato, caballo, vaca, cerdo, mono, chimpancé, babuino o mono rhesus. En concreto, el sujeto puede ser humano.
60

Dado que el método para prevenir o tratar la enfermedad arterial periférica aquí descrito incluye la etapa de administrar la composición farmacéutica para prevenir o tratar la enfermedad arterial periférica, se omiten las descripciones que solapan entre ellas, para evitar una complicación excesiva de la especificación.
65

Efectos ventajosos

Las características y ventajas de la presente invención se resumen a continuación:

- (a) La presente invención proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad arterial periférica (EAP).
- (b) El uso de la composición de la presente invención puede prevenir o tratar una enfermedad arterial periférica (por ejemplo, enfermedad isquémica de las extremidades) más eficazmente mediante una promoción notable de la migración y angiogénesis de las células endoteliales vasculares cuando se comparan con la utilización individual de HGF, una isoforma del mismo, SDF-1 α o polinucleótidos que codifican las proteínas.

Breve descripción de los dibujos

- La Fig. 1 ilustra un efecto de la utilización de HGF y SDF-1 α sobre la migración celular de HUVEC.
- Las Fig. 2a y 2b ilustran un efecto del uso de HGF y SDF-1 α sobre la angiogénesis.
- La Fig. 3 ilustra un efecto del uso de pCK-HGF y pCK-SDF-1 α sobre las afecciones de las patas traseras de modelos de ratón con isquemia de las patas traseras.

Ejemplos

Ejemplo 1: Método experimental para investigar el efecto de la combinación de HGF y SDF-1 α sobre la migración celular de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC)

Las HUVEC (del inglés, human umbilical vein endothelial cells), que se obtuvieron tomando solo las células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano, convirtiendo las células en células individuales y cultivando las células individuales, se adquirieron de Lonza.

Para investigar los efectos de HGF (SEQ ID NO: 1, R&D systems, N.º de catálogo 294-HG-025/CF, EE. UU.) y SDF-1 α (SEQ ID NO: 4, R&D systems, N.º de catálogo 350-NS-010/CF, EE. UU.) sobre la migración celular de las HUVEC, el transpocillo (Corning, N.º de catálogo 3422) se recubrió con gelatina al 1% y a continuación, las células se sembraron a 2×10^4 células por pocillo. Tras la incubación durante una hora para permitir que las células se adhirieran, los grupos experimentales se organizaron de la siguiente manera (HGF 50 ng/ml; 50 ng/ml de SDF-1 α ; 25 ng/ml de HGF + 25 ng/ml de SDF-1 α). Los grupos experimentales respectivos se trataron con las proteínas correspondientes durante 2 horas y para medir el grado de migración celular, las células se tiñeron con violeta cristal y se midió el número de células migradas en el transpocillo utilizando un microscopio.

Como resultado, el tratamiento individual con 50 ng/ml de HGF aumentó la migración celular 1,8 veces en comparación con el control y el tratamiento individual con 50 ng/ml de SDF-1 α aumentó la migración celular 1,5 veces en comparación con el control. El cotratamiento con HGF y SDF-1 α a 25 ng/ml cada uno, aumentó la migración celular 2,5 veces en comparación con el control, mostrando un mejor efecto sobre la migración celular, en comparación con el tratamiento individual con HGF y SDF-1 α (Fig. 1).

Ejemplo 2: Investigación sobre el efecto de la combinación de HGF y SDF-1 α sobre la angiogénesis en el ensayo de tapón de Matrigel

El efecto de HGF y SDF-1 α sobre la angiogénesis se investigó utilizando un ensayo de tapón de Matrigel.

Se dividieron ratones C57BL/6 de cinco semanas de la siguiente manera para organizar los grupos experimentales (PBS; 300 ng de HGF; 150 ng de HGF + 150 ng de SDF-1 α). Aquí, se añadió 1 unidad de heparina a 400 μ l de matriz de Matrigel (Corning, N.º de catálogo 356231) y se añadieron las proteínas correspondientes a cada grupo experimental. La mezcla de Matrigel resultante se inyectó subcutáneamente en el abdomen del ratón. Después de 7 días, los ratones se sacrificaron y se aisló la matriz de matrigel trasplantada. Para cuantificar el grado de angiogénesis, se midió el nivel de hemoglobina contenida en cada matrigel mediante el ensayo de Drabkin.

Como resultado, el grupo al que se añadieron 300 ng de HGF aumentó el nivel de hemoglobina aproximadamente 1,8 veces en comparación con el grupo al que se añadió PBS y el grupo al que se añadieron 150 ng tanto de HGF como de SDF-1 α , aumentó el nivel de hemoglobina aproximadamente 2,3 veces en comparación con el grupo al que se le añadió PBS, mostrando la mejora en el grado de angiogénesis en comparación con la administración con HGF solo (Figuras 2a y 2b).

Ejemplo 3: Investigación sobre el efecto de la administración de HGF y SDF-1 α en un modelo de ratón con isquemia de las patas traseras (HLI; del inglés, hindlimb ischemia)

Ejemplo 3-1: Preparación de ADN plasmídico

Preparación del plásmido pCK-HGF

Antes del experimento en los modelos de ratón con isquemia de las patas traseras, el ADN plasmídico a utilizar se preparó de la siguiente manera. El vector pCK se construye de manera que un sujeto que se va a expresar esté regulado por un potenciador/promotor del citomegalovirus humano (hCMV) y el vector pCK se desvela en detalle en Lee *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 272: 230 (2000) y WO 2000/040737. El plásmido pCK-HGF utilizado en la presente invención se preparó insertando, en el vector pCK, un gen híbrido (es decir, el gen HGF-X7; SEQ ID NO: 5) en el que una secuencia de fragmentos del intrón 4 del gen HGF humano se inserta entre los exones 4 y 5 del gen HGF humano de acuerdo con el método desvelado en el documento WO 2003/078568.

Preparación del pCK-SDF-1 α

Basándose en la información genética del SDF-1 α humano (secuencia de referencia NCBI: NM_199168.3), se realizó la síntesis de genes añadiendo las secuencias de enzimas de restricción NheI y NotI a ambos extremos del gen. El fragmento de SDF-1 α humano sintetizado se insertó en el vector pCK utilizando NheI y NotI. La secuencia del gen SDF-1 α humano insertado en el vector pCK es la misma que la de la SEQ ID NO: 6.

Ejemplo 3-2: Preparación de modelos de ratón con isquemia de las patas traseras (HLI) y administración de ADN plasmídico

El modelo de ratón de HLI es el modelo de ratón más representativo para imitar la isquemia crítica de extremidades humana (CLI) [1, 2]. El método de producción del modelo de ratón es el siguiente. Se anestesiaron ratones Balb/c macho de siete semanas de edad con una mezcla de zoletil y rumpun y se hizo una incisión de aproximadamente 1 cm en la piel del muslo. Después de eso, la posición de la arteria femoral dentro del muslo se unió fuertemente una longitud de aproximadamente 1 cm de la arteria, utilizando hilo de un grosor de 6-0 y el tejido entre ellos se cortó para extraer el vaso sanguíneo. Este método puede inducir condiciones isquémicas, al eliminar los vasos sanguíneos que descienden por debajo del muslo. Al mismo tiempo que la inducción de HLI, el ADN plasmídico a evaluar se administró al músculo cerca del vaso sanguíneo extraído. Después de eso, se suturó bien la incisión y se observó que los ratones se recuperaran de la anestesia.

Los modelos de ratón HLI se organizaron en 6 ratones por grupo y se administró cada uno de los siguientes plásmidos: 200 μ g de pCK; 200 μ g de pCK-HGF; 200 μ g de pCK-SDF-1 α ; 200 μ g de pCK-HGF + 200 μ g de pCK-SDF-1 α . A los 3, 10, 17, 22 y 27 días tras la administración, se observaron las condiciones de las patas traseras, se puntuaron de acuerdo con un criterio predeterminado y se cuantificaron. Los criterios utilizados aquí son los siguientes [3]: 0 = estado normal; 1 = necrosis de las uñas de los pies; 2 = necrosis de los dedos de los pies; 3 = necrosis del tejido del pie

Como resultado, tras la inducción de HLI, el grupo al que se le administró pCK mostró que las afecciones de las patas traseras en promedio comenzaron a deteriorarse gradualmente y la puntuación, tras aproximadamente dos semanas, aumentó aproximadamente a 1,83. El grupo al que se administró pCK-HGF mostró que la puntuación aumentó a 0,66-0,83 con el tiempo. Por otra parte, el grupo coadministrado con pCK-HGF y pCK-SDF-1 α mostró que la puntuación después de la inducción de HLI se mantuvo en cero (Figura 3).

Como resultado, se verificó, a través de los ejemplos 1-3 anteriores, que el efecto de promover la migración y la angiogénesis de las células endoteliales vasculares y el efecto del tratamiento para una enfermedad isquémica de las extremidades fueron más notables cuando se coadministraron HGF y SDF-1 α o los polinucleótidos que codifican HGF y SDF-1 α , respectivamente, se coadministraron, más que cuando las proteínas o polinucleótidos respectivos se administraron solos.

Referencias

1. Limbourg, A., *et al.*, Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. Nat Protoc. 4(12): 1737-46, 2009.
2. Couffignal, T., *et al.*, Mouse model of angiogenesis. Am J Pathol. 152(6): 1667-79, 1998.
3. Clayton, J.A., D. Chalothorn y J.E. Faber, Vascular endothelial growth factor-A specifies formation of native collaterals and regulates collateral growth in ischemia. Circ Res. 103(9): 1027-36, 2008.

<110> HELIXMITH CO., LTD

<120> Composición para prevenir o tratar una enfermedad arterial periférica utilizando el factor de crecimiento de hepatocitos y el factor 1 alfa derivado de células del estroma

<130> PP150098

<150> KR 10-2014-0129361

<151> 26/09/2014

<160> 8

<170> KopatentIn 2.0

5

<210> 1

<211> 697

<212> PRT

<213> Secuencia de aminoácidos de la proteína HGF humana recombinante

10

<400> 1

Gln	Arg	Lys	Arg	Arg	Asn	Thr	Ile	His	Glu	Phe	Lys	Lys	Ser	Ala	Lys	1	5	10	15
Thr	Thr	Leu	Ile	Lys	Ile	Asp	Pro	Ala	Leu	Lys	Ile	Lys	Thr	Lys	Lys	20	25	30	
Val	Asn	Thr	Ala	Asp	Gln	Cys	Ala	Asn	Arg	Cys	Thr	Arg	Asn	Lys	Gly	35	40	45	
Leu	Pro	Phe	Thr	Cys	Lys	Ala	Phe	Val	Phe	Asp	Lys	Ala	Arg	Lys	Gln	50	55	60	
Cys	Leu	Trp	Phe	Pro	Phe	Asn	Ser	Met	Ser	Ser	Gly	Val	Lys	Lys	Glu	65	70	75	80
Phe	Gly	His	Glu	Phe	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Lys	Asp	Tyr	Ile	Arg	Asn	85	90	95	
Cys	Ile	Ile	Gly	Lys	Gly	Arg	Ser	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Ser	Ile	Thr	100	105	110	
Lys	Ser	Gly	Ile	Lys	Cys	Gln	Pro	Trp	Ser	Ser	Met	Ile	Pro	His	Glu	115	120	125	
His	Ser	Phe	Leu	Pro	Ser	Ser	Tyr	Arg	Gly	Lys	Asp	Leu	Gln	Glu	Asn	130	135	140	
Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Arg	Gly	Glu	Glu	Gly	Gly	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	145	150	155	160
Ser	Asn	Pro	Glu	Val	Arg	Tyr	Glu	Val	Cys	Asp	Ile	Pro	Gln	Cys	Ser	165	170	175	
Glu	Val	Glu	Cys	Met	Thr	Cys	Asn	Gly	Glu	Ser	Tyr	Arg	Gly	Leu	Met	180	185	190	
Asp	His	Thr	Glu	Ser	Gly	Lys	Ile	Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	His	Gln	Thr	195	200	205	
Pro	His	Arg	His	Lys	Phe	Leu	Pro	Glu	Arg	Tyr	Pro	Asp	Lys	Gly	Phe	210	215	220	

Asp 225	Asp	Asn	Tyr	Cys	Arg 230	Asn	Pro	Asp	Gly	Gln 235	Pro	Arg	Pro	Trp	Cys 240
Tyr	Thr	Leu	Asp 245	Pro	His	Thr	Arg	Trp	Glu 250	Tyr	Cys	Ala	Ile	Lys	Thr 255
Cys	Ala	Asp	Asn 260	Thr	Met	Asn	Asp	Thr 265	Asp	Val	Pro	Leu	Glu 270	Thr	Thr
Glu	Cys	Ile 275	Gln	Gly	Gln	Gly	Glu 280	Gly	Tyr	Arg	Gly	Thr 285	Val	Asn	Thr
Ile 290	Trp	Asn	Gly	Ile	Pro	Cys 295	Gln	Arg	Trp	Asp	Ser 300	Gln	Tyr	Pro	His
Glu 305	His	Asp	Met	Thr	Pro 310	Glu	Asn	Phe	Lys	Cys 315	Lys	Asp	Leu	Arg	Glu 320
Asn	Tyr	Cys	Arg 325	Asn	Pro	Asp	Gly	Ser	Glu 330	Ser	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr 335
Thr	Asp	Pro	Asn 340	Ile	Arg	Val	Gly	Tyr 345	Cys	Ser	Gln	Ile	Pro	Asn	Cys 350
Asp	Met	Ser 355	His	Gly	Gln	Asp	Cys 360	Tyr	Arg	Gly	Asn	Gly 365	Lys	Asn	Tyr
Met 370	Gly	Asn	Leu	Ser	Gln 375	Thr	Arg	Ser	Gly	Leu	Thr 380	Cys	Ser	Met	Trp
Asp 385	Lys	Asn	Met	Glu	Asp 390	Leu	His	Arg	His	Ile 395	Phe	Trp	Glu	Pro	Asp 400
Ala	Ser	Lys	Leu	Asn 405	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn 410	Pro	Asp	Asp	Asp	Ala 415
His	Gly	Pro	Trp 420	Cys	Tyr	Thr	Gly	Asn 425	Pro	Leu	Ile	Pro	Trp 430	Asp	Tyr
Cys	Pro	Ile 435	Ser	Arg	Cys	Glu	Gly 440	Asp	Thr	Thr	Pro	Thr 445	Ile	Val	Asn
Leu 450	Asp	His	Pro	Val	Ile	Ser 455	Cys	Ala	Lys	Thr	Lys 460	Gln	Leu	Arg	Val
Val 465	Asn	Gly	Ile	Pro	Thr 470	Arg	Thr	Asn	Ile	Gly 475	Trp	Met	Val	Ser	Leu 480
Arg	Tyr	Arg	Asn 485	Lys	His	Ile	Cys	Gly	Gly 490	Ser	Leu	Ile	Lys	Glu	Ser 495
Trp	Val	Leu	Thr 500	Ala	Arg	Gln	Cys	Phe 505	Pro	Ser	Arg	Asp	Leu	Lys	Asp 510
Tyr	Glu 515	Ala	Trp	Leu	Gly	Ile	His 520	Asp	Val	His	Gly 525	Arg	Gly	Asp	Glu
Lys 530	Cys	Lys	Gln	Val	Leu	Asn 535	Val	Ser	Gln	Leu	Val 540	Tyr	Gly	Pro	Glu
Gly 545	Ser	Asp	Leu	Val	Leu	Met 550	Lys	Leu	Ala	Arg 555	Pro	Ala	Val	Leu	Asp 560

```

Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro
      565                      570                      575

Glu Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile
      580                      585                      590

Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn
      595                      600                      605

Glu Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser
      610                      615                      620

Glu Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly
      625                      630                      635                      640

Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val
      645                      650                      655

Leu Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro
      660                      665                      670

Gly Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile
      675                      680                      685

Ile Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser
      690                      695

```

<210> 2

<211> 728

5 <212> PRT

<213> Secuencia de aminoácidos de fIHGF

<400> 2

Met	Trp	Val	Thr	Lys	Leu	Leu	Pro	Ala	Leu	Leu	Leu	Gln	His	Val	Leu			
1				5					10					15				
Leu	His	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Ile	Ala	Ile	Pro	Tyr	Ala	Glu	Gly	Gln			
			20					25					30					
Arg	Lys	Arg	Arg	Asn	Thr	Ile	His	Glu	Phe	Lys	Lys	Ser	Ala	Lys	Thr			
		35					40					45						
Thr	Leu	Ile	Lys	Ile	Asp	Pro	Ala	Leu	Lys	Ile	Lys	Thr	Lys	Lys	Val			
	50					55					60							
Asn	Thr	Ala	Asp	Gln	Cys	Ala	Asn	Arg	Cys	Thr	Arg	Asn	Lys	Gly	Leu			
65					70				75						80			
Pro	Phe	Thr	Cys	Lys	Ala	Phe	Val	Phe	Asp	Lys	Ala	Arg	Lys	Gln	Cys			
				85					90					95				
Leu	Trp	Phe	Pro	Phe	Asn	Ser	Met	Ser	Ser	Gly	Val	Lys	Lys	Glu	Phe			
			100					105					110					
Gly	His	Glu	Phe	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Lys	Asp	Tyr	Ile	Arg	Asn	Cys			
		115					120					125						
Ile	Ile	Gly	Lys	Gly	Arg	Ser	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Ser	Ile	Thr	Lys			
	130					135					140							
Ser	Gly	Ile	Lys	Cys	Gln	Pro	Trp	Ser	Ser	Met	Ile	Pro	His	Glu	His			
145					150					155					160			

Ser	Phe	Leu	Pro	Ser	Ser	Tyr	Arg	Gly	Lys	Asp	Leu	Gln	Glu	Asn	Tyr	
				165					170					175		
Cys	Arg	Asn	Pro	Arg	Gly	Glu	Glu	Gly	Gly	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Ser	
			180					185					190			
Asn	Pro	Glu	Val	Arg	Tyr	Glu	Val	Cys	Asp	Ile	Pro	Gln	Cys	Ser	Glu	
		195					200					205				
Val	Glu	Cys	Met	Thr	Cys	Asn	Gly	Glu	Ser	Tyr	Arg	Gly	Leu	Met	Asp	
	210					215					220					
His	Thr	Glu	Ser	Gly	Lys	Ile	Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	His	Gln	Thr	Pro	
225					230					235					240	
His	Arg	His	Lys	Phe	Leu	Pro	Glu	Arg	Tyr	Pro	Asp	Lys	Gly	Phe	Asp	
				245					250					255		
Asp	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Gln	Pro	Arg	Pro	Trp	Cys	Tyr	
			260					265					270			
Thr	Leu	Asp	Pro	His	Thr	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Ala	Ile	Lys	Thr	Cys	
		275					280					285				
Ala	Asp	Asn	Thr	Met	Asn	Asp	Thr	Asp	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Thr	Glu	
	290					295					300					
Cys	Ile	Gln	Gly	Gln	Gly	Glu	Gly	Tyr	Arg	Gly	Thr	Val	Asn	Thr	Ile	
305					310					315					320	
Trp	Asn	Gly	Ile	Pro	Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	Ser	Gln	Tyr	Pro	His	Glu	
				325					330					335		
His	Asp	Met	Thr	Pro	Glu	Asn	Phe	Lys	Cys	Lys	Asp	Leu	Arg	Glu	Asn	
			340					345					350			
Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Ser	Glu	Ser	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Thr	
		355					360					365				
Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	Val	Gly	Tyr	Cys	Ser	Gln	Ile	Pro	Asn	Cys	Asp	
	370					375					380					
Met	Ser	His	Gly	Gln	Asp	Cys	Tyr	Arg	Gly	Asn	Gly	Lys	Asn	Tyr	Met	
385					390					395					400	
Gly	Asn	Leu	Ser	Gln	Thr	Arg	Ser	Gly	Leu	Thr	Cys	Ser	Met	Trp	Asp	
				405					410					415		
Lys	Asn	Met	Glu	Asp	Leu	His	Arg	His	Ile	Phe	Trp	Glu	Pro	Asp	Ala	
			420					425					430			
Ser	Lys	Leu	Asn	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asp	Asp	Ala	His	
		435					440					445				
Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Gly	Asn	Pro	Leu	Ile	Pro	Trp	Asp	Tyr	Cys	
	450					455					460					
Pro	Ile	Ser	Arg	Cys	Glu	Gly	Asp	Thr	Thr	Pro	Thr	Ile	Val	Asn	Leu	
465					470					475					480	
Asp	His	Pro	Val	Ile	Ser	Cys	Ala	Lys	Thr	Lys	Gln	Leu	Arg	Val	Val	
				485					490					495		

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp
    660                                665                                670

Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu
    675                                680                                685

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

Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile
    705                                710                                715                                720

Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser
    725

```

<210> 3

<211> 723

5 <212> PRT

<213> Secuencia de aminoácidos de dHGF

<400> 3

ES 2 822 924 T3

Met	Trp	Val	Thr	Lys	Leu	Leu	Pro	Ala	Leu	Leu	Leu	Gln	His	Val	Leu
1				5					10					15	
Leu	His	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Ile	Ala	Ile	Pro	Tyr	Ala	Glu	Gly	Gln
			20					25					30		
Arg	Lys	Arg	Arg	Asn	Thr	Ile	His	Glu	Phe	Lys	Lys	Ser	Ala	Lys	Thr
		35					40					45			
Thr	Leu	Ile	Lys	Ile	Asp	Pro	Ala	Leu	Lys	Ile	Lys	Thr	Lys	Lys	Val

ES 2 822 924 T3

50							55									60
Asn	Thr	Ala	Asp	Gln	Cys	Ala	Asn	Arg	Cys	Thr	Arg	Asn	Lys	Gly	Leu	
65					70					75					80	
Pro	Phe	Thr	Cys	Lys	Ala	Phe	Val	Phe	Asp	Lys	Ala	Arg	Lys	Gln	Cys	
				85					90					95		
Leu	Trp	Phe	Pro	Phe	Asn	Ser	Met	Ser	Ser	Gly	Val	Lys	Lys	Glu	Phe	
			100					105					110			
Gly	His	Glu	Phe	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Lys	Asp	Tyr	Ile	Arg	Asn	Cys	
		115					120					125				
Ile	Ile	Gly	Lys	Gly	Arg	Ser	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Ser	Ile	Thr	Lys	
		130					135					140				
Ser	Gly	Ile	Lys	Cys	Gln	Pro	Trp	Ser	Ser	Met	Ile	Pro	His	Glu	His	
145					150					155					160	
Ser	Tyr	Arg	Gly	Lys	Asp	Leu	Gln	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Arg	
				165					170					175		
Gly	Glu	Glu	Gly	Gly	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Ser	Asn	Pro	Glu	Val	Arg	
			180					185					190			
Tyr	Glu	Val	Cys	Asp	Ile	Pro	Gln	Cys	Ser	Glu	Val	Glu	Cys	Met	Thr	
		195					200					205				
Cys	Asn	Gly	Glu	Ser	Tyr	Arg	Gly	Leu	Met	Asp	His	Thr	Glu	Ser	Gly	
	210					215					220					
Lys	Ile	Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	His	Gln	Thr	Pro	His	Arg	His	Lys	Phe	
225					230					235					240	
Leu	Pro	Glu	Arg	Tyr	Pro	Asp	Lys	Gly	Phe	Asp	Asp	Asn	Tyr	Cys	Arg	
				245					250					255		
Asn	Pro	Asp	Gly	Gln	Pro	Arg	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Leu	Asp	Pro	His	
			260					265					270			
Thr	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Ala	Ile	Lys	Thr	Cys	Ala	Asp	Asn	Thr	Met	
		275					280					285				
Asn	Asp	Thr	Asp	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Thr	Glu	Cys	Ile	Gln	Gly	Gln	
	290					295					300					
Gly	Glu	Gly	Tyr	Arg	Gly	Thr	Val	Asn	Thr	Ile	Trp	Asn	Gly	Ile	Pro	
305					310					315					320	
Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	Ser	Gln	Tyr	Pro	His	Glu	His	Asp	Met	Thr	Pro	
				325					330					335		
Glu	Asn	Phe	Lys	Cys	Lys	Asp	Leu	Arg	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	
			340					345					350			
Asp	Gly	Ser	Glu	Ser	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Thr	Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	
		355					360					365				
Val	Gly	Tyr	Cys	Ser	Gln	Ile	Pro	Asn	Cys	Asp	Met	Ser	His	Gly	Gln	
	370					375					380					
Asp	Cys	Tyr	Arg	Gly	Asn	Gly	Lys	Asn	Tyr	Met	Gly	Asn	Leu	Ser	Gln	

385					390					395					400
Thr	Arg	Ser	Gly	Leu	Thr	Cys	Ser	Met	Trp	Asp	Lys	Asn	Met	Glu	Asp
				405					410					415	
Leu	His	Arg	His	Ile	Phe	Trp	Glu	Pro	Asp	Ala	Ser	Lys	Leu	Asn	Glu
			420					425					430		
Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asp	Asp	Ala	His	Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr
		435					440					445			
Thr	Gly	Asn	Pro	Leu	Ile	Pro	Trp	Asp	Tyr	Cys	Pro	Ile	Ser	Arg	Cys
	450					455					460				
Glu	Gly	Asp	Thr	Thr	Pro	Thr	Ile	Val	Asn	Leu	Asp	His	Pro	Val	Ile
465					470					475					480
Ser	Cys	Ala	Lys	Thr	Lys	Gln	Leu	Arg	Val	Val	Asn	Gly	Ile	Pro	Thr
				485					490					495	
Arg	Thr	Asn	Ile	Gly	Trp	Met	Val	Ser	Leu	Arg	Tyr	Arg	Asn	Lys	His
			500					505					510		
Ile	Cys	Gly	Gly	Ser	Leu	Ile	Lys	Glu	Ser	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Arg
		515					520					525			
Gln	Cys	Phe	Pro	Ser	Arg	Asp	Leu	Lys	Asp	Tyr	Glu	Ala	Trp	Leu	Gly
	530					535					540				
Ile	His	Asp	Val	His	Gly	Arg	Gly	Asp	Glu	Lys	Cys	Lys	Gln	Val	Leu
545					550					555					560
Asn	Val	Ser	Gln	Leu	Val	Tyr	Gly	Pro	Glu	Gly	Ser	Asp	Leu	Val	Leu
				565					570				575		
Met	Lys	Leu	Ala	Arg	Pro	Ala	Val	Leu	Asp	Asp	Phe	Val	Ser	Thr	Ile
			580					585					590		
Asp	Leu	Pro	Asn	Tyr	Gly	Cys	Thr	Ile	Pro	Glu	Lys	Thr	Ser	Cys	Ser
		595					600					605			
Val	Tyr	Gly	Trp	Gly	Tyr	Thr	Gly	Leu	Ile	Asn	Tyr	Asp	Gly	Leu	Leu
	610					615					620				
Arg	Val	Ala	His	Leu	Tyr	Ile	Met	Gly	Asn	Glu	Lys	Cys	Ser	Gln	His
625					630					635					640
His	Arg	Gly	Lys	Val	Thr	Leu	Asn	Glu	Ser	Glu	Ile	Cys	Ala	Gly	Ala
				645					650				655		
Glu	Lys	Ile	Gly	Ser	Gly	Pro	Cys	Glu	Gly	Asp	Tyr	Gly	Gly	Pro	Leu
			660					665					670		
Val	Cys	Glu	Gln	His	Lys	Met	Arg	Met	Val	Leu	Gly	Val	Ile	Val	Pro
		675					680					685			
Gly	Arg	Gly	Cys	Ala	Ile	Pro	Asn	Arg	Pro	Gly	Ile	Phe	Val	Arg	Val
	690					695					700				
Ala	Tyr	Tyr	Ala	Lys	Trp	Ile	His	Lys	Ile	Ile	Leu	Thr	Tyr	Lys	Val
705					710					715					720
Pro	Gln	Ser													

<210> 4
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> Secuencia de aminoácidos de la proteína alfa SDF-1 humana recombinante

5

<400> 4

Lys	Pro	Val	Ser	Leu	Ser	Tyr	Arg	Cys	Pro	Cys	Arg	Phe	Phe	Glu	Ser
1				5					10					15	
His	Val	Ala	Arg	Ala	Asn	Val	Lys	His	Leu	Lys	Ile	Leu	Asn	Thr	Pro
			20					25					30		
Asn	Cys	Ala	Leu	Gln	Ile	Val	Ala	Arg	Leu	Lys	Asn	Asn	Asn	Arg	Gln
		35					40					45			
Val	Cys	Ile	Asp	Pro	Lys	Leu	Lys	Trp	Ile	Gln	Glu	Tyr	Leu	Glu	Lys
	50					55					60				
Ala	Leu	Asn	Lys												
	65														

10

<210> 5
 <211> 3679
 <212> ADN
 <213> Secuencia de nucleótidos de HGF-X7

15

<400> 5

atgtgggtga	ccaaactcct	gccagccctg	ctgctgcagc	atgtcctcct	gcatctcctc	60
ctgctcccca	tcgccatccc	ctatgcagag	ggacaaagga	aaagaagaaa	tacaattcat	120
gaattcaaaa	aatcagcaaa	gactacccta	atcaaaatag	atccagcact	gaagataaaa	180
acaaaaaag	tgaatactgc	agaccaatgt	gctaatagat	gtactaggaa	taaaggactt	240
ccattcactt	gcaaggcttt	tgtttttgat	aaagcaagaa	aacaatgcct	ctggttcccc	300
ttcaatagca	tgtcaagtgg	agtgaaaaaa	gaatttggcc	atgaatttga	cctctatgaa	360
aacaaagact	acattagaaa	ctgcatcatc	ggtaaaggac	gcagctacaa	gggaacagta	420
tctatcacta	agagtggcat	caaatgtcag	ccctggagtt	ccatgatacc	acacgaacac	480
aggtaagaac	agtatgaaga	aaagagatga	agcctctgtc	ttttttacat	gttaacagtc	540
tcatattagt	ccttcagaat	aattctacaa	tcctaaaata	acttagccaa	cttgctgaat	600
tgtattacgg	caaggtttat	atgaattcat	gactgatatt	tagcaaatga	ttaattaata	660
tgtaataaaa	atgtagccaa	aacaatatct	taccttaatg	cctcaatttg	tagatctcgg	720
tatttggtga	tcctgggtag	gaaacacatt	tgaatgggat	ttactaagat	actaaaatcc	780
ttggacttca	ctctaatttt	agtgccattt	agaactcaag	gtctcagtaa	aagtagaaat	840
aaagcctggt	aacaaaacac	aagctgaata	ttaaaaatgt	aactggattt	tcaaagaaat	900
gtttactggg	attacctgta	gatgtatatt	ctttattatg	atcttttgtg	taaagtctgg	960

ES 2 822 924 T3

cagacaaaatg caatatctaa ttgttgagtc caatatcaca agcagtacaa aagtataaaa	1020
aagacttggc cttttctaata gtgttaaaat actttatgct ggtaataaca ctaagagtag	1080
ggcactagaa attttaagtg aagataatgt gttgcagtta ctgcactcaa tggcttacta	1140
ttataaacca aaactgggat cactaagctc cagtcagtc aaatgatcaa aattattgaa	1200
gagaataagc aattctgttc tttattagga cacagtagat acagactaca aagtggagtg	1260
tgcttaataa gaggtagcat ttgttaagtg tcaattactc tattatccct tggagcttct	1320
caaaataacc atataaggtg taagatgtta aagggtatgg ttacactcag tgcacaggta	1380
agctaatagg ctgagagaag ctaaattact tactggggtc tcacagtaag aaagtgagct	1440
gaagtttcag ccagatttta actggattct gggctcttta ttcattgttac ttcattgaatc	1500
tgtttctcaa ttgtgcagaa aaaagggggc tatttataag aaaagcaata aacaaacaag	1560
taatgatctc aaataagtaa tgcaagaaat agtgagattt caaatcagt ggcagcgatt	1620
tctcagttct gtccaaagtg gccttgctca atcacctgct atcttttagt ggagctttga	1680
aattatgttt cagacaactt cgattcagtt ctagaatgtt tgactcagca aattcacagg	1740
ctcatctttc taacttgatg gtgaatatgg aaattcagct aaatggatgt taataaaaatt	1800
caaacgtttt aaggacagat gaaaatgaca gaattttaag gtaaaatata tgaaggaata	1860
taagataaag gatTTTTtcta ccttcagcaa aaacataccc actaattagt aaaattaata	1920
ggcaaaaaaa agttgcatgc tcttatactg taatgattat catttttaaaa ctagcttttt	1980
gccttcgagc tatcggggta aagacctaca ggaaaactac tgtcgaaatc ctcgagggga	2040
agaaggggga ccctggtgtt tcacaagcaa tccagaggta cgctacgaag tctgtgacat	2100
tcctcagtgt tcagaagttg aatgcatgac ctgcaatggg gagagttatc gaggtctcat	2160
ggatcataca gaatcaggca agatttgtca gcgctgggat catcagacac cacaccggca	2220
caaattcttg cctgaaagat atcccgacaa gggctttgat gataattatt gccgcaatcc	2280
cgatggccag ccgaggccat ggtgctatac tcttgaccct cacaccgct gggagtactg	2340
tgcaattaaa acatgcgctg acaatactat gaatgacact gatgttcctt tggaaacaac	2400
tgaatgcatc caaggtcaag gagaaggcta caggggcact gtcaatacca tttggaatgg	2460
aattccatgt cagcgttggg attctcagta tcctcacgag catgacatga ctccctgaaaa	2520
tttcaagtgc aaggacctac gagaaaatta ctgccgaaat ccagatgggt ctgaatcacc	2580
ctggtgtttt accactgatc caaacatccg agttggctac tgctcccaa ttccaaactg	2640
tgatatgtca catggacaag attgttatcg tgggaatggc aaaaattata tgggcaactt	2700
atcccaaaca agatctggac taacatgttc aatgtgggac aagaacatgg aagacttaca	2760
tcgtcatatc ttctgggaac cagatgcaag taagctgaat gagaattact gccgaaatcc	2820
agatgatgat gctcatggac cctggtgcta cacgggaaat ccactcattc cttgggatta	2880

ES 2 822 924 T3

ttgccctatt tctcgttgtg aaggtgatac cacacctaca atagtcaatt tagaccatcc	2940
cgtaatatct tgtgccaaaa cgaaacaatt gcgagttgta aatgggattc caacacgaac	3000
aaacatagga tggatgggta gtttgagata cagaaataaa catatctgcg gaggatcatt	3060
gataaaggag agttgggttc ttactgcacg acagtgtttc ccttctcgag acttgaaaga	3120
ttatgaagct tggcttggaa ttcattgatgt ccacggaaga ggagatgaga aatgcaaaca	3180
ggttctcaat gtttcccagc tggatatatgg ccctgaagga tcagatctgg ttttaaatgaa	3240
gcttgccagg cctgctgtcc tggatgattt tgtagtacg attgatttac ctaattatgg	3300
atgcacaatt cctgaaaaga ccagttgcag tgtttatggc tggggctaca ctggattgat	3360
caactatgat ggctattac gagtggcaca tctctatata atgggaaatg agaaatgcag	3420
ccagcatcat cgaggggaagg tgactctgaa tgagtctgaa atatgtgctg gggctgaaaa	3480
gattggatca ggaccatgtg agggggatta tgggtggcca cttgtttgtg agcaacataa	3540
aatgagaatg gttcttgggt tcattgttcc tggctgtgga tgtgccattc caaatcgtcc	3600
tggatatttt gtccgagtag catattatgc aaaatggata cacaaaatta ttttaacata	3660
taaggtacca cagtcatag	3679

<210> 6
 <211> 270
 <212> ADN
 <213> Secuencia de nucleótidos de SDF-1 alfa
 <400> 6

atgaacgcca aggtcgtggt cgtgctgggt ctcgtgctga ccgcgctctg cctcagcgac	60
gggaagcccg tcagcctgag ctacagatgc ccatgccgat tcttcgaaag ccatgttgcc	120
agagccaacg tcaagcatct caaaattctc aacactccaa actgtgccct tcagattgta	180
gcccggctga agaacaacaa cagacaagtg tgcattgacc cgaagctaaa gtggattcag	240
gagtacctgg agaaagcttt aaacaagtaa	270

<210> 7
 <211> 7113
 <212> ADN
 <213> Secuencia de nucleótidos de HGF híbrido
 <400> 7

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcatctcctc	60
ctgctcccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat	120
gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa	180
acaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt	240
ccattcactt gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc	300

ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa	360
aacaaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctacaa gggaacagta	420
tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac	480
aggtaagaac agtatgaaga aaagagatga agcctctgtc ttttttacat gttaacagtc	540
tcatattagt ccttcagaat aattctacaa tcctaaaata acttagccaa cttgctgaat	600
tgtattacgg caaggtttat atgaattcat gactgatatt tagcaaataa ttaattaata	660
tgtaataaaa atgtagccaa aacaatatct taccttaatg cctcaatttg tagatctcgg	720
tatttgtgaa ataataacgt aaacttcgtt taaaaggatt cttcttcctg tctttgagaa	780
agtacggcac tgtgcagggg gagaggttga ttgtgaaaaa tcagaggtag atgagaatct	840
tactgagggc tgagggttct ttaaccttgg tggatctcaa cattggttgc acattaaaaat	900
cacctgctgc aagcccttga cgaatcttac ttagaagatg acaacacaga acaattaaat	960
cagaatctct ggggagaata gggcaccagt attttttgag ctcccaccat gattccaaag	1020
tgcagccaaa tttgagaacc actgctaaaa gctcaagctt cagattgacc agcttttcca	1080
tctcacctat cgcctaaaga ccaaattgga taaatgtgtt cattacgaca gatgggtact	1140
atttaaagat gagtaaacac aatatactta ggctcgtcag actgagagtt ttaatcatca	1200
ctgaggaaaa acatagatat ctaatactga ctggagtatt agtcaaggct tatttcacac	1260
acaattttat cagaaaccaa agtagtttaa aacagctctc cccttattag taatgcattg	1320
gagggtttac tttaccatgt accttgcctga gcaactgtacc ttgttaatct catttacttg	1380
taatgagaac cacacagcgg gtagttttat tggttctatt ttacctacat gacaaaactg	1440
aagcataaaa acacttagta agttttcagt gtcatgcaca actaggaagt gacatggcca	1500
gaatataagc ccagtcacca tcaactctata acctgcgctt ttaacaactt cagggcatga	1560
cacatttggc cggtcagtag aacccatgct gtgatttgtt tttgcagtgg tggatgatgc	1620
tgccttggtg aatccacttt ttattctatt ccattttggg gacacaattc tgcaagatga	1680
ttcttcatta ggaaacagag atgagttatt gaccaacaca gaaagaaaaa gagtttgttg	1740
ctccacactg ggattaaacc tatgatcttg gcctaattaa cactagctag taagtgtcca	1800
agctgatcat ctctacaaca tttcaataac agaaaacaac aattttcaaa attagttact	1860
tacaattatg tagaaatgcc tctaaaacac agtattttcc ttatattaca aaaacaaaaa	1920
ttataattgg ttttgtcctc ttttgagagt ttgcatggtg ttactccctg catagtgaag	1980
aaaacatttt atttaagtag atggatctaa gtttttcatg aacaaaggaa tgacatttga	2040
aatcaatcct accctagtcc aggagaatgc attagattaa cctagtagag gtcttatttc	2100
acctgagtt ttctatgatc gtgattctct gctggaggag taattgtgaa atagatctct	2160
ctgggaactg gcttcctagt ccaatcagct cttttaccaa tgaacacttc cttgtgatat	2220

agatgtttat	ggccgagagg	atccagtata	ttaataaaat	ccctttttgt	attcaatgag	2280
ggaaacacat	aattttcatc	aattagcagc	ttattggaat	atctgcatga	tggtttaaca	2340
cttttaagtg	ttgactaaag	attaatttta	cagaaaatag	aaaaagaaat	atgtttctgt	2400
ctggaggaat	gattttattgt	tgaccocctaa	attgaaatat	tttactagt	gcttaatgga	2460
aagatgatga	aagatgatga	aattaatgta	gaagcttaac	tagaaaatca	ggtgacctga	2520
tatctacatc	tgtatccttc	attggccacc	cagcattcat	taatgaatca	gatgatggaa	2580
tagatcaagt	ttcctaggaa	cacagtgaat	attaaaagaa	aacaaagga	gcctagcacc	2640
tagaagacct	agttttatatt	tcaaagtata	tttggaatga	accaattttt	aaacatttcc	2700
tcacttgtct	ctcttaaagc	cttgccaaca	gcaaggacag	agaacaaaa	atagtgtata	2760
tatgaataaa	tgcttattac	agaatctgct	gactggcaca	tgctttgtgt	gtaatgggtt	2820
ctcataaaca	cttggtgaat	gaacacacat	aagtgaaaga	gcatggctag	gcttcatccc	2880
ttggtcaa	atggggtgct	aaagaaaagc	aggggaaata	cattgggaca	ctaacaaaa	2940
aaaacagtta	atttaggtaa	aagataaaat	acaccacaga	atgaagaaaa	gagatgaccc	3000
agactgctct	ttaaccttca	tgtcctagag	aggtttttga	tatgaattgc	attcagaatt	3060
gtggaaagga	gcccaccttt	tctcttcatt	ttgattttat	taactccaat	gggggaattt	3120
tattcgtgtt	ttggccatat	ctacttttga	tttctacatt	attctctctt	cctttctacc	3180
tgtatttgtc	ctaataaatt	gttgacttat	taattcacta	cttcctcaca	gctttttttt	3240
ggctttacaa	atccactgga	aaggatatatg	ggtgtatcac	tttgtgtatt	tcggtgtgca	3300
tgtgtagagg	ggacaaaaat	cctctctcaa	actataaata	ttgagtattt	gtgtattgaa	3360
catttgctat	aactactagg	tttcttaaat	aatcttaata	tataaaatga	tatagaaaa	3420
gggaaattat	agttcgtatt	attcatctaa	gtgaagagat	taaaaccag	ggagtaaata	3480
aattgtctaa	ggactaaggt	tgtatactat	ttaggtgata	gatatggggc	aaccgtatgg	3540
gttttatgat	taacaaataa	acttctcacc	actctacat	atcaactttt	ccataaaaga	3600
gagctatagt	attctttgct	taaataaatt	tgattagtgc	atgacttctt	gaaaacatat	3660
aaagcaaaag	tcacatttga	ttctatcaga	aaagtgaagta	agccatggcc	caaacaaaag	3720
atgcattaaa	atattctgga	atgatggagc	taaaagtaag	aaaaatgact	ttttaaaaa	3780
gtttactgtt	aggaattgtg	aaattatgct	gaattttagt	tgcatataa	tttttgtcag	3840
tcatacgggtc	tgacaacctg	tcttatttct	atttcccat	atgaggaatg	ctagttaagt	3900
atggatatta	actattacta	cttagatgca	ttgaagtgtc	ataatatgga	taatacttca	3960
ctggttccct	gaaaatgttt	agttagtaat	aagtctctta	cactatttgt	tttgtccaat	4020
aatttatatt	ttctgaagac	ttaactctag	aatacactca	tgtcaaaatg	aaagaatttc	4080

attgcaaaat attgcttggg acatgacgca tacctgtatt tgttttgtgt cacaacatga	4140
aaaatgatgg tttattagaa gtttcattgg gtaggaaaca catttgaatg gtatttacta	4200
agatactaaa atccttggac ttcactctaa ttttagtgcc atttagaact caaggtctca	4260
gtaaaagtag aaataaagcc tgtaacaaa acacaagctg aatattaaaa atgtaactgg	4320
attttcaaag aaatgtttac tgggtattacc tgtagatgta tattctttat tatgatcttt	4380
tgtgtaaaagt ctggcagaca aatgcaatat ctaattgttg agtccaatat cacaagcagt	4440
acaaaagtat aaaaaagact tggccttttc taatgtgtta aaatacttta tgctggtaat	4500
aacactaaga gtagggcact agaaatttta agtgaagata atgtgttgca gttactgcac	4560
tcaatggctt actattataa accaaaactg ggatcactaa gctccagtca gtcaaaatga	4620
tcaaaattat tgaagagaat aagcaattct gttctttatt aggacacagt agatacagac	4680
tacaaagtgg agtgtgctta ataagaggta gcatttgcta agtgtcaatt actctattat	4740
cccttggagc ttctcaaaat aaccatataa ggtgtaagat gttaaagggt atggttacac	4800
tcagtgcaca ggtaagctaa taggctgaga gaagctaaat tacttactgg ggtctcacag	4860
taagaaagtg agctgaagtt tcagcccaga tttaactgga ttctgggctc ttatttcag	4920
ttacttcag aatctgtttc tcaattgtgc agaaaaaagg gggctattta taagaaaagc	4980
aataaacaaa caagtaatga tctcaaataa gtaatgcaag aaatagtgag atttcaaaat	5040
cagtggcagc gatttctcag ttctgtccta agtggccttg ctcaatcacc tgctatcttt	5100
tagtggagct ttgaaattat gtttcagaca acttcgattc agttctagaa tgtttgactc	5160
agcaaattca caggctcatc tttctaactt gatggtgaat atggaaattc agctaaatgg	5220
atgttaataa aattcaaacg ttttaaggac agatgaaaat gacagaattt taaggtaaaa	5280
tatatgaagg aatataagat aaaggatttt tctaccttca gcaaaaacat acccactaat	5340
tagtaaaatt aataggcaaa aaaaagttgc atgctcttat actgtaatga ttatcatttt	5400
aaaactagct ttttgccctc gagctatcgg ggtaaagacc tacaggaaaa ctactgtcga	5460
aatcctcgag gggaagaagg gggaccctgg tgtttcacia gcaatccaga ggtacgctac	5520
gaagtctgtg acattcctca gtgttcagaa gttgaatgca tgacctgcaa tggggagagt	5580
tatcgaggtc tcatggatca tacagaatca ggcaagattt gtcagcgctg ggatcatcag	5640
acaccacacc ggcacaaatt cttgcctgaa agatatcccg acaagggtt tgatgataat	5700
tattgccgca atcccgatgg ccagccgagg ccatgggtgt atactcttga ccctcacacc	5760
cgctgggagt actgtgcaat taaaacatgc gctgacaata ctatgaatga cactgatgtt	5820
cctttggaaa caactgaatg catccaaggt caaggagaag gctacagggg cactgtcaat	5880
accatttgg aatggaattcc atgtcagcgt tgggattctc agtatcctca cgagcatgac	5940
atgactcctg aaaatttcaa gtgcaaggac ctacgagaaa attactgccg aaatccagat	6000

gggtctgaat caccctggtg ttttaccact gatccaaaca tccgagttgg ctactgctcc	6060
caaattccaa actgtgatat gtcacatgga caagattggt atcgtgggaa tggcaaaaat	6120
tatatgggca acttatccca aacaagatct ggactaacat gttcaatgtg ggacaagaac	6180
atggaagact tacatcgtca tatcttctgg gaaccagatg caagtaagct gaatgagaat	6240
tactgccgaa atccagatga tgatgctcat ggaccctggt gctacacggg aaatccactc	6300
attccttggg attattgccc tatttctcgt tgtgaaggtg ataccacacc tacaatagtc	6360
aatttagacc atcccgtaat atcttgtgcc aaaacgaaac aattgcgagt tgtaaatggg	6420
attccaacac gaacaaacat aggatggatg gttagtttga gatacagaaa taaacatatc	6480
tgcgaggat cattgataaa ggagagttgg gttcttactg cacgacagtg tttcccttct	6540
cgagacttga aagattatga agcttggctt ggaattcatg atgtccacgg aagaggagat	6600
gagaaatgca aacaggttct caatgtttcc cagctggtat atggccctga aggatcagat	6660
ctggttttaa tgaagcttgc caggcctgct gtcctggatg attttgtag tacgattgat	6720
ttacctaatt atggatgcac aattcctgaa aagaccagtt gcagtgttta tggctggggc	6780
tacactggat tgatcaacta tgatggccta ttacgagtgg cacatctcta tataatggga	6840
aatgagaaat gcagccagca tcatcgaggg aaggtgactc tgaatgagtc tgaaatatgt	6900
gctggggctg aaaagattgg atcaggacca tgtgaggggg attatggtgg ccacttggtt	6960
tgtgagcaac ataaaatgag aatggttctt ggtgtcattg ttcctggtcg tggatgtgcc	7020
attccaaatc gtcctggtat ttttgtccga gtagcatatt atgcaaaatg gatacacaaa	7080
attattttaa catataaggt accacagtca tag	7113

5 <210> 8
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Secuencia de aminoácidos de SDF-1 alfa

10 <400> 8

ES 2 822 924 T3

Met	Asn	Ala	Lys	Val	Val	Val	Val	Leu	Val	Leu	Val	Leu	Thr	Ala	Leu
1				5				10					15		
Cys	Leu	Ser	Asp	Gly	Lys	Pro	Val	Ser	Leu	Ser	Tyr	Arg	Cys	Pro	Cys
			20					25					30		
Arg	Phe	Phe	Glu	Ser	His	Val	Ala	Arg	Ala	Asn	Val	Lys	His	Leu	Lys
		35					40					45			
Ile	Leu	Asn	Thr	Pro	Asn	Cys	Ala	Leu	Gln	Ile	Val	Ala	Arg	Leu	Lys
	50					55					60				
Asn	Asn	Asn	Arg	Gln	Val	Cys	Ile	Asp	Pro	Lys	Leu	Lys	Trp	Ile	Gln
65					70					75					80
Glu	Tyr	Leu	Glu	Lys	Ala	Leu	Asn	Lys							
				85											

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para utilizar en la prevención o tratamiento de una enfermedad arterial periférica (EAP), la composición farmacéutica que comprende: como principios activos, (a) un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) o una isoforma del mismo y un factor 1 α derivado de células del estroma (SDF-1 α); o (b) un polinucleótido que codifica HGF o una isoforma del mismo y un polinucleótido que codifica SDF-1 α .
5
2. La composición para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el HGF comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
10
3. La composición para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la isoforma del HGF comprende el HGF de longitud completa (flHGF) y el HGF variante suprimido (dHGF).
15
4. La composición para utilizar de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el HGF de longitud completa comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y el HGF variante suprimido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.
20
5. La composición para utilizar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde SDF-1 α comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 8.
25
6. La composición para utilizar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el polinucleótido que codifica HGF comprende una secuencia que se corresponde con los exones 1 a 4 del gen HGF humano, el intrón 4 del gen HGF humano o una secuencia de fragmentos del mismo y una secuencia que se corresponde con los exones 5 a 18 del gen HGF humano.
30
7. La composición para utilizar de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el polinucleótido que codifica HGF incluye la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5.
35
8. La composición para utilizar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el polinucleótido que codifica SDF-1 α comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6.
40
9. La composición para utilizar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la enfermedad arterial periférica es la enfermedad isquémica de las extremidades.
45
10. La composición para utilizar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde cada uno de los polinucleótidos es ADN desnudo o un nucleótido contenido en un sistema de suministro de genes.
50
11. La composición para utilizar de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el sistema de suministro de genes es un vector.
55
12. La composición para utilizar de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el vector es un plásmido.
60
13. La composición para utilizar de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el plásmido es pCK.
65

FIG. 1

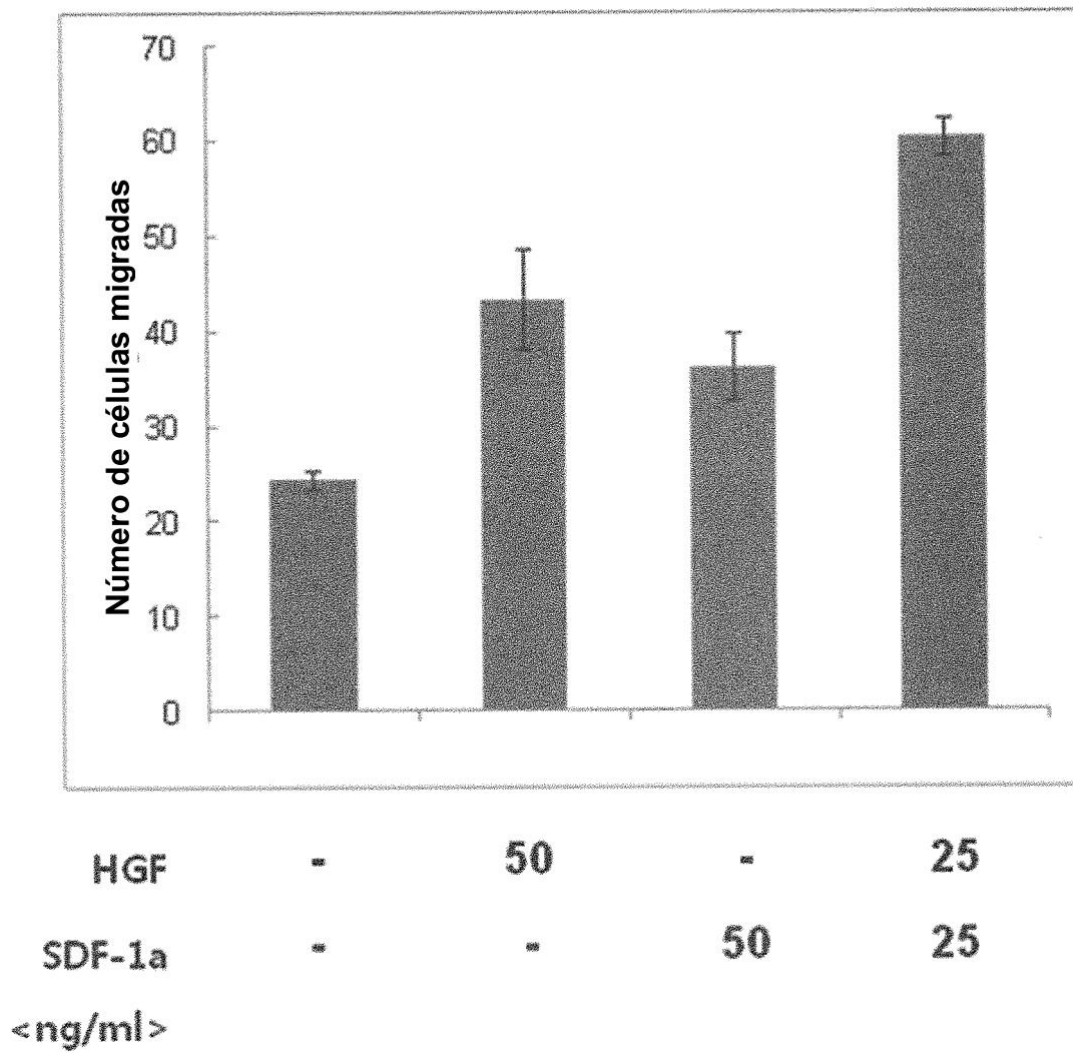


FIG. 2a

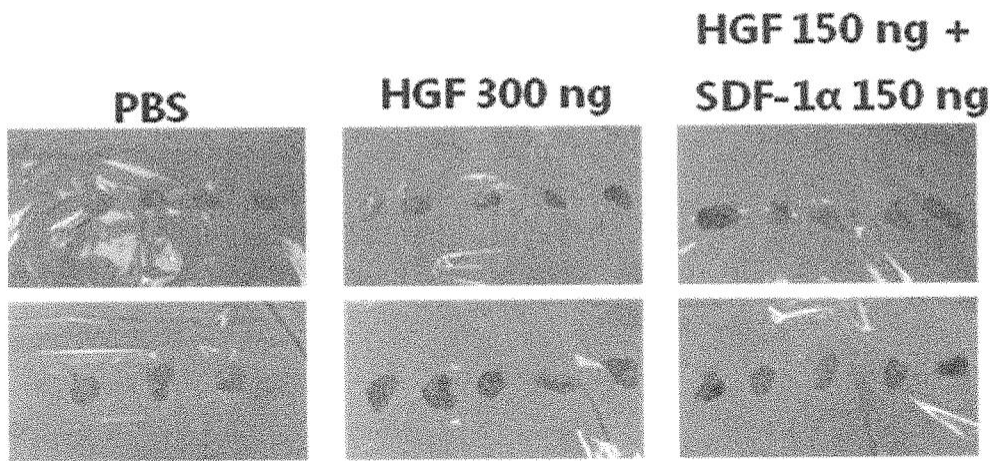


FIG. 2b

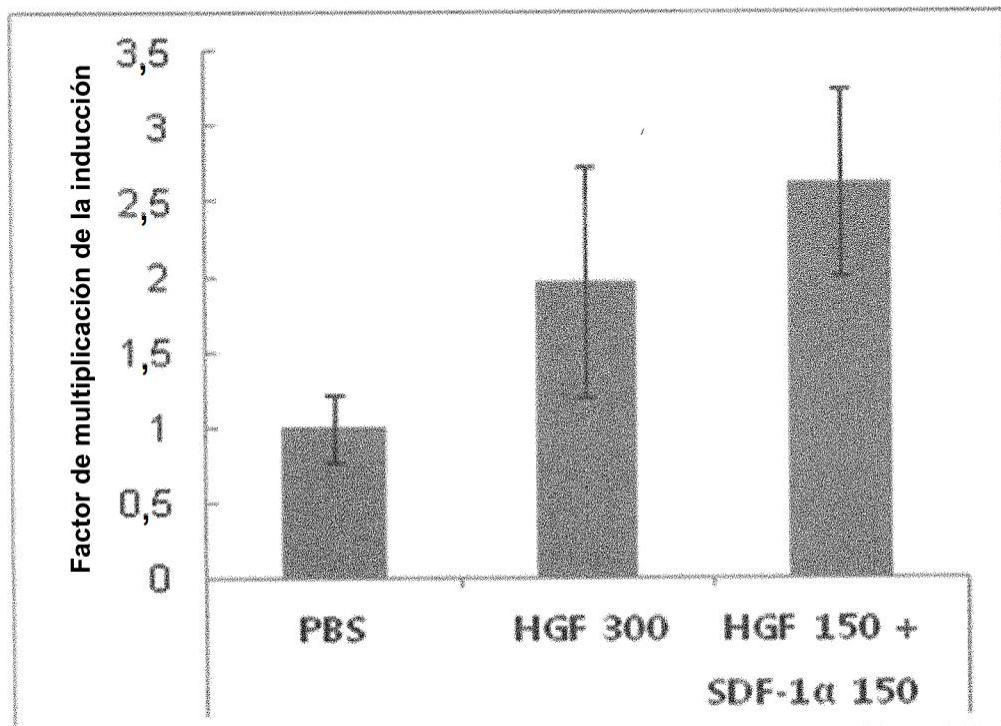


FIG. 3

