

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 603**

51 Int. Cl.:
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09159644 .5**
96 Fecha de presentación: **07.05.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2119448**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.11.2009**

54 Título: **SITIO DE UNIÓN DE ALTA AFINIDAD HGFR Y PROCEDIMIENTOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ANTAGONISTAS DEL MISMO.**

30 Prioridad:
14.05.2008 EP 08103958

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.11.2011

73 Titular/es:
**METHERESIS TRANSLATIONAL RESEARCH SA
VIA ALLA CAMPAGNA 2/A
6900 LUGANO, CH**

72 Inventor/es:
**Comoglio, Paolo Maria;
Carminati, Paolo;
Michieli, Paolo y
Basilico, Cristina**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 368 603 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

Sitio de unión de alta afinidad de HGFR y procedimientos para la identificación de antagonistas del mismo

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere al área de la proteína del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos (HGFR). Más específicamente, la presente invención se refiere a la identificación del sitio de unión de alta afinidad del HGFR por su ligando, el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), y procedimientos para la identificación de antagonistas de HGFR que se dirigen al sitio de unión de alta afinidad de HGFR.

Antecedentes de la invención

10 El receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos (también conocido como Met) es una tirosina quinasa y es el producto del oncogen c-met proto. Está constituido por una subunidad α de 50 kDa y una subunidad β de 145 kDa, que están unidos mediante enlace disulfuro, siendo la subunidad α completamente extracelular, mientras que la subunidad β incluye (desde el extremo N al C) una región extracelular, un dominio transmembrana y un dominio tirosina quinasa citoplásmico. El receptor dimérico α/β hetero maduro se genera mediante procesamiento proteolítico y glicosilación terminal de un precursor de una sola cadena de 170 kDa.

15 El HGF, también conocido como Factor Scatter, es una glicoproteína de unión a heparina con un amplio espectro de actividades biológicas que incluyen proliferación celular, motilidad, supervivencia y morfogénesis. Se sintetiza y secreta como un precursor de una sola cadena inactivo, (pro-HGF) que se almacena en la matriz extracelular debido a su alta afinidad por los proteoglicanos. Pro-HGF experimentan escisión proteolítica en los restos R494-V495 para dar lugar a la forma activa de, un dímero α/β hetero ligado a disulfuro, donde la cadena α está constituido por un dominio N-terminal seguido de cuatro dominios kringle y la cadena β comparte homología estructural con la familia quimotripsina de las serina proteasas. Sin embargo, la cadena β , carece de actividad proteolítica ya que dos de los tres restos críticos que forman la triada catalítica típica de las serina proteasas no se conservan en HGF. A pesar de su incapacidad para la señal, pro-HGF se une a Met con alta afinidad y desplaza el HGF activo.

25 Recientemente, una serie de estudios de estructura - función han vertido alguna luz en las interacciones entre la parte extracelular de Met y HGF.

30 La región extracelular Met tiene una estructura modular que abarca tres regiones funcionales: el dominio Sema (presente también en Semaforinas y Plexinas) que se extiende sobre los primeros 500 restos del extremo N de la proteína y tiene una estructura de hélice β de siete hojas propulsor, el dominio PSI (también encontrado en Plexinas, Semaforinas e Integrinas) que cubre aproximadamente 50 restos y contiene cuatro enlaces disulfuro conservados, y 400 restos adicionales que unen el dominio PSI a la hélice transmembrana y están ocupados por cuatro dominios IPT (dominios relacionados con Inmunoglobulina presentes en Plexinas y factores de Transcripción).

35 El HGF es un ligando bivalente que contiene un sitio de unión de alta afinidad para Met en las cadenas α y un sitio de unión de baja afinidad en la cadena β . La cooperación entre la cadena α - y β se requiere para la actividad biológica de HGF; mientras la cadena α , y más precisamente el dominio N y el primer kringle, es suficiente para la unión de Met, la cadena β es necesaria para la activación de Met.

40 La resolución de la estructura cristalina de los dominios SEMA y PSI de Met en complejo con la cadena β de HGF (véase i.a. WO-A-2005/108424) reveló que el sitio de unión de baja afinidad para HGF se encuentra en las hojas 2 - 3 de la hélice β , y que la parte de HGF- β que se une a Met es la misma región que las serina proteasas usan para unirse a sus sustratos o inhibidores. De manera importante, la determinación de la estructura cristalina de la cadena β de HGF a resolución de 2,53 Å y análisis de mutagénesis específica desvelaban que los restos implicados en la unión de Met en el bolsillo de activación de la cadena β de HGF se exponen a solamente después de la conversión proteolítica de pro-HGF, explicando de esta manera porque pro-HGF se une a Met con alta afinidad sin activarlo.

45 Mientras que la interacción de baja afinidad entre la cadena β de HGF y el dominio Sema de Met está bien caracterizado estructuralmente y funcionalmente, por el momento no está claro qué región de Met se une a las cadenas α de HGF con alta afinidad. De este modo, el principal mecanismo por el que HGF activa Met todavía permanece escasamente entendido. Esto es algo sorprendente cuando se considera la gran importancia biológica y terapéutica de esta ruta.

50 La señalización de HGF-Met es esencial durante la embriogénesis y en la regeneración de tejidos en la vida del adulto. De manera importante, la señalización dis regulada de HGF-Met juega un papel clave en la tumorigénesis y metástasis. La activación inapropiada de Met por diferentes mecanismos incluyendo estimulación autocrina de HGF, sobreexpresión del receptor, amplificación génica y mutación puntual se describe en una amplia diversidad de neoplasias humanas y se correlaciona con escasa prognosis. Estos hallazgos dieron como resultado un interés

5 creciente en la ruta HGF-Met como una diana para terapia de cáncer como se describe i.a. en Michieli et al., Cancer Cell 2004, 6 (1), 61 - 73; Xueyan et al., Molecular Cancer Therapeutics 2003, 2 (11), 1085 - 92; documento EP-A-0 520 158; Kaji et al., Cancer Gene Therapy 1996, 3(6), 393 - 404 y Kong-Beltram et al., Cancer Cell, 2004, 6(1), 75 - 84, que conduce al desarrollo de una diversidad de inhibidores de Met/HGF. Éstos incluyen compuestos de molécula pequeña que dirigen la actividad quinasa de Met, neutralizando los anticuerpos anti-Met o anti-HGF, receptores Decoy y factores derivados de HGF. No obstante, si tales moléculas se dirigen al sitio de unión de alta afinidad para HGF y cual es el mecanismo molecular exacto en base a la unión de HGF a Met con alta afinidad, permanece todavía desconocido. Esto puede evitar el aislamiento de agentes terapéuticos más selectivos, con sensibilidad aumentada y pocos efectos secundarios. El conocimiento exacto del sitio de unión de alta afinidad de Met para HGF ciertamente ayudará a diseñar antagonistas altamente específicos de Met.

Sumario de la invención

Por lo tanto se siente la necesidad de soluciones mejoradas que permitan la identificación de antagonistas Met con sensibilidad aumentada y pocos efectos secundarios para el desarrollo de estrategias terapéuticas más eficaces para el tratamiento de cánceres.

15 El objetivo de esta descripción es proporcionar tales soluciones mejoradas.

De acuerdo con la presente invención tales objetivos se logran gracias a la solución que tiene las características mencionadas específicamente en las reivindicaciones siguientes. Las reivindicaciones forman parte integral en la enseñanza técnica en el presente documento proporcionada en relación con la presente invención.

20 De este modo, el objetivo de la presente descripción es la identificación del sitio de unión de alta afinidad HGF al receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos (HGFR), es decir, los dominios extracelulares IPT-3 e IPT-4 de HGFR. Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar medios para la identificación de antagonistas de HGFR que se dirijan al sitio de unión de alta afinidad de HGFR para HGF para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de cánceres.

25 En una realización, la presente invención proporciona el uso de un polipéptido constituido por, o un polinucleótido que codifica un polipéptido constituido por los dominios extracelulares IPT-3 e IPT-4 del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos para la selección y / o desarrollo de agentes farmacológicamente activos útiles en el tratamiento de cáncer, en particular un cáncer con disregulación de la actividad del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos.

30 En una realización, el agente farmacológicamente activo es un inhibidor y / o antagonista del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos y se puede seleccionar entre inhibidores de moléculas pequeñas, aptámeros no codificantes, nucleótidos, inhibidores a base de ARN, ARNs, anticuerpos, péptidos, factores negativos dominantes.

35 En una realización adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar la capacidad de un agente de ensayo para actuar como un antagonista/inhibidor del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos útil en el tratamiento de cáncer, preferiblemente un cáncer con disregulación de la actividad del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos, que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto un agente de ensayo con los dominios extracelulares IPT-3 e IPT-4 del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos, o células que expresan los dominios extracelulares IPT-3 e IPT-4, la hélice transmembrana y la región citoplásmica completa del receptor factor de crecimiento de los hepatocitos,

(b) medir la actividad, función, estabilidad y / o expresión del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos, y

40 (c) seleccionar el agente que reduce la actividad, función, estabilidad y / o expresión del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos.

En todavía una realización adicional, la presente invención se refiere al uso de los dominios extracelulares IPT-3 e IPT-4 del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos como un medicamento para tratamiento de cáncer.

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención se describirá ahora en detalle con relación a las realizaciones preferidas a modo de ejemplos no limitantes con relación a los dibujos anexos, en la que:

50 - Figura 1 muestra la modificación por ingeniería genética y purificación de los subdominios Met y HGF. (A) Representación esquemática de las proteínas modificadas por ingeniería genética usadas en este estudio. Panel izquierdo: receptores modificados por ingeniería genética. W.T. MET, Met natural; EXTRA, parte extracelular; INTRA, iparte intracelular; SP, péptido de señal; SEMA, dominio de homología de semaforina; PSI, dominio de homología de plexina-semaforina-integrina; IPT 1-4, dominio 1 - 4 de homología del factor de transcripción

inmunoglobulina- plexina; TM, dominio transmembrana; JM, dominio yuxta-membrana; KD, dominio quinasa; CT, cola C-terminal; E, epítopo FLAG o MYC; H, marca poli-histidina. El triángulo rojo indica el sitio de escisión proteolítica entre la cadena α y β . Panel derecho: ligandos modificados por ingeniería genética. W.T. HGF, HGF natural; ND, dominio N; K 1-4, kringle 1-4; PLD, dominio de tipo proteasa; UNCL. HGF, HGF no escindible. El asterisco indica la sustitución de aminoácido R494Q en el sitio proteolítico. (B) Tinción con azul Coomassie de receptores y ligandos purificados por afinidad. Cada grupo de proteínas (Sema, Sema-PSI, Met Decoy ; PSI-IPT, IPT; HGF- α , HGF no escindible, HGF; HGF NK1, HGF- β) se han resuelto por SDSPAGE en condiciones no reductoras y se cuantificó contra una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA). MW, marcador de peso molecular; kDa, kilo-Dalton.

5
10 - Figura 2 muestra un análisis ELISA de interacciones HGF-Met. (A) Unión de los sub-dominios Met para activar HGF. Se inmovilizaron receptores modificados por ingeniería genética en fase sólida y se expusieron a concentraciones crecientes de HGF activo en fase líquida. La unión se reveló usando anticuerpos anti-HGF. La unión no específica se midió usando BSA en lugar de receptores purificados en fase sólida. (B, C, D) Unión de Met Decoy, Sema-PSI, e IPT a diferentes formas de HGF. Receptores modificados por ingeniería genética se inmovilizaron en fase sólida y se expusieron a concentraciones crecientes de HGF activo marcado con MYC, pro-HGF, HGF- α o HGF NK1 en fase líquida. La unión se reveló usando anticuerpos anti-MYC. La unión no específica se midió mediante el uso de angioestatina (AS) marcada con MYC en fase líquida.

15
20 - Figura 3 muestra que los dominios de IPT 3 y 4 son suficientes para unirse a HGF- α con alta afinidad. (A) Representación esquemática de variantes de IPT suprimidas. El código de color y la leyenda como en la Figura 1A. (B) análisis ELISA de interacciones entre las variantes IPT y HGF- α . Los IPT modificados por ingeniería genética se inmovilizaron en fase sólida y se expusieron a concentraciones crecientes de HGF- α en fase líquida. La unión se reveló usando anticuerpos anti-HGF.

25
30 - Figura 4 muestra que los dominios de IPT 3 y 4 son suficientes para unirse a HGF en células vivas. (A) Representación esquemática del receptor Met Δ 25-741 suprimido. El código de color y la leyenda como en la Figura 1A. (B) Análisis de biotinylation de superficie. Las proteínas celulares se inmunoprecipitaron (IP) usando anticuerpos dirigidos contra la parte C-terminal de Met y se analizaron mediante transferencia de Western (WB) usando estreptavidina (SA) conjugada con peroxidasa de rábano picante. Las mismas transferencias se volvieron a sondar con anticuerpos anti-Met. W.T., naturales; A549, células de carcinoma de pulmón humanas A549; MDA, células de melanoma humanas MDA-MB-435; TOV, células de carcinoma de ovario humanas TOV-112D; V. vacío, vector vacío. La banda p170 corresponde a Met no procesado; p145 es la forma madura del receptor. (C) Análisis de reticulación química. Células TOV-112D que expresan Met Δ 25-741 (Met Δ 25-741) y células TOV-112D naturales (W.T. TOV) se incubaron con HGF y después se sometieron a reticulación química. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron usando anticuerpos anti-Met y se analizaron mediante transferencia de Western. usando anticuerpos anti-Met. La flecha indica complejos HGF- Met Δ 25-741 (D) análisis de Metfosforilación. Células TOV-112D que expresan Met Δ 25-741 se estimularon con FBS al 1% como un control negativo y con cantidades iguales de HGF, pro-HGF, HGF NK1 o NK1-NK1. La fosforilación del receptor se determina mediante inmunoprecipitación con anticuerpos anti-Met y transferencia de Western con anticuerpos anti-fosfotirosina (anti-pTyr). Se volvieron a sondar las mismas transferencias usando anticuerpos anti-Met. Las flechas indican las bandas correspondientes a Met Δ 25-741 o inmunoglobulinas (Ig). (E) Representación esquemática de NK1-NK1. Del extremo N al C: SP, péptido de señal; ND, dominio N; K1, kringle 1; H, marca de poli-histidina.

35
40
45 - Figura 5 muestra que IPT soluble inhibe el crecimiento invasivo inducido por HGF in vitro. (A) Células MDA-MB-435 transducidas por vector lentiviral se estimularon con HGF recombinante y se determinó la fosforilación de Met mediante inmunotransferencia usando anticuerpos anti-fosfotirosina (panel superior). La misma transferencia se volvió a sondar usando anticuerpos anti-Met (panel inferior). V. vacío, Vector vacío. (B) Ensayo de morfogénesis de ramificación. Esferoides preformados de células MDA-MB-435 transducidas por vector lentiviral se embebieron en colágeno y después se estimularon con HGF recombinante para formar túbulos ramificados. La invasión de colágeno se cuantificó mediante puntuación del número medio de túbulos que surgen de cada esferoide. EV, Vector vacío; DM, Met Decoy; SP, Sema-PSI. (C) Imágenes representativas del experimento descrito en B. Ampliación: 200X.

50
55 - Figura 6 muestra que IPT soluble muestra actividad anti-tumoral y anti-metastásica. Ratones CD-1 nu-/- se inyectaron por vía subcutánea con células MDA-MB-435 transducidas con vector lentiviral, y se controló el crecimiento tumoral con el tiempo. (A) Representación gráfica de tipo Kaplan-Meier de latencia de tumor (eje X, tiempo en días; eje Y, porcentaje de animales sin tumor). V. vacío, vector vacío. (B) Volumen de tumor medio. (C) análisis Inmuno-histoquímico de secciones de tumores usando anticuerpos anti-FLAG. Ampliación: 400X. (D) Análisis de vasos de tumores. Se tiñeron secciones de tumor con anticuerpos del factor anti-Von Willebrand. El número de vasos de tumor por mm cuadrado de sección de tumor se determinó mediante microscopía. EV, Vector vacío; DM, Met Decoy; SP, Sema-PSI. (E) Análisis de incidencia de Metástasis. Tras la autopsia, secciones de pulmón en serie se analizaron mediante microscopía para determinar la presencia de micrometástasis. Incidencia

de metástasis - es decir, el número de ratones con metástasis sobre el total - se indica tanto en porcentajes (barras) como en fracción (en el extremo de las barras). (F) Imágenes representativas de micrometástasis del grupo del vector vacío. Se tiñeron secciones de pulmón con hematoxilina y eosina. Las líneas de puntos identifican las paredes de vasos sanguíneos (vs). Células metastásicas (mc) se pueden encontrar dentro de los vasos como un émbolo o en el parénquima. Ampliación: 400X.

Los datos presentados en la presente descripción sugieren que la cadena α de HGF se une a la región IPT de Met con alta afinidad, y que se hace así independientemente del procesamiento proteolítico del ligando. También sugieren que la unión de HGF a IPT en el contexto de un Met que carece del dominio Sema es suficiente para transmitir la señal para la activación del receptor al dominio citoplásmico quinasa, aunque sin distinción entre la forma inactiva y activa del ligando. Finalmente, proporcionan evidencia de que las proteínas modificadas por ingeniería genética derivadas de la región IPT y dominio Sema de Met son capaces de neutralizar la actividad pro-invasiva de HGF tanto in vitro como in vivo.

Durante mucho tiempo se ha sabido que el HGF es un factor bivalente. Estudios de modificación por ingeniería genética de proteínas tempranos identificaron un sitio de unión a Met de alta afinidad Met en el dominio N y primer kringle de HGF. Posteriormente, el análisis bioquímico y biológico combinado demostró que el dominio de tipo HGF serina proteasa (cadena β), aunque no necesariamente para la unión, juega un papel clave en la mediación de la activación del receptor. Más recientemente, datos cristalográficos y de mutagénesis detallados han caracterizado completamente tanto estructuralmente como funcionalmente el sitio de unión de Met de baja afinidad sobre la cadena β de HGF y su interacción con el dominio Sema de Met. La interface entre las cadenas α de HGF y Met han permanecido sin embargo difíciles de encontrar. Estudios de dispersión de rayos x de ángulo pequeño y microscopía crio-electrónica sugirieron la presencia de contactos entre el dominio N-terminal y el primer kringle de HGF y el dominio Sema de Met. Sin embargo, análisis de resonancia de plasmón reveló que esta interacción tiene muy poca afinidad (aproximadamente 2 veces menor que la de HGF- β para Sema y 100 veces menor que la de HGF- α para el receptor que interactúa). Ya que esta interacción débil no puede ser responsable por sí para el enlace estrecho entre HGF y Met, el sitio de unión de alta afinidad HGF sobre Met todavía tiene que identificarse.

Los resultados presentados en el presente documento contribuyen a llenar este hueco y sugerir que este largo sitio de unión de HGF buscado cae en la región IPT de Met y más precisamente en los dos últimos dominios de tipo inmunoglobulina cerca de la membrana celular. Varias evidencias experimentales diferentes proporcionadas en la presente descripción sugieren que este es el caso. En primer lugar, un receptor de Met soluble, suprimido que no contiene nada excepto los cuatro dominios IPT (IPT) se une a HGF con sustancialmente la misma actividad que la parte entera extracelular de Met. De manera inversa, Sema muestra muy baja afinidad hacia HGF. En segundo lugar, IPT se une a HGF, pro-HGF o HGF- α activos con resistencia no cambiada. En tercer lugar, la supresión de IPT 1 e IPT 2 no afecta a la afinidad de IPT para cualquier forma de HGF. En cuarto lugar, un Met receptor modificado por ingeniería genética que lleva una gran supresión en su ectodominio correspondiente al dominio Sema, el módulo PSI y los primeros dos dominios de tipo inmunoglobulina (Met $_{\Delta 25-741}$) retiene la capacidad de unirse a HGF y para translucir la señal para la activación de la quinasa al interior de la célula, aunque no se puede distinguir entre HGF y Pro-HGF activo. Finalmente, una forma dimérica de HGF NK1, que se sabe que contiene dominio de unión de Met mínimo de HGF- α , es capaz de inducir la activación de Met $_{\Delta 25-741}$ tanto eficazmente como más potente que HGF, de este modo identificando en IPT 3-4 el sitio de unión de HGF NK1-.

Aunque estos datos señalan a un papel clave de IPT en la unión de HGF, es digno de mención que dos estudios previos de estructura/función en la parte extracelular de Met no identificaba ningún sitio de unión al ligando en esta región. Un primer diseño de mapa de ectodominio Met sugería que el dominio Sema es necesario y suficiente para la unión de HGF basándose en ensayos ELISA. Un segundo analizó el papel del dominio Sema en la dimerización del receptor y sugirió que una forma modificada por ingeniería genética de la parte extracelular Met que contenía una supresión en el dominio Sema no era capaz de precipitar conjuntamente HGF.

La presente descripción además demuestra que la cooperación entre Sema e IPT se observa también cuando la parte extracelular de Met se usa como una herramienta biotecnológica para inhibir el crecimiento invasivo inducido por HGF. En el análisis in vitro y en heterotransplantes de ratón tanto las proteínas solubles de IPT como Sema-PSI mostraron un efecto inhibitorio significativo. Sin embargo, ninguno de ellos podría lograr la potente inhibición mostrada por el ectodominio de Met completo, que contiene tanto el sitio de unión de baja afinidad como de alta afinidad de HGF. Esto implica que ambas interacciones contribuyen a controlar la actividad de Met. Mientras que el contacto HGF- β -Sema ya se ha identificado como una diana para terapia, los resultados presentados en el presente documento descubren una segunda interfase que ofrece oportunidades para la intervención farmacológica. Las proteínas o anticuerpos recombinantes que se unen a la región IPT en lugar de HGF auténtico tienen una aplicación como inhibidores altamente competitivos de Met para el tratamiento de cánceres dependientes de HGF/Met.

Materiales y procedimientos

Modificación por ingeniería genética de proteínas

Receptores solubles o transmembrana y ligandos modificados por ingeniería genética descritos en este trabajo se han generado mediante PCR estándar y técnicas de modificación por ingeniería genética. Todos los factores conservan la secuencia guía de su proteína parental en el extremo N. Las secuencias de aminoácido (aa) de proteínas de Met solubles (Gene Bank N. X54559) corresponden a aa 1-24 (péptido de señal) más: Met Decoy, aa 25 - 932; Sema, aa 25 - 515; Sema-PSI, aa 25 - 562; PSIIPT, aa 516 - 932; IPT, aa 563 - 932; IPT Δ 1, aa 657 - 932; IPT Δ 1-2, aa 742 - 932; IPT-3, aa 742 - 838; IPT-4, aa 839 - 932. en el extremo C de cada molécula una secuencia de epítipo doble FLAG (SDYKDDDDK - SEC ID No.:19) o individual MYC (EQKLISEEDLN - SEC ID No.:20) y una marca poli-histidina (HHHHHHH - SEC ID No.:21) se añadieron para la detección y purificación de proteínas. El Met Δ 25-741 transmembrana modificado por ingeniería genética es idéntico a Met natural excepto para la región suprimida (aa 25 - 741). Las secuencias de aminoácido de proteínas de HGF modificadas por ingeniería genética (Gene Bank N. M73239) corresponden a aa 1-31 (péptido de señal) más: HGF, aa 32 - 728; HGF- α , aa 32 - 473; HGF NK1, aa 32 - 205; HGF- β , aa 495 - 728. Se añadieron el MYC o epítipo FLAG y marca poli-histidina en el extremo C. Se ha descrito antes HGF no escindible (Mazzone, M. et al. (2004) J Clin Invest. 114(10), 1418-1432). NK1-NK1 es una forma dimérica de HGF NK1 constituido por la misma región N- terminal HGF repetida en tándem (aa 1 - 205 directamente unidos a aa 32 - 205 sin espaciador). Los ADN que codifican todas las proteínas modificadas por ingeniería genética se subclonaron en el vector de transferencia lentiviral pRRLsin.PPT.CMV.eGFP.Wpre (SEC ID No.:1) en lugar del gfp ADNc como se describe en Follenzi, A. et al. (2000) Nat Genet. 25(2), 217-222. La secuencia de codificación de GFP se reemplazó por los siguientes ADNc: Met Decoy FLAG.his (SEC ID No.:2), Sema FLAG.his (SEC ID No.:3), Sema-PSI FLAG.his (SEC ID No.:4), PSI- IPT FLAG.his (SEC ID No.:5), IPT FLAG.his (SEC ID No.:6), IPT Δ 1 FLAG.his (SEC ID No.:7), IPT Δ 1-2 FLAG.his (SEC ID No.:8), IPT 3 FLAG.his (SEC ID No.:9), IPT 4 FLAG.his (SEC ID No.:10), Met Δ 25-741 (SEC ID No.:11), HGF MYC his (SEC ID No.:12), HGF- α MYC his (SEC ID No.:13), HGF-NK1 MYC his (SEC ID No.:14), HGF- β MYC his (SEC ID No.:15), HGF MYC his no escindible (SEC ID No.:16), NK1-NK1 his (SEC ID No.: 17), angiostatina MYC his(SEC ID No.:18).

Ensayos Inmunoabsorbentes Ligados a Enzima

Todos los receptores y factores modificados por ingeniería genética se recogieron del medio acondicionado de células de melanoma humano MDA-MB-345 transducidas por el vector lentiviral en la ausencia de suero. La purificación del factor se realizó mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizada como se ha descrito previamente en Michieli P. et al. (2002) Nat Biotechnol. 20(5), 488 - 495. Conversión de pro-HGF en HGF activo se realizó mediante la incubación de pro-HGF purificado (concentración máxima 100 ng/ μ l) con FBS al 2 - 10% (Sigma, St. Louis, Missouri) a 37°C durante 24 horas. La conversión del factor se analizó mediante transferencia de Western usando anticuerpos anti-HGF (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota). HGF no escindible sometido a la misma incubación con FBS se usó como pro-HGF en todos los ensayos que comparaban HGF activo con HGF no procesado. La unión de ligandos modificados por ingeniería genética a receptores solubles se midió mediante ELISA usando receptores solubles marcados con FLAG en fase sólida y ligandos marcados con MYC modificado por ingeniería genética en fase líquida. Una concentración fija de receptor soluble purificado (100 ng/pocillo) se absorbió a placas ELISA de 96 pocillos. Las placas recubiertas de proteína se incubaron con concentraciones crecientes de ligandos modificados por ingeniería genética, y la unión se reveló usando anticuerpos anti-HGF biotinilados (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) o anticuerpos anti-MYC (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California). Se analizaron los datos de unión y se ajustaron usando software Prism (Graph Pad Software, San Diego, California).

Cultivo de células

Se compraron células de melanoma humano MDA-MB-435 en la Fuente de Compartida de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Georgetown (Washington, Distrito de Columbia). Las células se mantuvieron en DMEM complementado con FBS al 10%(Sigma). Células de carcinoma de ovario humano TOV-112D se obtuvieron de ATCC (Rockville, Maryland; ATCC N. CRL-11731) y se cultivaron usando una mezcla 1:1 de Medio MCDB 105 y Medio 199 complementado con FBS al 15% (todos de Sigma). Células de carcinoma de pulmón humano A549 también se obtuvieron de ATCC (ATCC N. CCL-185) y se mantuvieron en RPMI complementado con FBS al 10%.

50 Vectores lentivirales

Se produjeron reservas de vector mediante transfección transitoria de células 293T como se ha descrito previamente en Follenzi, A. et al. (2000) Nat Genet. 25 (2), 217 - 222. En resumen, la mezcla de ADN de plásmido para la transfección se preparó como sigue: plásmido ENV (VSV-G), 9 μ g; plásmido DE ENVASE pMDLg/pRRE 16,2 μ g; plásmido REV, 6,25 μ g; VECTOR DE TRANSFERENCIA (plásmido n° 2 - 18), 37,5 μ g. Los plásmidos se diluyeron en una solución de TE/CaCl₂, a la que se añadió una solución de HBS mientras se sometía a agitación con aparato Vortex a la máxima velocidad. La mezcla ADN/CaCl₂/HBS se añadió gota a gota inmediatamente a las placas de células que después se incubaron a 37°C. Después de 14 - 16 horas se reemplazó el medio de cultivos

con uno reciente. Los sobrenadantes del cultivo celular que contenían partículas del vector se recogieron aproximadamente 36 horas después del cambio del medio. Después de la recogida, los sobrenadantes se filtraron a través de membranas de poro de 0,2 μm y se almacenaron a -80°C . Se determinó la concentración de antígeno viral p24 por el kit ELISA de perfil de núcleo HIV-1 p24 (NEN Life Science Products, Boston, Massachusetts) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se transdujeron las células en placas de seis pocillos (10^5 células/pocillo en 2 ml de medio) usando 40 ng/ml de p24 en la presencia de 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de polibreno (Sigma) como se describe en Vigna, E. y Naldini, L. (2000) *J Gene Med.* 2(5), 308 - 316. Se cambió el medio aproximadamente 18 horas después de la transducción. Se controló el crecimiento celular y la producción de proteína con el tiempo. Líneas celulares transducidas se sembraron después en placas de 15 cm, se desarrollaron hasta 80% de confluencia y se incubaron en medio sin suero. Después de 72 horas, se recogieron los sobrenadantes que contenían las proteínas solubles recombinantes, se filtraron y se recombinaron por cromatografía de afinidad y se almacenaron a -30°C .

Análisis de Inmuno-precipitación y transferencia de Western

Se realizaron análisis de lisis celular, inmuno-precipitación y transferencia de Western usando tampón de extracción (EB) como se describe en Longati, P. et al. (1994) *Oncogene* 9 (1), 49 - 57. Se detectó la señal usando el sistema ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se han descrito los anticuerpos anti-Met para inmunoprecipitación por Ruco, L.P. et al. (1996) *J Pathol.* 180(3), 266-270 y se compraron en UBI (Lake Placid, New York). Los anticuerpos anti-Met para transferencia de Western se compraron en Santa Cruz. Los anticuerpos anti-FLAG se obtuvieron de Sigma. El análisis de fosforilación de Met en células MDA-MB-435 transducidas por vector lentiviral se realizó como se ha descrito previamente en Michieli, P. et al. (2004) *Cancer Cell* 6(1), 61 - 73.

Reticulación de HGF y análisis de activación de Met

Células TOV-112D transducidas por el vector lentiviral que expresan $\text{Met}_{\Delta 25-741}$ se sometieron a análisis de biotilación de superficie usando un kit ECLTM Surface Biotinylation Module (Amersham Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó la reticulación química como se ha descrito previamente en Mazzone, M. et al. (2004) *J Clin Invest.* 114 (10), 1418 - 1432. En resumen, células se desprovieron de factores de crecimiento en suero durante 3 días y después se incubaron con 1 nM HGF durante 3 horas. Los lisados de células se inmuno-precipitaron usando anticuerpos usados contra la parte C-terminal de Met como se describe en Ruco, L.P. et al. (1996) *J Pathol.* 180(3), 266 - 270, se resolvieron mediante SDS-PAGE usando un gradiente de poliacrilamida al 3-10% y se analizaron mediante transferencia de Western usando anticuerpos anti-HGF (R&D). para análisis de activación de receptor, células TOV- 112D que expresan $\text{Met}_{\Delta 25-741}$ se privaron de factores de crecimiento en suero durante 3 días y después se estimularon con 1 nM HGF, HGF no escindible, HGF NK1 o NK1-NK1 durante 10 minutos. Las células se lisaron usando EB como se describe en Longati, P. et al. (1994) *Oncogene* 9(1), 49-57. Las proteínas celulares se inmuno-precipitaron con anticuerpos anti-Met como se ha descrito y se analizaron mediante transferencia de Western usando anticuerpos anti-fosfotirosina (UBI). Las mismas transferencias se volvieron a sondear con anticuerpos anti-Met (Ruco, L.P. et al. (1996) *J Pathol.* 180(3), 266-270).

Ensayos biológicos

Ensayos de invasión de colágeno que usan células MDA-MB-435 se realizaron usando esferoides preformados como se describe en Michieli, P. et al. (2004) *Cancer Cell* 6 (1), 61 - 73. En resumen, se generaron esferoides mediante incubación de las células durante toda una noche (700 células / pocillo) en placas de 96 pocillos no adherentes (Greiner, Frickenhausen, Alemania) en la presencia de 0,24 g/ml de metilcelulosa (Sigma). Se embebieron los esferoides en una matriz de colágeno que contenía 1,3 mg/ml de colágeno de tipo I de cola rata (BD Biosciences, Bedford, Massachusetts) y FBS al 10% usando placas de 96 pocillos (40 esferoides / pocillo). Los esferoides embebidos se cultivaron a 37°C durante 24 horas, y después se estimularon con 30 ng/ml de HGF (R&D) o sin factor durante 24 horas adicionales. El número de túbulos que surgen de cada esferoide se puntuó mediante microscopía. Al menos se analizaron 12 esferoides por punto experimental.

Ensayos de tumorigénesis

Células tumorales MDA-MB-435 transducidas por el vector lentiviral ($3,10^6$ células/ratón) en 0,2 ml de DMEM se inyectaron por vía subcutánea en el flanco posterior derecho de ratones hembra de seis semanas de edad nu-/ sobre fondo Swiss CD-1 (Charles River Laboratories, Calco, Italia). Se evaluó el tamaño de tumor cada 2 días usando un calibre. Se calculó el volumen de tumor usando la fórmula $V = 4/3\pi x^2 y/2$ en la que x es el eje de tumor menor e y el eje de tumor mayor. Una masa de 15 mm^3 - correspondiente aproximadamente al volumen inicial ocupado por las células inyectadas - se eligió como umbral para la positividad de tumor. Los ratones cuyos tumores estaban por debajo de este umbral se consideraron sin tumor. Después de aproximadamente 4 semanas, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los tumores para análisis. Los animales se sometieron a autopsia. Los tumores y pulmones se embebieron en parafina y se procesaron para histología. Se

realizó análisis de micrometástasis por microscopía sobre secciones de pulmón en serie teñidas con hematoxilina y eosina. Las secciones de tumores se tiñeron con hematoxilina y eosina y se analizaron por un patólogo independiente no informado de la identidad de la muestra. TSe determine la expresión transgénica sobre secciones de tumores por inmuno-histoquímica usando anticuerpos anti-FLAG (Sigma). Las secciones se tiñeron por contraste con hematoxilina Meyer (Sigma). Se analizó la angiogénesis de tumor mediante inmuno-histoquímica usando anticuerpos de factor anti-Von Willebrand (DAKO, Glostrup, Dinamarca). Las secciones se tiñeron por contraste como antes. Se determinó la densidad de los vasos por microscopía. Se analizaron al menos 12 campos por animal. Se aprobaron todos los procedimientos de animal por la Comisión Ética de la Universidad de Turin, Italia, y por el Ministerio de Salud italiano.

10 *Análisis estadístico*

Se determinó la significación estadística usando un ensayo de t de Student de dos colas homoscedástico (disposición 1, grupo de control; disposición 2, grupo experimental). Para todos los datos analizados, se asumió un umbral de significación de $p < 0,05$. En todas las figuras, los valores se expresan como media \pm desviación estándar, y la significación estadística se indica por un solo ($p < 0,05$) o doble ($p < 0,01$) asterisco.

15 **Resultados**

Modificación por ingeniería genética de dominios funcionales HGF/Met

Una representación esquemática de los dominios funcionales contenidos en Met y HGF se muestra en la Figura 1A. La parte extracelular de Met incluye un dominio Sema, una articulación PSI, y cuatro módulos IPT (panel izquierdo). HGF se compone de una cadena α y una β unidas por un puente disulfuro en la proteína madura. La cadena α a su vez comprende un dominio N-terminal y cuatro kringles (panel derecho). Para analizar las interacciones entre Met y HGF, los inventores expresaron todos los dominios funcionales como proteínas individuales, solubles. Los dominios funcionales se modificaron por ingeniería genética para que contuviera el péptido de señal de la proteína parental en su extremo N, de manera que se puedan secretar apropiadamente. En el extremo C, se añadieron un epítipo exógeno (FLAG o MYC) para reconocimiento de anticuerpo y una marca poli-histidina para purificación de proteína. Todos los ADNc que codifican los factores modificados por ingeniería genética se subclonaron en el vector lentiviral pRRLsin.PPT.CMV.Wpre, y se produjeron partículas lentivirales recombinantes como se describe en Materiales y Procedimientos. Las proteínas recombinantes se recogieron del medio acondicionado de células de melanoma humano MDA-MB-435 transducidas por el vector lentiviral y se purificaron hasta homogeneidad por cromatografía de afinidad. Las proteínas purificadas se cuantificaron contra patrones por SDS-PAGE (Figura 1B).

30 Análisis ELISA de interacciones Met-HGF

Se ensayo la capacidad de ectodominios Met para interactuar con HGF en ensayos de unión de ELISA. Se inmovilizaron receptores solubles (Met Decoy, Sema-PSI, Sema, PSI-IPT, IPT) en fase sólida y se expusieron a concentraciones crecientes de HGF activo. La unión se reveló usando anticuerpos anti-HGF biotinilados. Se determine la unión de HGF no específica usando albúmina sérica bovina (BSA) en fase sólida en lugar de dominios Met solubles. La afinidad de unión se determinó mediante análisis de regresión no lineal como se describe en Materiales y Procedimientos. En estas condiciones, Met Decoy unido a HGF con un valor de KD de aproximadamente 0,2 - 0,3 nM. Consistente con las mediciones previas, Sema-PSI y Sema unidos a HGF con una afinidad al menos un log menor comparada con Met Decoy. Sorprendentemente, tanto PSI-IPT como IPT unidos a HGF de manera muy eficaz, con casi la misma afinidad que Met Decoy (Figura 2A). La presencia o ausencia del dominio PSI no afectó a la afinidad de unión para HGF de o bien Sema o IPT. Ya que casi todos los dominios Sema encontrados hasta ahora en la naturaleza tienen un módulo PSI en su extremo C, por lo tanto los inventores continuaron el análisis de unión usando Met Decoy, Sema-PSI, e IPT.

Para determinar la afinidad de cada módulo Met para pro-HGF, HGF- α , HGF NK1 y HGF- β y para compararla con la de HGF activo, receptores modificados por ingeniería genética se inmovilizaron en fase sólida y se expusieron a concentraciones crecientes de ligandos marcados con MYC. La unión se reveló usando anticuerpos anti-MYC. La unión no específica se determinó usando la proteína angiostatina (AS) que contenía kringle también marcada con epítipo MYC en fase líquida. Pro-HGF, cadena α de HGF y HGF NK1, que representa el modulo de unión Met mínima de la cadena α de HGF, que se une a Met Decoy con una afinidad 3-, 4- y 10- veces reducida comparada con HGF activo, respectivamente (Figura 2B). La unión de HGF- β a Met Decoy (o a cualquier otro dominio Met) era demasiado bajo para detectarse en este tipo de ensayo. Sema-PSI unido a una afinidad significativa para activar HGF solamente, mientras que la unión a pro-HGF, HGF- α o HGF NK1 era indistinguible de la unión no específica (Figura 2C). Por el contrario, IPT unido a HGF activo, pro-HGF y HGF- α con la misma alta afinidad (Figura 2D). HGF NK1 unido a IPT 10 veces menos firmemente que HGF activo, es decir, con la misma afinidad que se une a Met Decoy. Estos datos sugieren que la región IPT de Met se une a la cadena α de HGF con alta afinidad independientemente del procesamiento proteolítico del ligando.

La cadena α de HGF se une a los dominios IPT 3 y 4 con alta afinidad

La región IPT de Met se extiende por aproximadamente 400 aminoácidos y contiene cuatro dominios IPT. Para mapear más exactamente la interfase IPT-HGF, se modificaron por ingeniería genética una serie de variantes de IPT que se suprimieron en uno o más dominios (Figura 3A). IPT Δ 1 e IPT Δ 1-2 son dos formas suprimidas N-terminal de IPT que carecen del primer o de los dos primeros dominios de tipo inmunoglobulina, respectivamente. IPT-3 e IPT-4 corresponden a los dos dominios de tipo inmunoglobulina C-terminales expresados como proteínas individuales. La producción y purificación de proteínas se realizó como se ha descrito anteriormente. Se investigó la capacidad de los IPT modificados por ingeniería genética interaccionan con la cadena α de HGF en ensayos de unión de ELISA usando la región completa de IPT como un control. IPT, IPT Δ 1, IPT Δ 1-2, IPT-3 e IPT-4 se inmovilizaron en fase sólida y se expusieron a concentraciones crecientes de HGF- α . La unión se reveló usando anticuerpos anti-HGF. La unión no específica se midió usando BSA como antes. Como se muestra en la Figura 3B, la supresión de los dos primeros dominios de tipo inmunoglobulina no afectaron sustancialmente a la unión de HGF.

De hecho, IPT Δ 1-2, una proteína que corresponde a los dos últimos dominios de tipo inmunoglobulina de Met, unidos a la cadena α de HGF con resistencia igual si no más alta que IPT. Sin embargo, la supresión adicional de o bien el tercero o cuarto dominio de tipo inmunoglobulina casi alteraban completamente la unión de HGF- α . Resultados similares se obtuvieron usando HGF activo o pro-HGF en lugar de HGF- α . Estos datos sugieren que los dos últimos dominios de tipo inmunoglobulina de Met, que caen cerca de la hélice transmembrana en el contexto de un auténtico Met, son suficientes para la unión de la cadena α de HGF con alta afinidad.

Los dominios IPT 3 y 4 son suficientes para la unión a HGF en células vivas.

Para determinar si HGF se puede unir a IPT 3 y 4 en el contexto de un receptor anclado a membrana, una proteína Met que lleva una gran supresión en la región extracelular se modificó por ingeniería genética. Los aminoácidos 25 - 741, que corresponden al dominio Sema (aa 25 - 515), el dominio PSI (aa 516 - 562) y los dos primeros dominios IPT (IPT 1 y 2, aa 563 - 741) se suprimieron generando un receptor recombinante que contiene los dominios 3 y 4 de IPT, la hélice transmembrana y la región citoplásmica completa (Figura 4A). El ADNc que codifica el receptor Met $_{\Delta$ 25-741 modificado por ingeniería genética se subclonó en el mismo vector lentiviral descrito anteriormente. Se usaron partículas lentivirales recombinantes para transducir la línea celular de carcinoma de ovario TOV-112D, que carece de expresión endógena de Met como se determina por análisis de RT-PCR (Michieli, P., et al. (2004) Cancer Cell 6 (1), 61 - 73). El análisis de biotilación de superficie reveló que Met $_{\Delta$ 25-741 se expresó apropiadamente y se expresó sobre la membrana de células TOV-112D (Figura 4B).

Para examinar si Met $_{\Delta$ 25-741 se puede unir a HGF, células transducidas por el vector lentiviral se incubaron en presencia o ausencia de HGF recombinante y posteriormente se trataron con el agente de reticulación BS3. Los lisados celulares se inmuno-precipitaron con un anticuerpo inducido contra la parte C-terminal de Met, se resolvieron por SDS PAGE y se analizaron por transferencia de Western usando anticuerpos anti-HGF biotilados. Como control, se realizó el mismo análisis sobre células TOV-112D naturales. Las inmunotransferencias mostraron una banda distinta con un peso molecular de aproximadamente 180 kD en la banda correspondiente a células que expresan Met $_{\Delta$ 25-741 tratadas con HGF pero no en las bandas que corresponden a las mismas células sin HGF o para las células TOV-112D naturales, o bien en la presencia o ausencia del ligando (Figura 4C). Considerando que tanto Met $_{\Delta$ 25-741 como HGF tienen un peso molecular de aproximadamente 90 kDa, la proteína reticulada inmuno-precipitada es compatible con un complejo formado por HGF más Met $_{\Delta$ 25-741.

La unión de HGF a los dominios IPT 3 y 4 da como resultado activación de Met en células vivas.

Los inventores a continuación ensayaron si la unión de HGF a Met $_{\Delta$ 25-741 puede inducir la activación de quinasa de Met. Con este fin, células TOV-112D transducidas por vector lentiviral se estimularon con pro-HGF o HGF activo, y los lisados de células se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-Met como antes. La activación del receptor se determinó por análisis de transferencia de Western usando anticuerpos anti-fosfotirosina. Las mismas transferencias se volvieron a sondear con anticuerpos anti-Met para normalizar la cantidad de receptor inmuno-precipitado. De manera notable, tanto pro-HGF como HGF activo eran capaces de inducir la fosforilación robusta de Met $_{\Delta$ 25-741 (Figura 4D). Ya que la unión de pro-HGF a Met de tamaño completo no induce la activación de quinasa, esto sugiere que el dominio Sema ejerce de alguna manera un efecto auto-inhibidor sobre la actividad catalítica de Met que se libera tras la unión a HGF activo. La estimulación del receptor también se realizó usando HGF NK1 y un ligando dimérico modificado por ingeniería genética constituido por dos fragmentos NK1 repetidos en tándem (NK1-NK1; Figura 4E). Como se muestra en la Figura 4D, NK1-NK1 la estimulación de células TOV-112D transducidas por el vector lentiviral dio como resultado una fosforilación potente de Met $_{\Delta$ 25-741, mientras que la estimulación NK1 monomérica no tenía efecto. Estos resultados sugieren que los dos dominios de IPT C-terminal de Met (IPT 3 y 4) son suficientes para unirse a HGF (y más precisamente a HGF NK1 que representa el módulo de unión de Met mínima en la cadena α de HGF) y para transmitir la señal para la activación del receptor al dominio quinasa citoplasmático, presumiblemente después de la dimerización del receptor inducido por ligando. Sin embargo, también sugieren que IPT 3 y 4 solos no son suficientes para distinguir la forma biológicamente activas de

HGF de su precursor inactivo, pro-HGF.

IPT soluble inhibe el crecimiento invasivo inducido por HGF in vitro.

5 En un estudio previo, se ha demostrado que la parte extracelular de Met expresada como una proteína soluble (Met Decoy) inhibe el crecimiento invasivo inducido por HGF tanto *in vitro* como en modelos de ratón de cáncer (Michieli P. et al. (2004) Cancer Cell 6(1), 61-73). También se mostró que Sema-PSI inhibe la fosforilación de Met tanto dependiente como independiente de ligando (Kong-Beltran M. et al. (2004) Cancer Cell 6(1), 75-84). Basándose en estos resultados, se ha ensayado si IPT soluble mostró actividad antagonista HGF/Met en células vivas. Células de melanoma humano MDA-MB-435, que expresan Met y son un modelo de sistema establecido para análisis de crecimiento invasivo mediado por HGF, se transdujeron con vectores lentivirales que codifican Met Decoy soluble, Sema-PSI o IPT. Las células transducidas con un vector vacío se usaron como control. Células transducidas por el vector lentiviral que secretan niveles comparables de factores solubles (aproximadamente 50 pmol/10⁶ células/24 horas) se privaron de suero durante varios días, permitiendo que los factores recombinante se acumulen en el medio, y después se estimularon con HGF recombinante. La fosforilación de Met tirosina se determine mediante inmunotransferencia con anticuerpos anti-fosfotirosina como se ha descrito anteriormente. Como se muestra en la Figura 5A, tanto de IPT como Sema-PSI inhibían parcialmente la fosforilación de Met inducida por HGF, mientras Met Decoy neutralizaban completamente la capacidad de HGF para inducir la activación de Met. El vowel a sonar las mismas inmunotransferencias con anticuerpos dirigidos contra la cola C-terminal de Met no reveló diferencia sustancial en las cantidades de proteína inmunoprecipitada.

20 Para ensayar la capacidad inhibidora de ectodominios Met en un planteamiento más biológico, se emplearon las mismas células para realizar un ensayo de morfogénesis de ramificación dependiente de HGF. Los esferoides de células formados previamente se sembraron en una matriz de colágeno de tres dimensiones y después se estimularon con HGF recombinante para formar estructuras tubulares. La ramificación se cuantificó mediante puntuación del número medio de túbulos que brotan de cada colonia. Como se muestra en la Figura 5B, tanto IPT soluble como Sema-PSI inhibían la ramificación de las colonias inducidas por HGF (Vector vacío, 17,5 túbulos/colonia; IPT, 4,0 túbulos/colonia; Sema- PSI, 6,7 túbulos/colonia). Sin embargo, consistente con los resultados obtenidos en los experimentos de fosforilación, Met Decoy era un inhibidor más potente de HGF que cualquiera de sus subdominios (2,5 túbulos/colonia). Imágenes representativas de la morfología de colonia se muestran en la Figura 5C.

30 IPT soluble muestra actividad anti-tumor y anti-metastática en ratones.

Los resultados anteriores sugirieron a los presentes inventores explorar el potencial terapéutico de IPT soluble en modelos de ratón de cáncer. Células de melanoma MDA-MB-435 transducidas por el vector lentiviral se inyectaron por vía subcutánea en ratones CD-1 nu-/-, y se controló el crecimiento del tumor con el tiempo. Después de aproximadamente tres semanas, se extrajeron tumores para análisis, y se sometieron los ratones a autopsia. En un análisis de tipo Kaplan-Meier, cuando el porcentaje de animales sin tumor se representa gráficamente frente al tiempo y la latencia de tumor se cuantifica calculando la mediana en días, todos los receptores solubles modificados por ingeniería genética retrasaron la aparición de tumores experimentales. Sin embargo, IPT era ligeramente más eficaz que Sema-PSI y Met Decoy era más potente que o bien IPT o Sema-PSI (Figura 6A). El análisis de la masa tumoral con el tiempo reveló que IPT era solamente menos eficaz que Met Decoy, mientras Sema-PSI inhibía el crecimiento neoplásico solamente durante las etapas muy tempranas del experimento (Figura 6B). El análisis inmuno-histoquímico de la expresión transgénica mostró que Met Decoy, Sema-PSI e IPT alcanzaron niveles y distribución similares en tumores (Figura 6C).

Como el HGF es un potente factor pro-angiogénico, se ha determinado si la inhibición de HGF/Met en tumores da como resultado una alteración en la angiogénesis. Se analizaron secciones de tumor por inmuno-histoquímica usando anticuerpos contra factor Von Willebrand, y se determinó la densidad de vasos por microscopía (Figura 6D). IPT disminuyó la densidad de vasos de tumores en 1,5 veces, mientras que Met Decoy logró una inhibición más fuerte (aproximadamente 4 veces); Sema-PSI no afectaba significativamente a la angiogénesis de tumor. Tras la autopsia, se extrajeron los pulmones de los ratones descritos anteriormente y se procesaron para histología. Las secciones de pulmón en serie se tiñeron con hematoxilina y eosina, y se analizaron por microscopía para determinar la presencia de micrometástasis. Los resultados se muestran en la Figura 6A. En el grupo de control, 4 de 6 ratones (67%) tenían micrometástasis. En el grupo IPT y Sema-PSI, se puede encontrar micrometástasis en solamente 1 de 6 ratones (17%), mientras no se puede encontrar metástasis en el grupo Met Decoy. Las lesiones metastásicas eran tanto parenquimales (extravasculares) como embolicas (intravasculares; véase la Figura 6F para las imágenes representativas).

55 La identificación del sitio de unión de alta afinidad HGF en el HGFR proporcionada en la presente descripción permite el diseño de procedimientos novedosos que conducen a la generación de inhibidores/antagonistas más

específicos de HGF y de HGFR. Los siguientes son ejemplos no limitantes de procedimientos novedosos para la identificación de inhibidores/antagonistas de HGF/HGFR que se dirigen al sitio de unión de alta afinidad de HGFR o la utilización del sitio de unión de alta afinidad de HGFR como una herramienta para generar inhibidores/antagonistas novedosos.

5 Desarrollo de un anticuerpo monoclonal que se une a los dominios extracelulares IPT-3 e IPT-4 de HGFR que evitan la unión de HGF

Dada que la interacción de HGF con los dominios extracelulares IPT-3 e IPT-4 es esencial para la unión de alta afinidad de HGF, se pueden generar anticuerpos monoclonales que se unen a IPT-3 e IPT-4 y compiten con HGF para la unión de HGFR. Esto se puede lograr mediante varias estrategias.

10 (A) Una proteína o péptido recombinantes derivados de IPT-3 e IPT-4 se genera mediante tecnología de modificación por ingeniería genética convencional o síntesis química. Esta proteína o péptido se inyecta en un animal de laboratorio apropiado (usualmente un ratón o rata) para dar lugar a una reacción inmune. Después se aislaron esplenocitos del animal inmunizado y se fusionó a una línea celular de mieloma, y se seleccionaron clones de hibridoma que producen anticuerpo mediante tecnología de anticuerpos monoclonales. Después se seleccionan anticuerpos dirigidos contra IPT-3 e IPT-4 por un procedimiento ELISA similar a los descritos a en esta descripción que utiliza IPT-3 e IPT-4 recombinantes en fase sólida y anticuerpos producidos por hibridoma en fase líquida. Unión se revela usando anticuerpos de inmuno-globulina anti-ratón que están disponibles comercialmente. De manera alternativa, se seleccionan anticuerpos por su capacidad para desplazar HGF recombinante (en fase líquida) de IPT-3 e IPT-4 (en fase sólida), o por su capacidad para inmunoprecipitar proteínas recombinantes IPT-3 e IPT-4.

(B) Una secuencia de polinucleótidos que codifica IPT-3 e IPT-4 insertada en un vector de expresión apropiado se inyecta directamente en un animal de laboratorio para proporcionar una respuesta inmune contra el producto génico. Anticuerpos dirigidos contra IPT-3 e IPT-4 después se aíslan y se seleccionan como se ha descrito anteriormente.

25 (C) Una secuencia de polinucleótidos que codifica IPT-3 e IPT-4 insertada en un vector de expresión apropiado se transfiere en una línea celular de mamífero que no expresa HGFR para obtener la expresión de IPT-3 e IPT-4 sobre la superficie celular. Las células que expresan IPT-3 e IPT-4 se inyectan después en un animal de laboratorio para dar lugar una respuesta inmune, y anticuerpos dirigidos contra IPT-3 e IPT-4 se aíslan y se seleccionan como se ha descrito anteriormente.

30 (D) Una genoteca de anticuerpos nativos generada por técnicas de modificación por ingeniería genética convencionales (por ejemplo por tecnología conocida como despliegue en fago) de linfocitos de mamíferos (preferiblemente humanos, por ejemplo de linfocitos que infiltran un tumor que expresan HGFR) se selecciona usando proteínas IPT-3 e IPT-4 recombinantes. Los clones positivos (es decir, los clones que se unen a IPT-3 e IPT-4 con alta afinidad) después se aíslan, se expanden y el anticuerpo se caracteriza bioquímicamente.

35 (E) Se aíslan linfocitos B de memoria humana de la sangre periférica de un paciente que alberga un tumor que expresa HGFR como se describe por diversos estudios que incluyen Traggiai E. et al. (2004) Nat Med. 10 (8), 871 - 875. una vez que los cultivos inmortalizados de los linfocitos B de memoria se han establecido, los expertos en la técnica pueden seleccionar linfocitos que secretan un anticuerpo dirigido contra IPT-3 e IPT-4 usando los procedimientos descritos en el presente documento anteriormente (A). Habiendo identificado tales linfocitos que producen anticuerpo, el anticuerpo deseado se puede clonar por la reacción en cadena de la polimerasa y procedimientos de modificación por ingeniería genética convencionales.

40 Identificación de un compuesto de ensayo que se une a dominios extracelulares IPT-3 e IPT-4 de HGFR que inhiben la actividad de HGFR

45 Con un planteamiento diferente, es posible aislar los compuestos de ensayo de diverso origen que se une al sitio de unión de alta afinidad de HGF de HGFR e interfieren con la activación de HGFR inducida por HGF. Esto se puede lograr mediante varias estrategias.

(A) Usando ensayos ELISA similares a los descritos en esta descripción, los expertos en la técnica pueden seleccionar una genoteca de compuestos (que incluye pero no se limita a una biblioteca química sintética, una genoteca de compuestos naturales, una genoteca de moléculas pequeñas, una biblioteca de péptidos) para agentes que desplazan la interacción de HGF con IPT-3 e IPT-4. En este tipo de ensayos, proteína de IPT-3 e IPT-4 recombinante se inmoviliza en fase sólida y se incubaba con una cantidad fija de HGF en fase líquida. Después de la exposición a los compuestos de la biblioteca, se mide la unión de HGF con anticuerpos anti-HGF comercialmente disponibles.

(B) Usando una línea celular que expresa una forma modificada por ingeniería genética del HGFR que no contiene

nada excepto los dominios IPT-3 e IPT-4 en la parte extracelular similar a la descrita en esta descripción (Met_{Δ25-741}), un experto en la técnica puede seleccionar una biblioteca de compuestos (que incluye pero no se limita a una biblioteca química sintética, una biblioteca de compuestos naturales, una biblioteca de moléculas pequeñas, una biblioteca de péptidos) para agentes que desplazan la interacción de HGF con IPT-3 e IPT-4 o inhiben la activación de HGFR inducida por HGF. Esto se puede lograr poniendo en contacto dichas células modificadas por ingeniería genética con la biblioteca y después midiendo la fosforilación de HGFR inducida por HGF como se describe en el presente estudio, o por otros medios que revelan la activación de HGFR incluyendo un ensayo de dispersión, un ensayo de invasión de matriz reconstituida, un ensayo de morfogénesis de ramificación, un ensayo de supervivencia de células u otros ensayos biológicos *in vitro* como se describe en Michieli, P. et al. (2004) Cancer Cell 6 (1), 61 - 73.

(C) Usando la línea celular modificada por ingeniería genética descrita anteriormente, un experto en la técnica puede seleccionar una genoteca (que incluye pero no se limita a una genoteca de expresión de ADNc, una genoteca de ARN de horquilla corta, una genoteca de ADN no codificante, una genoteca de nucleótidos al azar) para los polinucleótidos o productos génicos que desplazan la interacción de HGF con IPT-3 e IPT-4 o inhiben la activación de HGFR inducida por HGF. Esto se puede lograr mediante transfección, transducción o de cualquier modo introducción de la genoteca de nucleótidos en dichas células y después el ensayo de la capacidad de HGF de activar la forma suprimida de HGFR expresada por las mismas células. La activación de HGFR se mide como se describe en (B).

Ensayos funcionales ejemplares que miden la actividad biológica de los compuestos que se unen a dominios extracelulares IPT-3 e IPT-4 de HGFR

Cualquiera que sea la estrategia empleada para generar anticuerpos anti-IPT o compuestos de unión de IPT, el producto final (es decir, anticuerpos monoclonales dirigidos contra IPT-3 e IPT-4 o compuestos naturales o sintéticos que se unen a IPT-3 e IPT-4) se somete después a ensayos biológicos con el deseo de determinar si estos agentes tienen la capacidad de interferir con la actividad de HGFR. Estos ensayos se pueden realizar *in vitro* usando células de mamífero cultivadas o *in vivo* usando animales de laboratorio.

(A) ensayo de dispersión. Células epiteliales que crecen en colonias compactas en una placa Petri y que expresa HGFR se inducen para 'dispersión' mediante estimulación con HGF. Como resultado de la estimulación de HGF, las células en la placa Petri parecen más separadas y dispersas. Este ensayo se puede realizar en la presencia de varios compuestos de ensayo. Entre los compuestos ensayados, se puede identificar un inhibidor / antagonista de HGF/HGFR por la ausencia de un fenotipo dispersado en la respuesta a la estimulación de HGF.

(B) Ensayo de migración de células. Las células que expresan HGFR tienen la capacidad de migrar hacia gradiente de HGF. En otras palabras, las células se traen por quimiotaxis hacia mayores concentraciones de HGF. Esta capacidad se puede explotar para seleccionar inhibidores de HGF en un ensayo de cámara de Boyden. Las células se sembraron en la primera cámara y se aplicó HGF en la segunda cámara que está separada de la primera por una membrana porosa. Las células migran a través de la membrana y alcanzan la segunda cámara donde el HGF está más concentrado. Los agentes que inhiben este proceso se identifican como inhibidores/antagonistas de HGF/HGFR.

(C) Ensayo de migración de Transwell™ o ensayo de matriz reconstituida. Este es una variación del ensayo descrito en (B) en el que la membrana porosa se cubre con una capa de colágeno, Matrigel™, u otras matrices orgánicas reconstituidas. Las células tienen que digerir la matriz orgánica con el fin de migrar a través de ella. Éste es un ensayo más riguroso que mide la invasión mejor que la simple migración de células.

(D) Ensayo de invasión de colágeno o ensayo de morfogénesis de ramificación. En este ensayo, células de mamífero que expresan HGFR (preferiblemente células epiteliales o células de carcinoma) se siembran en una capa tridimensional de colágeno y después se dejan crecer hasta que forman esferoides de aproximadamente 1.000 células cada uno. De manera alternativa, se pueden formar previamente esferoides primero mediante incubación de las células durante toda una noche en placas de 96 pocillos no adherentes en la presencia de metilcelulosa como se describe en Michieli, P. et al. (2004) Cancer Cell 6 (1), 61 - 73. Una vez que se embeben los esferoides en la capa de colágeno, se estimulan con HGF y se incuban a 37°C. Esto da como resultado el brote de túbulos huecos de los esferoides; cada tubo está formado por varias células organizadas en una estructura tubular y polarizada de manera que exista un lado de la célula que ve el lumen y un segundo lado que mira el exterior del medio. A medida que el ensayo progresa los túbulos tienden a ramificarse y a formar una arquitectura más compleja. Este ensayo es altamente específico para HGF. Los agentes que inhiben este proceso tienen una alta probabilidad de representar antagonistas HGF/HGFR muy específicos.

(E) Ensayo mitogénico. El HGF tiene la capacidad de inducir la replicación del ADN y división celular en alguna célula que expresa HGFR. Las células más sensibles son ciertamente hepatocitos primarios, usualmente ratón o rata. Para ensayar la replicación de ADN inducida por HGF, células se privan de factores de crecimiento en suero y

después se estimulan con concentraciones crecientes de HGF. Poco tiempo después, se añade timidina radioactiva y las células se incuban a 37°C durante aproximadamente un día. Después de un lavado extensivo y fijación, se mide la timidina radioactiva incorporada en el ADN de la célula mediante recuento por centelleo líquido u otros procedimientos convencionales que permiten la cuantificación de la radiación.

5 (F) Ensayo de supervivencia. El HGF tiene la capacidad de proteger células que expresan HGFR contra la apoptosis o muerte celular programada. Esto se puede explotar para medir la actividad de HGFR en un ensayo de supervivencia. Células se incuban previamente con HGF y el compuesto de ensayo (inhibidor de HGFR potencial), y después se somete a un estímulo apoptótico tal como un fármaco tóxico, ausencia de adherencia, hipoxia, cloque térmico, radiación, o daño de ADN. Después de un intervalo de tiempo apropiado, se mide la muerte celular mediante procedimientos convencionales que incluyen TUNEL (Marcado del extremo Nick biotina-dUTP desoxinucleotidil transferasa Terminal), nucleosomas, fragmentación de ADN, actividad caspasa, tinción por colorante vital o cualquiera de sus variaciones.

15 (G) Ensayo de tumorigénesis en ratón. En este tipo de ensayo, la actividad de un inhibidor potencial de HGF/HGFR se ensaya directamente en un animal de laboratorio, preferiblemente un ratón o rata. Existen varios procedimientos para obtener un tumor en un ratón. La estrategia más utilizada es crear un heterotransplante, es decir, transplantar células tumorales (usualmente de origen humano) en un receptor animal (usualmente un ratón inmunodeficiente). Las células se pueden implantar por vía subcutánea (un procedimiento rápido y simple para obtener un tumor experimental) u ortotópicamente, es decir, en el mismo órgano en el que la célula tumoral se ha aislado (por ejemplo un carcinoma de mama en la almohadilla grasa mamaria, un carcinoma de colon en la mucosa del intestino, un hepatocarcinoma en el parénquima hepático y así sucesivamente). Cualquiera que sea el procedimiento empleado, inyección de células tumorales en un animal de laboratorio da lugar a un tumor experimental. Este animal que porta tumor se puede usar ahora para evaluar el potencial anti-tumor de los compuestos de ensayo. Los anticuerpos anti-HGF/HGFR o compuestos se pueden administrar a un animal que porta una lesión tumoral con señalización sin regulación de HGF/HGFR por el procedimiento existente más apropiado incluyendo inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, bomba osmótica, administración oral, supositorio, protocolo de terapia génica, administración local y así sucesivamente. Después de un período de tratamiento apropiado, el animal se sacrifica y su tumor y órganos se explantan para análisis.

30 (H) Ensayo de metastogénesis en ratón. La metástasis experimental se puede inducir en un ratón mediante inyección sistémica de células tumorales. Éstas estaban atrapadas en los capilares pulmonares y posteriormente se extravasaron para dar lugar a metástasis pulmonar. Éstas se pueden medir tras la autopsia mediante varios planteamientos incluyendo microscopía, análisis histológico, procedimientos inmuno-histoquímicos, formación de imágenes de cuerpo entero. Los compuestos de ensayo se se administran como se describe en (G).

35 (I) Protocolo de terapia génica. En el caso que el inhibidor de HGF/HGFR sea un anticuerpo, una proteína recombinante, un péptido o un ARN pequeño de interferencia, la administración al animal que lleva un tumor se puede lograr mediante un planteamiento de terapia génica. Esto consiste en introducir el polinucleótido deseado en el vector de distribución adecuado que se puede elegir entre vectores lentivirales, vectores adenovirales, vectores retrovirales, ADN desnudo o cualquiera de sus variaciones. La preparación del vector se puede administrar sistémicamente o localmente al tumor dependiendo del sitio del tumor, sobre el vector o sobre el histotipo del tumor. Los efectos biológicos de la terapia génica se analizan como se ha descrito para otros compuestos en (G).

40 **LISTADO DE SECUENCIAS**

[0048]

<110> Metheresis Translational Research SA

<120> Sitio de unión de alta afinidad de HGFR y procedimientos para la identificación de antagonistas del mismo

<130> BEX10941-CF

45 <160> 21

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 7425

<212> ADN

50 <213> Artificial

ES 2 368 603 T3

<220>

<223> pRRLsin.PPT.CMV.eGFP.Wpre (la secuencia de codificación de eGFP comienza en el nucleótido 4756 y finaliza en el nucleótido 5475)

<400> 1

```

cagggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttattt ttctaaatac      60
attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aacctgata aatgcttcaa taatattgaa      120
aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat      180
tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc      240
agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga      300
gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg      360
cggattatc cgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc      420
agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcattgacag      480
taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtgataa cactgcggcc aacttacttc      540
tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg      600
taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg      660
acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac      720
ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac      780
cacttctgcg ctcgccctt ccggctgget ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg      840
agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg      900
tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg      960
agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac     1020
tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg     1080
ataatctcat gaccaaatac ccttaacgtg agttttcggt ccactgagcg tcagaccccg     1140
tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc     1200
aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc     1260

```

ES 2 368 603 T3

tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt 1320
 agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc 1380
 taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttgact 1440
 caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tCGTgcacac 1500
 agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag 1560
 aaagcggccac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta tccggtaacg ggcagggtcg 1620
 gaacaggaga ggcacagagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg 1680
 tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttctg atgctcgtca gggggcgga 1740
 gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tGctggcctt 1800
 ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct 1860
 ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcagc tcagtgagcg 1920
 aggaagcggg agagcgccca atacgcaaac cgctctccc cgcgcttg cGgattcatt 1980
 aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta 2040
 atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggccttaca cttatgctt ccggctcgta 2100
 tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aacagctat gaccatgatt 2160
 acgccaagcg cgcaattaac cctcactaaa gggaacaaaa gctggagctg caagcttaat 2220
 gtagtcttat gcaatactct tgtagtcttg caacatggta acgatgagtt agcaacatgc 2280
 cttacaagga gagaaaaagc accgtgcatg ccgattggtg gaagtaaggt ggtacgatcg 2340
 tgccttatta ggaaggaac agacgggtct gacatggatt ggacgaacca ctgaattgcc 2400
 gcattgcaga gatattgtat ttaagtgcct agctcgatac aataaacggg tctctctggt 2460
 tagaccagat ctgagcctgg gagctctctg gctaactagg gaaccactg cttAagcctc 2520
 aataaagctt gccttgagtg cttcaagtag tgtgtgcccg tctgttgtgt gactctggta 2580
 actagagatc cctcagaccc ttttagtcag tgtggaaaat ctctagcagt ggcgcccga 2640
 cagggacctg aaagcgaag ggaaccaga gctctctcga cgcaggactc ggcttgctga 2700
 agcgcgcacg gcaagaggcg agggcgggc actggtgagt acgcaaaaa ttttgactag 2760
 cggaggctag aaggagagag atgggtgcca gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag 2820
 atcgcgatgg gaaaaaatc ggtaaggcc agggggaaag aaaaaatata aattaaaaca 2880
 tatagtatgg gcaagcaggg agctagaacg attcgcagtt aatcctggcc tgtagaaac 2940
 atcagaaggc tgtagacaaa tactgggaca gctacaacca tcccttcaga caggatcaga 3000
 agaacttaga tcattatata atacagtagc aaccctctat tgtgtgcatc aaaggataga 3060
 gataaaagac accaaggaag ctttagacaa gatagaggaa gagcaaaaca aaagtaagac 3120
 caccgcacag caagcgccg ctgatcttca gacctggagg aggagatatg agggacaatt 3180
 ggagaagtga attatataaa tataaagtag taaaattga accattagga gtagcaccca 3240

ES 2 368 603 T3

ccaaggcaaa gagaagagtg gtgcagagag aaaaaagagc agtgggaata ggagctttgt 3300
 tccttgggtt cttgggagca gcaggaagca ctatgggagc agcctcaatg acgctgacgg 3360
 tacaggccag acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaatttg ctgagggcta 3420
 ttgagggcga acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag ctccaggcaa 3480
 gaatcctggc tgtggaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttgc 3540
 ctggaaaact catttgcacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc 3600
 tggaacagat ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca 3660
 caagcttaat aactcctta attgaagaat cgcaaaacca gcaagaaaag aatgaacaag 3720
 aattattgga attagataaa tgggcaagtt tgtggaattg gtttaacata acaaatggc 3780
 tgtggtatat aaaattattc ataatgatag taggaggctt ggtaggttta agaatagttt 3840
 ttgctgtact ttctatagtg aatagagtta ggcagggata ttcaccatta tcgtttcaga 3900
 cccacctccc aaccccgagg ggacctgaca ggcccgaagg aatagaagaa gaaggtggag 3960
 agagagacag agacagatcc attcgattag tgaacggatc tcgacggtta acttttaaaa 4020
 gaaaaggggg gattgggggg tacagtgcag gggaaagaat agtagacata atagcaacag 4080
 acatacaaac taaagaatta caaaaacaaa ttacaaaaat tcaaaatttt atcgataagc 4140
 ttgggagttc cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga 4200
 cccccgcca ttgacgtcaa taatgacgta tgttccata gtaacgcaa tagggacttt 4260
 ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt 4320
 gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaattggc ccgcctggca 4380
 ttatgcccag tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt 4440
 catcgctatt accatggtga tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt 4500
 tgactcacgg ggatttccaa gtctccacc cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca 4560
 ccaaatcaa cgggactttc caaatgtcg taacaactcc gccccattga cgcaaatggg 4620
 cggtaggcgt gtacgggtgg aggtctatat aagcagagct cgtttagtga accgtcagat 4680
 cgctggaga cgccatccac gctgttttga cctccataga agacaccgac tctagaggat 4740
 ccaccggtcg ccaccatggt gagcaagggc gaggagctgt tcaccggggg ggtgcccatc 4800
 ctggtcgagc tggacggcga cgtaaacggc cacaagttca gcgtgtccgg cgagggcgag 4860
 ggcgatgcca cctacggcaa gctgacctg aagtcatct gcaccaccg caagctgcc 4920
 gtgccctggc ccaccctcgt gaccacctg acctacggcg tgcagtgctt cagccgctac 4980
 cccgaccaca tgaagcagca cgacttcttc aagtccgcca tgcccgaagg ctacgtccag 5040
 gagcgacca tcttcttcaa ggacgacggc aactacaaga cccgcgccga ggtgaagttc 5100
 gagggcgaca cctggtgaa ccgcatcgag ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc 5160

ES 2 368 603 T3

aacatcctgg ggcacaagct ggagtacaac tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc 5220
 gacaagcaga agaacggcat caaggtgaac ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc 5280
 agcgtgcagc tcgccgacca ctaccagcag aacacccccca tcggcgacgg ccccgtgctg 5340
 ctgcccgaca accactacct gagcaccag tccgccctga gcaaagacc caacgagaag 5400
 cgcgatcaca tggctctgct ggagttcgtg accgccgccg ggatcactct cggcatggac 5460
 gagctgtaca agtaaagcgg ccgcgtcgac aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa 5520
 agattgactg gtattcttaa ctatgttgct ctttttacgc tatgtggata cgctgcttta 5580
 atgcctttgt atcatgctat tgcttcccgt atggctttca ttttctctc cttgtataaa 5640
 tcttggttgc tgtctcttta tgaggagtgt tggcccgttgc tcaggcaacg tggcgtgggtg 5700
 tgactgtgt ttgctgacgc aacccccact ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc 5760
 ctttcggga ctttcgcttt ccccctcctc attgccacgg cggaaactcat cgccgcctgc 5820
 cttgccgct gctggacagg ggctcggctg ttgggcaactg acaattccgt ggtgttgcg 5880
 gggaaactga cgtcctttcc atggctgctc gcctgtgttg ccacctggat tctgcgcggg 5940
 acgtccttct gctacgtccc ttcggccctc aatccagcgg accttcctc ccgcggcctg 6000
 ctgccggctc tggggcctct tccgcgtctt cgccttcgcc ctcagacgag tcggatctcc 6060
 ctttgggccc cctccccgcc tggaaactga gctcgggtacc ttttaagacca atgacttaca 6120
 aggcagctgt agatcttagc cactttttaa aagaaaaggg gggactggaa gggctaattc 6180
 actoccaacg aagacaagat ctgctttttg cttgtactgg gtctctctgg ttagaccaga 6240
 tctgagcctg ggagctctct ggctaactag ggaacccact gcttaagcct caataaagct 6300
 tgccttgagt gcttcaagta gtgtgtgccc gtctgttgtg tgactctggt aactagagat 6360
 ccctcagacc ctttttagtca gtgtggaaaa tctctagcag tagtagttca tgtcatctta 6420
 ttattcagta tttataactt gcaaagaaat gaatatcaga gagtgagagg aacttgttta 6480
 ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat 6540
 ttttttcaact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct 6600
 ggctctagct atccccccc taactccgcc cagttccgcc cattctcgc cccatggctg 6660
 actaattttt tttatttatg cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa 6720
 gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg cttttgcgtc gagacgtacc caattcgccc 6780
 tatagtgagt cgtattacgc gcgctcactg gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa 6840
 aacctggcg ttaccaact taatcgcctt gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt 6900
 aatagcgaag aggccccgac cgatcgcctt tccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa 6960
 tggcgcgacg cgcctgtag cggcgcatta agcgcggcgg gtgtgggtgt tacgcgcagc 7020
 gtgaccgcta cacttgccag cgccttagcg cccgctcctt tcgctttctt cccttccttt 7080
 ctcgccacgt tcgccggcct tccccgtaa gctctaaatc gggggctccc tttagggttc 7140

ES 2 368 603 T3

```
cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg attaggggtga tggttcacgt 7200
agtgggcat cgccctgata gacggttttt cgcccttga cgttggagtc cacgttcttt 7260
aatagtggac tcttgttcca aactggaaca aactcaacc ctatctcggc ctattctttt 7320
gattataag ggattttgcc gatttcggcc tattgggtaa aaaatgagct gatttaaaa 7380
aaatttaacg cgaattttaa caaaatatta acgtttataa tttcc 7425
```

<210> 2

<211> 2886

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de Met Decoy_FLAGhis

<400> 2

ES 2 368 603 T3

atgaaggccc	ccgctgtgct	tgcacctggc	atcctcgtgc	tctgttttac	cttgggtgcag	60
aggagcaatg	gggagtgtaa	agaggcacta	gcaaagtccg	agatgaatgt	gaatatgaag	120
tatcagcttc	ccaacttcac	cgcggaaca	cccattccaga	atgtcattct	acatgagcat	180
cacatthttcc	ttggtgccac	taactacatt	tatgtthttaa	atgaggaaga	ccttcagaag	240
gttgctgagt	acaagactgg	gcctgtgctg	gaacaccag	attgtthttcc	atgtcaggac	300
tgcagcagca	aagccaatth	atcaggaggt	gtthtgaaag	ataacatcaa	catggctcta	360
gttgctgcaca	cctactatga	tgatcaactc	attagctgtg	gcagcgtcaa	cagagggacc	420
tgccagcgcac	atgtctthttcc	ccacaatcat	actgctgcaca	tacagtcgga	ggttcactgc	480
atattctccc	cacagataga	agagcccagc	cagtgtcctg	actgtgtggt	gagcgccttg	540
ggagccaaag	tcctthtcatc	tgtaaaggac	cgthtcatca	actthtttgt	aggcaatacc	600
ataaattctt	cttattthttcc	agatcatcca	ttgcattcga	tatcagtgcag	aaggctaaag	660
gaaacgaaag	atggtthttat	gtthttgacg	gaccagtcct	acattgatgt	thttacctgag	720
ttcagagatt	cttaccctcat	taagtatgtc	catgccttht	aaagcaaca	thttatttac	780
thtttgacgg	thccaaaggga	aactctagat	gctcagactt	thcacacaag	aataatcagg	840
thctgtthcca	thaaactctgg	attgcattcc	tacatggaaa	tgctctgga	gtgtattctc	900
acagaaaaga	gaaaaaagag	atccacaag	aagggaagtgt	thaatatact	tcaggctgcg	960
tatgtcagca	agctggggc	ccagcttgct	agacaaatag	gagccagcct	gaatgatgac	1020
attctthttcg	gggtgttcgc	acaagcaag	ccagattctg	ccgaaccaat	ggatcgatct	1080
gccatgtgtg	cattccctat	caaataatgtc	aacgacttht	tcaacaagat	cgtcaacaaa	1140
aacaatgtga	gatgtctcca	gcattthttac	ggacccaatc	atgagcactg	ctthaatagg	1200
acactthtga	gaaatthcatc	aggctgtgaa	gcgcgccgtg	atgaatctg	aacagagtht	1260
accacagctt	tgcagcgcgt	tgactthattc	atgggtcaat	tcagcgaagt	cctctthaca	1320

ES 2 368 603 T3

tctatatcca ccttcattaa aggagacctc accatagcta atcttgggac atcagagggt 1380
 cgcttcatgc aggttgtggg ttctcgatca ggaccatcaa cccctcatgt gaatthttctc 1440
 ctggactccc atccagtgtc tccagaagtg attgtggagc atacattaaa ccaaaatggc 1500
 tacacactgg ttatcactgg gaagaagatc acgaagatcc cattgaatgg cttgggctgc 1560
 agacatthtc agtcctgcag tcaatgcctc tctgccccac cctttgttca gtgtggctgg 1620
 tgccacgaca aatgtgtgcy atcggaggaa tgcctgagcy ggacatggac tcaacagatc 1680
 tgtctgctg caatctacaa ggtthttccca aatagtgcac cccttgaagg agggacaagg 1740
 ctgaccatat gtggctggga ctttggattt cggaggaata ataaatttga thtaagaaa 1800
 actagagttc tccttgaaa tgagagctgc accttgactt taagtgagag cacgatgaat 1860
 acattgaaat gcacagttgg tcctgcatg aataagcatt tcaatatgtc cataattatt 1920
 tcaaatggcc acgggacaac acaatacagt acattctcct atgtggatcc tgtaataaca 1980
 agtatttctc cgaaatacgg tcctatggct ggtggcactt tacttacttt aactggaat 2040
 tacctaaaca gtgggaattc tagacacatt tcaattggtg gaaaaacatg tactthtaaaa 2100
 agtgtgtcaa acagtattct tgaatgttat accccagccc aaaccatttc aactgagttt 2160
 gctgtthaat tgaaaattga cttagccaac cgagagacaa gcatcttcag ttaccgtgaa 2220
 gatcccattg tctatgaaat tcatccaacc aaatctthta ttagtgggtgg gagcacaata 2280
 acaggtgttg ggaaaaacct gaattcagtt agtgtcccga gaatggatc ataatgtgat 2340
 gaagcaggaa ggaactthac agtggcatgt caacatcgtc ctaattcaga gataatctgt 2400
 tgtaccactc cttccctgca acagctgaat ctgcaactcc ccctgaaaac caaagcctth 2460
 thcatgttag atgggatcct thccaatac thtgatctca thtatgtaca taatcctgtg 2520
 thtaagcctt thgaaaagcc agtgatgatc tcaatgggca atgaaaatgt actggaatt 2580
 aagggaatg atattgacct tgaagcagtt aaaggtgaag tgtthaaagt tggaaataag 2640
 agctgtgaga atatacactt acattctgaa gccgtthtat gcacggatcc caatgacctg 2700
 ctgaaattga acagcgagct aatatagag tggaagcaag caatthcttc aaccgtcctt 2760
 ggaaaagtaa tagttcaacc agatcagaat thcacagcta gctctgacta caaggacgac 2820
 gatgacaaga gcgattacaa agacgatgat gataagctgc agcatcacca ccatcatcac 2880
 cattga 2886

<210> 3

<211> 1590

ES 2 368 603 T3

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de Sema_FLAGhis

5 <400> 3

atgaaggccc ccgctgtgct tgcacctggc atcctcgtgc tcctgtttac cttggtgcag 60

ES 2 368 603 T3

aggagcaatg gggagtgtaa agaggcacta gcaaagtccg agatgaatgt gaatatgaag 120
tadcagcttc ccaacttcac cgcggaaaca cccatccaga atgtcattct acatgagcat 180
cacatthttcc ttggtgccac taactacatt tatgthttta atgaggaaga ccttcagaag 240
gttgctgagt acaagactgg gctgtgtgtg gaacaccag attgthttccc atgtcaggac 300
tgcagcagca aagccaatth atcaggaggt gthttgaaag ataacatcaa catggctcta 360
gthgtcgaca cctactatga tgatcaactc attagctgtg gcagcgtcaa cagagggacc 420
tgccagcgac atgtctthttc ccacaatcat actgtgtgaca tacagtcgga gthttcactgc 480
atathttccc cacagataga agagcccagc cagtgtctctg actgtgtggt gagcgccttg 540
ggagccaaag tcctthttcatc tgtaaaggac cggthttcatca acttctthttgt aggcaatacc 600
ataaathttctt cthttthttccc agatcatcca thgtcattoga tadcagtgag aaggctaaag 660
gaaacgaaag atggtthttat gthttthgtacg gaccagtcct acathgtatgt thttacctgag 720
thcagagatt cthttcccat taagtatgtc catgcctthtg aaagcaaaa thttthtttac 780
thctthgtacgg thcaaagggg aactctagat gctcagactt thcacacaag aataatcagg 840
thctgtthcca thaaactctgg athgtcattcc tacatggaaa tgctctgga gthgtattctc 900
acagaaaaga gaaaaagag atccacaaag aagggaagtgt thaatatact thcaggctgcg 960
tatgtcagca agcctggggc ccagctthgt agacaaatag gagccagcct gaatgatgac 1020
athctthttcg gggthgttcgc acaaagcaag ccagathctg ccgaaccaat ggatcgatct 1080
gcatgtgtg cattccctat caaatatgtc aacgactthct thacaagat cgtcaaaaa 1140
aacaatgtga gatgtctcca gcaththttac ggaccaatc atgagcactg cththaatagg 1200
acathttctga gaaathttatc aggctgtgaa gcgcgcctgt atgaatathc aacagagtht 1260
accacagctt tgcagcgcgt tgactthttc atgggtcaat thcagcgaagt cctctthaaa 1320
thtatathcca cthttathaa aggagacctc accathagcta athctthggac athcagaggt 1380
cgctthcatgc aggtthgtggt thctcgatca ggaccathcaa cccctcatgt gaaththttctc 1440
ctggactccc athcagtgct tccagaagtg athgtggagc athaththaaa ccaaaatggc 1500
gctagctctg actacaagga cgacgatgac aagagcgatt acaaagacga tgatgataag 1560
ctgcagcatc accaccathca thcaccathag 1590

<210> 4

<211> 1779

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de Sema-PSI_FLAGhis

<400> 4

atgaaggccc ccgctgtgct tgcacctggc atcctcgtgc tcctgtttac cttggtgcag 60

ES 2 368 603 T3

aggagcaatg gggagtgtaa agaggcacta gcaaagtcg agatgaatgt gaatatgaag 120
tadcagcttc ccaacttcac cgcggaaaca cccatccaga atgtcattct acatgagcat 180
cacattttcc ttggtgccac taactacatt tatgttttaa atgaggaaga ccttcagaag 240
gttgctgagt acaagactgg gctgtgctg gaacaccag attgtttccc atgtcaggac 300
tgcagcagca aagccaatth atcaggaggt gtttgaaag ataacatcaa catggctcta 360
gttgctgaca cctactatga tgatcaactc attagctgtg gcagcgtcaa cagagggacc 420
tgccagcgcac atgtctttcc ccacaatcat actgctgaca tacagtcgga ggttcaactgc 480
atattctccc cacagataga agagcccagc cagtgtcctg actgtgtggt gagcgcctg 540
ggagccaaag tcctttcatc tgtaaaggac cggttcatca acttctttgt aggcaatacc 600
ataaattctt cttattttccc agatcatcca ttgcattcga tatcagtgag aaggctaaag 660
gaaacgaaag atggttttat gtttttgacg gaccagtctt acattgatgt tttacctgag 720
ttcagagatt cttaccccat taagtatgtc catgcctttg aaagcaacaa ttttatttac 780
ttcttgacgg tccaaagggg aactctagat gctcagactt ttcacacaag aataatcagg 840
ttctgttcca taaactctgg attgcattcc tacatggaaa tgcctctgga gtgtattctc 900
acagaaaaga gaaaaaagag atccacaaag aaggaagtgt ttaatatact tcaggctgcg 960
tatgtcagca agcctggggc ccagcttgct agacaaatag gagccagcct gaatgatgac 1020
attcttttcg ggggtgttcgc acaaagcaag ccagattctg ccgaaccaat ggatcgatct 1080
gccatgtgtg cattccctat caaatatgtc aacgacttct tcaacaagat cgtcaacaaa 1140
aacaatgtga gatgtctcca gcatttttac ggacccaatc atgagcactg ctttaatagg 1200
acacttctga gaaattcatc aggctgtgaa ggcgcgccgtg atgaatatcg aacagagttt 1260
accacagctt tgcagcgcgt tgacttattc atgggtcaat tcagcgaagt cctcttaaca 1320
tctatatcca ccttcattaa aggagacctc accatagcta atcttgggac atcagaggggt 1380
cgcttcatgc aggttgtggt ttctcgatca ggaccatcaa cccctcatgt gaattttctc 1440
ctggactccc atccagtgtc tccagaagtg attgtggagc atacattaaa ccaaatggc 1500
tacacactgg ttatcactgg gaagaagatc acgaagatcc cattgaatgg cttgggctgc 1560
agacatttcc agtcctgcag tcaatgcctc tctgccccac cttttgttca gtgtggctgg 1620
tgccacgaca aatgtgtgcg atcggaggaa tgcctgagcg ggacatggac tcaacagatc 1680
tgtctgggag ctagctctga ctacaaggac gacgatgaca agagcgatta caaagacgat 1740
gatgataagc tgcagcatca ccaccatcat caccattga 1779

<210> 5

ES 2 368 603 T3

<211> 1458

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia de codificación de PSI-IPT_FLAGhis

<400> 5

```

atgaaggccc ccgctgtgct tgcacctggc atcctcgtgc tcctgtttac cttggtgcag      60
aggagcaatg ggtacacact ggttatcact gggaagaaga tcacgaagat cccattgaat      120
ggcttgggct gcagacatth ccagtcctgc agtcaatgcc tctctgcccc accctttgth      180
cagtgtggct ggtgccacga caaatgtgtg cgatcggagg aatgcctgag cgggacatgg      240
actcaacaga tctgtctgcc tgcaatctac aaggthttcc caaatagtgc accccttgaa      300
ggagggacaa ggctgaccat atgtggctgg gactttggat ttcggaggaa taataaattt      360
gatttaaaga aaactagagt tctccttggg aatgagagct gcaccttgac tttaatgag      420
agcacgatga atacattgaa atgcacagth ggtcctgcca tgaataagca tttcaatatg      480
tccataatta tttcaaatgg ccacgggaca acacaatata gtacattctc ctatgtggat      540
cctgtaataa caagtatttc gccgaaatac ggtcctatgg ctggtggcac tttacttact      600
ttaactggaa attacctaaa cagtgggaat tctagacaca tttcaattgg tggaaaaaca      660
tgtactttaa aaagtgtgtc aaacagtatt ctgfaatgtt ataccccagc ccaaaccatt      720
tcaactgagt ttgctgttaa attgaaaatt gacttagcca accgagagac aagcatcttc      780
agttaccgtg aagatcccat tgtctatgaa atthcatcaa ccaaatctth tattagtggth      840
gggagcacia taacaggtgt tgggaaaaac ctgaattcag ttagtgtccc gagaatggth      900
ataaatgtgc atgaagcagg aaggaactth acagtggcat gtcaacatcg ctctaattca      960
gagataatct gttgtaccac tccttccttg caacagctga atctgcaact cccctgaaa     1020
accaaagcct ttttcatgth agatgggath ctttccaaat actthgatct cattthtgta     1080
cataatcttg tgtthaagcc ttttgaaaag ccagtgatga tctcaatggg caatgaaaat     1140
gtactggaaa ttaagggaaa tgatattgac cctgaagcag ttaaaggtga agtgthaaaa     1200
gttggaataa agagctgtga gaatatacac ttacattctg aagccgthth atgcacggth     1260
cccaatgacc tgctgaaatt gaacagcgag ctaaataatag agtggaagca agcaattthct     1320
tcaaccgtcc ttggaaaagt aatagthtcaa ccagatcaga atthcacagc tagctctgac     1380
tacaaggacg acgatgacaa gagcgattac aaagacgatg atgataagct gcagcatcac     1440
caccatcatc accattag                                     1458

```

ES 2 368 603 T3

<210> 6

<211> 1290

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Secuencia de codificación de IPT_FLAGHis

<400> 6

```

atgaaggccc cgcgtgtgct tgcacctggc atcctcgtgc tcctgtttac cttggtgcag      60

aggagcaatg gggagggggg cgttggatcc cctgcaatct acaaggtttt cccaaatagt      120
gcacccttg aaggaggac aaggctgacc atatgtggct gggactttgg atttcggagg      180
aataataaat ttgatttaa gaaaactaga gttctccttg gaaatgagag ctgcaccttg      240
actttaagtg agagcacgat gaatacattg aatgcacag ttggtcctgc catgaataag      300
catttcaata tgtccataat tatttcaaat ggccacggga caacacaata cagtacattc      360
tcctatgtgg atcctgtaat aacaagtatt tcgccgaaat acggtcctat ggctgggtggc      420
actttactta ctttaactgg aaattaccta aacagtggga attctagaca catttcaatt      480
ggtggaaaaa catgtacttt aaaaagtgtg tcaaacagta ttcttgaatg ttatacccca      540
gccccaaacca tttcaactga gtttgctggt aaattgaaaa ttgacttagc caaccgagag      600
acaagcatct tcagttaccg tgaagatccc attgtctatg aaattcatcc aaccaaatct      660
tttattagtg gtgggagcac aataacagggt gttgggaaaa acctgaattc agttagtgtc      720
ccgagaatgg tcataaatgt gcatgaagca ggaaggaact ttacagtggc atgtcaacat      780
cgctctaatt cagagataat ctggtgtacc actccttccc tgcaacagct gaatctgcaa      840
ctccccctga aaaccaaagc ctttttcatg ttagatggga tcctttccaa atactttgat      900
ctcatttatg tacataatcc tgtgtttaag ccttttgaaa agccagtgat gatctcaatg      960
ggcaatgaaa atgtactgga aattaaggga aatgatattg accctgaagc agttaaaggt     1020
gaagtgttaa aagttggaaa taagagctgt gagaatatac acttacattc tgaagccggt     1080
ttatgcacgg tccccaatga cctgctgaaa ttgaacagcg agctaaatat agagtggaag     1140
caagcaattt cttcaaccgt ccttggaaaa gtaatagttc aaccagatca gaatttcaca     1200
gctagctctg actacaagga cgacgatgac aagagcgatt acaaagacga tgatgataag     1260
ctgcagcatc accaccatca tcaccattga                                     1290

```

10 <210> 7

<211> 1008

ES 2 368 603 T3

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de IPTdelta1_FLAGHis

5 <400> 7

```

atgaaggccc cgcctgtgct tgcacctggc atcctcgtgc tccctgtttac cttggtgcag      60
aggagcaatg gggagggggg cggtggatct cctgtaataa caagtatttc gccgaaatac      120
ggtcctatgg ctggtggcac tttacttact ttaactggaa attacctaaa cagtgggaat      180
tctagacaca tttcaattgg tggaaaaaca tgtactttaa aaagtgtgtc aacagttatt      240
cttgaatggt ataccccagc ccaaaccatt tcaactgagt ttgctgttaa attgaaaatt      300
gacttagcca accgagagac aagcatcttc agttaccgtg aagatcccat tgtctatgaa      360
attcatccaa ccaaactctt tattagtggg gggagcacia taacaggtgt tgggaaaaac      420

ctgaattcag ttagtgtccc gagaatggtc ataaatgtgc atgaagcagg aaggaacttt      480
acagtggcat gtcaacatcg ctctaattca gagataatct gttgtaccac tccttccttg      540
caacagctga atctgcaact ccccctgaaa accaaagcct ttttcatggt agatgggatc      600
ctttccaaat actttgatct catttatgta cataatcctg tgtttaagcc ttttgaaaag      660
ccagtgatga tctcaatggg caatgaaaat gtactggaaa ttaagggaaa tgatattgac      720
cctgaagcag ttaaaggtga agtggttaaaa gttggaaata agagctgtga gaatatacac      780
ttacattctg aagccgtttt atgcacggtc cccaatgacc tgctgaaatt gaacagcgag      840
ctaaatatag agtggagca agcaatttct tcaaccgtcc ttggaaaagt aatagttcaa      900
ccagatcaga atttcacagc tagctctgac tacaaggacg acgatgaaa gagcgattac      960
aaagacgatg atgataagct gcagcatcac caccatcatc accattga      1008

```

<210> 8

<211> 753

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de IPTdelta1-2_FLAGHis

<400> 8

ES 2 368 603 T3

atgaaggccc ccgctgtgct tgcacctggc atcctcgtgc tcctgtttac cttggtgcag 60
 aggagcaatg gggagggggg cggatgatct cccattgtct atgaaattca tccaaccaa 120
 tcttttatta gtggtgggag cacaataaca ggtgttggga aaaacctgaa ttcagttagt 180
 gtcccagaaa tggtcataaa tgtgcatgaa gcaggaagga actttacagt ggcatgtcaa 240
 catcgctcta attcagagat aatctgttgt accactcctt cctgcaaca gctgaatctg 300
 caactcccc tgaaaaccaa agcctttttc atgttagatg ggatccttc caaatacttt 360
 gatctcattt atgtacataa tcctgtgttt aagccttttg aaaagccagt gatgatctca 420
 atgggcaatg aaaatgtact ggaaattaag ggaaatgata ttgacctga agcagttaaa 480
 ggtgaagtgt taaaagttgg aaataagagc tgtgagaata tacacttaca ttctgaagcc 540
 gttttatgca cggccccaa tgacctgctg aaattgaaca gcgagctaaa tatagagtgg 600
 aagcaagcaa tttcttcaac cgtccttggg aaagtaatag ttcaaccaga tcagaatttc 660
 acagctagct ctgactacaa ggacgacgat gacaagagcg attacaaaga cgatgatgat 720
 aagctgcagc atcaccacca tcatcaccat tga 753

<210> 9

<211> 471

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de IPT3_FLAGhis

<400> 9

atgaaggccc ccgctgtgct tgcacctggc atcctcgtgc tcctgtttac cttggtgcag 60
 aggagcaatg gggagggggg cggatgatct cccattgtct atgaaattca tccaaccaa 120
 tcttttatta gtggtgggag cacaataaca ggtgttggga aaaacctgaa ttcagttagt 180
 gtcccagaaa tggtcataaa tgtgcatgaa gcaggaagga actttacagt ggcatgtcaa 240
 catcgctcta attcagagat aatctgttgt accactcctt cctgcaaca gctgaatctg 300
 caactcccc tgaaaaccaa agcctttttc atgttagatg ggatccttc caaatacttt 360
 gatctcattt atgtacataa tgctagctct gactacaagg acgacgatga caagagcgat 420
 tacaagagc atgatgataa gctgcagcat caccaccatc atcaccattg a 471

10 <210> 10

<211> 462

<212> ADN

ES 2 368 603 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de IPT4_FLAGhis

<400> 10

```
atgaaggccc ccgctgtgct tgcacctggc atcctcgtgc tcctgtttac cttggtgcag      60
aggagcaatg gggagggggg cggtgatct cctgtgttta agccttttga aaagccagtg      120
atgatctcaa tgggcaatga aaatgtactg gaaattaagg gaaatgatat tgacctgaa      180
gcagttaaag gtgaagtgtt aaaagttgga aataagagct gtgagaatat acacttacat      240
tctgaagccg ttttatgcac ggtccccaat gacctgctga aattgaacag cgagctaaat      300
atagagtgga agcaagcaat ttcttcaacc gtccttgaa aagtaatagt tcaaccagat      360
cagaatttca cagctagctc tgactacaag gacgacgatg acaagagcga ttacaaagac      420
gatgatgata agctgcagca tcaccacat catcaccatt ga                          462
```

5

<210> 11

<211> 2040

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Secuencia de codificación para Met delta 25-741

<400> 11

```
..... --
atgaaggccc ccgctgtgct tgcacctggc atcctcgtgc tcctgtttac cttggtgcag      60
aggagcaatg gggagggggg cggtgatct cccattgtct atgaaattca tccaaccaa      120
tcttttatta gtggtgggag cacaataaca ggtgttgga aaaacctgaa ttcagttagt      180
gtcccagaaa tggtcataaa tgtgcatgaa gcaggaagga actttacagt ggcattgcaa      240
catcgctcta attcagagat aatctgttgt accactcctt cctgcaaca gctgaatctg      300
caactcccc tgaaaaccaa agcctttttc atgttagatg ggatcctttc caaatacttt      360
```

ES 2 368 603 T3

gatctcattt atgtacataa tcctgtgttt aagccttttg aaaagccagt gatgatctca 420
atgggcaatg aaaatgtact ggaaattaag ggaaatgata ttgaccctga agcagttaa 480
ggatgaagtgt taaaagttgg aaataagagc tgtgagaata tacacttaca ttctgaagcc 540
gttttatgca cgggtcccaa tgacctgctg aaattgaaca gcgagctaaa tatagagtgg 600
aagcaagcaa tttcttcaac cgtccttggg aaagtaatag ttcaaccaga tcagaatttc 660
acaggattga ttgctggtgt tgtctcaata tcaacagcac tgttattact acttgggttt 720
ttcctgtggc tgaaaaagag aaagcaaatt aaagatctgg gcagtgaatt agttcgctac 780
gatgcaagag tacacactcc tcatttggat aggcttghta gtgcccgaag tgtaagccca 840
actacagaaa tggtttcaaa tgaatctgta gactaccgag ctacttttcc agaagatcag 900
tttcttaatt catctcagaa cggttcatgc cgacaagtgc agtatcctct gacagacatg 960
tccccatcc taactagtgg ggactctgat atatccagtc cactactgca aaactactgtc 1020
cacattgacc tcagtgtctt aaatccagag ctggtccagg cagtgcagca tgtagtatt 1080
gggcccagta gcctgattgt gcatttcaat gaagtcatag gaagagggca ttttggttgt 1140
gtatatcatg ggactttggt ggacaatgat ggcaagaaa ttcactgtgc tgtgaaatcc 1200
ttgaacagaa tcaactgacat aggagaagtt tcccaatttc tgaccgaggg aatcatcatg 1260
aaagatttta gtcaccccaa tgtcctctcg ctctgggaa tctgcctgcg aagtgaaggg 1320
tctccgctgg tggctctacc atacatgaaa catggagatc ttcgaaattt cattcgaat 1380
gagactcata atccaactgt aaaagatctt attggctttg gtcttcaagt agccaaaggc 1440
atgaaatata ttgcaagcaa aaagtttgtc cacagagact tggctgcaag aaactgtatg 1500
ctggatgaaa aattcacagt caaggttgct gattttggtc ttgccagaga catgtatgat 1560
aaagaatact atagtgtaca caacaaaaca ggtgcaaagc tgccagtgaa gtggatggct 1620
ttggaaagtc tgcaaaactca aaagtttacc accaagtcag atgtgtggtc ctttggcgtg 1680
ctcctctggg agctgatgac aagaggagcc ccaccttacc ctgatgtaa cacctttgat 1740
ataactgttt acttgttgca agggagaaga ctctacaac ccgaatactg cccagacccc 1800
ttatatgaag taatgctaaa atgctggcac cctaaagccg aatgcgccc atccttttct 1860
gaactggtgt cccggatata agcaatcttc tctacttca ttggggagca ctatgtccat 1920
gtgaacgcta cttatgtgaa cgtaaaatgt gtcgctccat atccttctct gttgtcatca 1980
gaagataacg ctgatgatga ggtggacaca cgaccagcct ccttctggga gacatcatag 2040

<210> 12

<211> 2259

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación for HGF_MYChis

5 <400> 12

ES 2 368 603 T3

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcacctcctc 60
 ctgctcccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120
 gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa 180
 accaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt 240
 ccattcactt gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc 300
 ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttgccc atgaatttga cctctatgaa 360
 aacaaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctacaa gggaacagta 420
 tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac 480
 agctttttgc cttcgagcta tcggggtaaa gacctacagc aaaactactg tcgaaatcct 540
 cgaggggaag aagggggacc ctgggtgtttc acaagcaatc cagaggtacg ctacgaagtc 600
 tgtgacattc ctcagtgttc agaagttgaa tgcatgacct gcaatgggga gagttatcga 660
 ggtctcatgg atcacacaga atcaggcaag atttgtcagc gctgggatca tcagacacca 720
 caccggcaca aattcttgcc tgaaagatat cccgacaagg gctttgatga taattattgc 780
 cgcaatcccg atggccagcc gaggccatgg tgctatactc ttgaccctca caccgctgg 840
 gagtactgtg caattaaaac atgcgctgac aatactatga atgacactga tgttcctttg 900
 gaaacaactg aatgcatcca aggtcaagga gaaggctaca ggggcactgt caataccatt 960
 tggaatggaa ttccatgtca gcgttgggat tctcagtatc ctcacgagca tgacatgact 1020
 cctgaaaatt tcaagtgcaa ggacctacga gaaaattact gccgaaatcc agatgggtct 1080
 gaatcaccct ggtgttttac cactgatcca aacatccgag ttggctactg ctcccaaatt 1140
 ccaaactgtg atatgtcaca tggacaagat tgttatcgtg ggaatggcaa aatttatatg 1200
 ggcaacttat cccaaacaag atctggacta acatgttcaa tgtgggacaa gaacatggaa 1260
 gacttacatc gtcatatctt ctgggaacca gatgcaagta agctgaatga gaattactgc 1320
 cgaaatccag atgatgatgc tcatggacc cgggaaatcc actcattcct 1380
 tgggattatt gccctatctc tcgttgtgaa ggtgatacca cacctacaat agtcaattta 1440
 gaccatcccg taatatcttg tgccaaaacg aaacaattgc gagttgtaaa tgggattcca 1500
 acacgaacaa acataggatg gatggttagt ttgagataca gaaataaaca tatctgogga 1560
 ggatcattga taaaggagag ttgggttctt actgcacgac agtgtttccc ttctcgagac 1620
 ttgaaagatt atgaagcttg gcttggaatt catgatgtcc acggaagagg agatgagaaa 1680
 tgcaaacagg ttctcaatgt ttcccagctg gtatatggcc ctgaaggatc agatctgggt 1740
 ttaatgaagc ttgccaggcc tgctgtcctg gatgattttg ttagtacgat tgatttacct 1800
 aattatggat gcacaattcc tgaaaagacc agttgcagtg tttatggctg gggctacact 1860
 ggattgatca actatgatgg cctattacga gtggcacatc tctatataat gggaaatgag 1920

ES 2 368 603 T3

```
aaatgcagcc agcatcatcg aggggaaggtg actctgaatg agtctgaaat atgtgctggg 1980
gctgaaaaga ttggatcagg accatgtgag ggggattatg gtggccact tgtttgtgag 2040
caacataaaa tgagaatggt tcttggtgtc attggtcctg gtogtggatg tgccattcca 2100
aatcgtcctg gtatTTTTgt ccgagtagca tattatgcaa aatggataca caaaattatt 2160
ttaacatata aggtaccaca gtcagctagc gaacaaaaac tcatctcaga agaggatctg 2220
aatggagggc tcgagcatca ccaccatcac catcattga 2259
```

<210> 13

<211> 1494

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de HGF-alfa_MYChis

<400> 13

ES 2 368 603 T3

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcatctcctc 60
ctgtcoccoa tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120
gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa 180
accaaaaaag 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
agctttttgc cttcgagcta tcggggtaaa gacctacagg aaaactactg tcgaaatcct 540
cgaggggaag aagggggacc ctggtgtttc acaagcaatc cagaggtacg ctacgaagtc 600
tgtgacattc ctcagtgttc agaagttaa tgcatgacct gcaatgggga gagttatcga 660
ggtctcatgg atcatacaga atcaggcaag atttgtcagc gctgggatca tcagacacca 720
caccggcaca aattcttgcc tgaagatat cccgacaagg gctttgatga taattattgc 780
cgcaatcccg atggccagcc gaggccatgg tgctatactc ttgaccctca caccogctgg 840
gagtactgtg caattaaaac atgcgctgac aatactatga atgacactga tgttcctttg 900
gaaacaactg aatgcatcca aggtcaagga gaaggctaca ggggcactgt caataccatt 960
tggaatggaa ttccatgtca gcgttgggat tctcagtatc ctcacgagca tgacatgact 1020
cctgaaaatt tcaagtgcaa ggacctacga gaaaattact gccgaaatcc agatgggtct 1080
gaatcaccct ggtgttttac cactgatcca aacatccgag ttggctactg ctcccaaatt 1140
ccaaactgtg atatgtcaca tggacaagat tgttatcgtg ggaatggcaa aaattatatg 1200
ggcaacttat cccaacaag atctggacta acatgttcaa tgtgggacaa gaacatggaa 1260

gacttacatc gtcatatctt ctgggaacca gatgcaagta agctgaatga gaattactgc 1320
cgaaatccag atgatgacgc tcatggacct tgggtctaca cgggaaatcc actcattcct 1380
tgggattatt gcctatttc tcgttgtgaa ggtgataccg ctagcgaaca aaaactcatc 1440
tcagaagagg atctgaatgg agggctcgag catcaccacc atcacatca ttga 1494

<210> 14

<211> 705

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

ES 2 368 603 T3

<223> Secuencia de codificación de HGF NK1_MYChis

<400> 14

```

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcatctcctc      60
ctgctcccca tcgcatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat      120
gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa      180
accaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt      240
ccattcactt gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc      300
ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa      360
aacaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctacaa ggaacagta      420
tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac      480
agctttttgc ctctgagcta tcggggtaaa gacctacagg aaaactactg tcgaaatcct      540
cgaggggaag aagggggacc ctggtgtttc acaagcaatc cagaggtacg ctacgaagtc      600
tgtgacattc ctcagtgttc agaagttgaa gctagcgaac aaaaactcat ctcagaagag      660
gatctgaatg gagggctcga gcatcaccac catcaccatc attga                          705

```

<210> 15

5 <211> 903

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de HGF-beta_MYChis

10 <400> 15

```

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcatctcctc      60
ctgctcccca tcgcatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat      120
gaattcgttg taaatgggat tccaacacga acaaacatag gatggatggt tagtttgaga      180
tacagaaata aacatatctg cggaggatca ttgataaagg agagttgggt tcttactgca      240
cgacagtgtt tcccttctcg agacttgaaa gattatgaag cttggcttgg aattcatgat      300
gtccacggaa gaggagatga gaaatgcaaa caggttctca atgtttccca gctggtatat      360
ggccctgaag gatcagatct ggttttaatg aagcttgcca ggctgctgt cctggatgat      420

```

ES 2 368 603 T3

tttgtttagta cgattgattt acctaattat ggagccacaa ttcttgaaaa gaccagttgc 480
agtgtttatg gctggggcta cactggattg atcaactatg atggcctatt acgagtggca 540
catctctata taatgggaaa tgagaaatgc agccagcatc atcgagggaa ggtgactctg 600
aatgagtctg aaatatgtgc tggggctgaa aagattggat caggaccatg tgagggggat 660
tatggtggcc cacttgtttg tgagcaacat aaaatgagaa tggttcttgg tgtcattgtt 720
cctggtcgtg gatgtgccat tccaaatcgt cctggtattt ttgtccgagt agcatattat 780
gcaaaatgga tacacaaaat tattttaaca tataaggtac cacagtcagc tagcgaacaa 840
aaactcatct cagaagagga tctgaatgga gggctcgagc atcaccacca tcaccatcat 900
tga 903

<210> 16

<211> 2259

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de HGF_MYChis no escindible

<400> 16

ES 2 368 603 T3

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcatctcctc 60
 ctgctcccca tcgcatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120
 gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa 180
 accaaaaaag 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 ggaacagta 420
 tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac 480
 agctttttgc cttcgagcta tcggggtaaa gacctacagg aaaactactg tcgaaatcct 540
 cgaggggaag aagggggacc ctggtgtttc acaagcaatc cagaggtacg ctacgaagtc 600
 tgtgacattc ctcagtgttc agaagttgaa tgcatgacct gcaatgggga gagttatcga 660
 ggtctcatgg atcatacaga atcaggcaag atttgtcagc gctgggatca tcagacacca 720
 caccggcaca aattcttgcc tgaaagatat cccgacaagg gctttgatga taattattgc 780
 cgcaatcccg atggccagcc gaggccatgg tgctatactc ttgaccctca caccgctgg 840
 gagtactgtg caattaaaac atgctgctgac aatactatga atgacactga tgttcctttg 900
 gaaacaactg aatgcatcca aggtcaagga gaaggctaca ggggcactgt caataccatt 960
 tggaatggaa ttccatgtca gcgttgggat tctcagtatc ctcacgagca tgacatgact 1020
 cctgaaaatt tcaagtgcaa ggacctacga gaaaattact gccgaaatcc agatgggtct 1080

ES 2 368 603 T3

gaatcacct ggtgttttac cactgatcca aacatccgag ttggctactg ctcccaaatt 1140
 ccaaactgtg atatgtcaca tggacaagat tgttatcgtg ggaatggcaa aaattatatg 1200
 ggcaacttat cccaacaag atctggacta acatgttcaa tgtgggacaa gaacatggaa 1260
 gacttacatc gtcatatctt ctgggaacca gatgcaagta agctgaatga gaattactgc 1320
 cgaaatccag atgatgatgc tcatggacc tggtgctaca cgggaaatcc actcattcct 1380
 tgggattatt gccctatttc tcgttgtaa ggtgatacca cacctacaat agtcaattta 1440
 gaccatcccg taatatcttg tgccaaaacg aaacaactgc aggttgtaa tgggattcca 1500
 acacgaacaa acataggatg gatggtagt ttgagataca gaaataaaca tatctgcgga 1560
 ggatcattga taaaggagag ttgggttctt actgcacgac agtgtttccc ttctcgagac 1620
 ttgaaagatt atgaagcttg gcttgaatt catgatgtcc acggaagagg agatgagaaa 1680
 tgcaaacagg ttctcaatgt ttcccagctg gtatatggcc ctgaaggatc agatctggtt 1740
 ttaatgaagc ttgccaggcc tgctgtcctg gatgattttg ttagtacgat tgatttacct 1800
 aattatggat gcacaattcc tgaaaagacc agttgcagtg tttatggctg gggctacact 1860
 ggattgatca actatgatgg cctattacga gtggcacatc tctatataat gggaaatgag 1920
 aatgcagcc agcatcatcg agggaaggtg actctgaatg agtctgaaat atgtgctggg 1980
 gctgaaaaga ttggatcagg accatgtgag ggggattatg gtggcccact tgtttgtgag 2040
 caacataaaa tgagaatggt tcttgggtgc attgttctg gtcgtggatg tgccattcca 2100
 aatgctcctg gtatttttgt ccgagtagca tattatgcaa aatggataca caaaattatt 2160
 ttaacatata aggtaccaca gtcagctagc gaacaaaaac tcatctcaga agaggatctg 2220
 aatggagggc tcgagcatca ccaccatcac catcattga 2259

<210> 17

<211> 1197

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de NK1-NK1_his

<400> 17

ES 2 368 603 T3

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcatctcctc 60
ctgctcccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120
gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa 180
accaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt 240
ccattcactt gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc 300
ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa 360
aacaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctacaa gggaacagta 420
tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac 480

agctttttgc cttcgagcta tcggggtaaa gacctacagg aaaactactg tcgaaatcct 540
cgaggggaag aagggggacc ctggtgtttc acaagcaatc cagaggtacg ctacgaagtc 600
tgtgacattc ctcaagtgtc agaagttgaa gctagcgaat tcaaaaaatc agcaaagact 660
accctaatac aaatagatcc agcactgaag ataaaaacca aaaaagtgaa tactgcagac 720
caatgtgcta atagatgtac taggaataaa ggacttccat tcacttgcaa ggcttttgtt 780
tttgataaag caagaaaaca atgcctctgg ttccccttca atagcatgtc aagtggagtg 840
aaaaaagaat ttggccatga atttgacctc tatgaaaaca aagactacat tagaaactgc 900
atcattggta aaggacgcag ctacaaggga acagtatcta tcaactaagag tggcatcaaa 960
tgtcagccct ggagttccat gataccacac gaacacagct ttttgccttc gagctatcgg 1020
ggtaaagacc tacaggaaaa ctactgtcga aatcctcgag gggaagaagg gggaccctgg 1080
tgtttcacaa gcaatccaga ggtacgtac gaagtctgtg acattcctca gtgttcagaa 1140
gttgaagcta gtgggggtgg tagtggagga gggcatcacc atcatcacca tcactga 1197

<210> 18

<211> 1218

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de hAS_MYC

<400> 18

ES 2 368 603 T3

atggaacata aggaagtggg tcttctactt cttttatttc tgaatcagg tcaaggagtg 60
 tatctctcag agtgcaagac tgggaatgga aagaactaca gagggacgat gtccaaaaca 120
 aaaaatggca tcacctgtca aaaatggagt tccacttctc cccacagacc tagatttctca 180
 cctgctacac acccctcaga gggactggag gagaactact gcaggaatcc agacaacgat 240
 ccgcaggggc cctggtgcta tactactgat ccagaaaaga gatatgacta ctgcgacatt 300
 cttgagtgtg aagaggaatg tatgcattgc agtggagaaa actatgacgg caaaatttcc 360
 aagaccatgt ctggactgga atgccaggcc tgggactctc agagcccaca cgctcatgga 420
 tacattcctt ccaaatttcc aaacaagaac ctgaagaaga attactgtcg taaccccgat 480
 agggagctgc ggccttgggtg tttcaccacc gacccaaca agcgtgaggga actttgcgac 540
 atcccccgct gcacaacacc tccaccatct tctggtccca cctaccagtg tctgaaggga 600
 acaggtgaaa actatcgcgg gaatgtggct gttaccgttt ccgggcacac ctgtcagcac 660
 tggagtgcac agaccctca cacacataac aggacaccag aaaacttccc ctgcaaaaat 720
 ttggatgaaa actactgccg caatcctgac ggaaaaaggg ccccatgggtg ccatacaacc 780
 aacagccaag tgcggtggga gtactgtaag ataccgtcct gtgactcctc cccagtatcc 840
 acggaacaat tggctcccac agcaccacct gagctaacc cctgtggtcca ggactgctac 900

catggtgatg gacagagcta ccgaggcaca tctccacca ccaccacagg aaagaagtgt 960
 cagtcttggg catctatgac accacaccgg caccagaaga cccagaaaa ctacccaaat 1020
 gctggcctga caatgaacta ctgcaggaat ccagatgccg ataaaggccc ctggtgtttt 1080
 accacagacc ccagcgtcag gtgggagtac tgcaacctga aaaaatgctc aggaacagaa 1140
 gcggttagcg aacaaaaact catctcagaa gaggatctga atggagggtc cgagcatcac 1200
 caccatcacc atcattga 1218

<210> 19

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Flag en el extremo C

<400> 19

Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

ES 2 368 603 T3

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Myc simple en el extremo C

<400> 20

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
1 5 10

<210> 21

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Marca poli-histidina

15 <400> 21

His His His His His His His
1 5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Metheresis Translational Research SA

<120> Sitio de unión de alta afinidad de HGFR y procedimientos para la identificación de antagonistas del mismo

20 <130> BEX10941-CF

<160> 21

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 7425

25 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> pRRLsin.PPT.CMV.eGPF.Wpre (la secuencia de codificación de eGFP comienza en el nucleótido 4756 y finaliza en el nucleótido 5745)

30 <400> 1

ES 2 368 603 T3

caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttattt ttctaaatac 60
 attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa 120
 aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcctt tattcccttt tttgcggcat 180
 tttgccttcc tgtttttgct cacccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc 240
 agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga 300
 gttttcggcc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg 360
 cggattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgata cactattctc 420
 agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag 480
 taagagaatt atgcagtgtc gccataacca tgagtgataa cactgcggcc aacttacttc 540
 tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg 600
 taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc catacacaac gacgagcgtg 660
 acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac 720
 ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcgataaa gttgcaggac 780
 cacttctgcg ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg 840
 agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggttaagccc tcccgtatcg 900
 tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg 960
 agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac 1020
 tttagattga tttaaaactt ctttttaat ttaaaaggat ctaggatgaag atcctttttg 1080
 ataatctcat gacaaaaatc ccttaacgtg agttttcggt cactgagcg tcagaccccg 1140
 tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc 1200
 aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc 1260
 tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt 1320
 agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc 1380

ES 2 368 603 T3

taatcctggt accagtggct gctgccagt gcgataagtc gtgtcctacc gggttggact 1440
 caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggggt tcgtgcacac 1500
 agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag 1560
 aaagcggcac gcttcccga gggagaaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggctc 1620
 gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg 1680
 tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga 1740
 gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacgggt cctggccttt tgctggcctt 1800
 ttgctcacat gttcttttct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct 1860
 ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcagc tcagtgagcg 1920
 aggaagcggga agagcgcca atacgcaaac cgctctccc cgcgcttgg ccgattcatt 1980
 aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta 2040
 atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggctttaca ctttatgctt ccggctcgta 2100
 tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt 2160
 acgccaagcg cgcaattaac cctcactaaa gggaaacaaa gctggagctg caagcttaat 2220
 gtagtcttat gcaatactct tgtagtcttg caacatggta acgatgagtt agcaacatgc 2280
 cttacaagga gagaaaaagc accgtgcatg ccgattggtg gaagtaaggt ggtacgatcg 2340
 tgccttatta ggaaggcaac agacgggtct gacatggatt ggacgaacca ctgaattgcc 2400
 gcattgcaga gatattgtat ttaagtgcct agctcgatac aataaacggg tctctctggt 2460
 tagaccagat ctgagcctgg gagctctctg gctaactagg gaaccactg cttaaagcctc 2520
 aataaagctt gccttgagtg cttcaagtag tgtgtgcccg tctgttgtgt gactctggta 2580
 actagagatc cctcagacc ttttagtcag tgtggaaaat ctctagcagt ggcgcccgaa 2640
 cagggacctg aaagcgaag ggaaccaga gctctctcga cgcaggactc ggcttgctga 2700
 agcgcgcacg gcaagaggcg aggggcggcg actggtgagt acgccaacaaa ttttgactag 2760
 cggaggctag aaggagagag atgggtgcga gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag 2820
 atcgcgatgg gaaaaattc ggttaaggcc agggggaaaag aaaaaatata aattaaaca 2880
 tatagtatgg gcaagcaggg agctagaacg attcgcagtt aatcctggcc tgtagaaac 2940
 atcagaaggc ttagacaaa tactgggaca gctacaacca tcccttcaga caggatcaga 3000
 agaacttaga tcattatata atacagtagc aaccctctat tgtgtgcatc aaaggataga 3060
 gataaaagac accaaggaag ctttagacaa gatagaggaa gagcaaaaca aaagtaagac 3120
 caccgcacag caagcggccg ctgatcttca gacctggagg aggagatatg agggacaatt 3180
 ggagaagtga attatataaa tataaagtag taaaaattga accattagga gtagcaccca 3240
 ccaaggcaaa gagaagagtg gtgcagagag aaaaaagagc agtgggaata ggagctttgt 3300
 tccttgggtt cttgggagca gcaggaagca ctatgggagc agcctcaatg acgctgacgg 3360
 tacaggccag acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaatttg ctgagggcta 3420
 ttgaggcgca acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag ctccaggcaa 3480

ES 2 368 603 T3

gaatcctggc tgtggaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttgct 3540
 ctggaaaact catttgcacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc 3600
 tggaacagat ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca 3660
 caagcttaat acactcctta attgaagaat cgcaaaaacca gcaagaaaag aatgaacaag 3720
 aattattgga attagataaa tgggcaagtt tgtggaattg gtttaacata acaaattggc 3780
 tgtggtatat aaaattattc ataatgatag taggaggctt ggtaggttta agaatagttt 3840
 ttgctgtact ttctatagtg aatagagtta ggcagggata ttcaccatta tcgtttcaga 3900
 cccacctccc aaccccgagg ggacccgaca ggcccgaagg aatagaagaa gaaggtggag 3960
 agagagacag agacagatcc attcgattag tgaacggatc tcgacggtta acttttaaaa 4020
 gaaaaggggg gattgggggg tacagtgcag gggaaagaat agtagacata atagcaacag 4080
 acatacaaac taaagaatta caaaaacaaa ttacaaaaat tcaaaatttt atcgataagc 4140
 ttgggagttc cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga 4200
 cccccgcca ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt 4260
 ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg gtaaaactgcc cacttggcag tacatcaagt 4320
 gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaattggc ccgctggca 4380
 ttatgccag tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt 4440
 catcgtatt accatggtga tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt 4500
 tgactcacgg ggatttccaa gtctccacc cattgacgtc aatgggagtt tgttttgga 4560
 ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg taacaactcc gccccattga cgcaaatggg 4620
 cggtaggcgt gtacgggtgg aggtctatat aagcagagct cgtttagtga accgtcagat 4680
 cgcctggaga cgccatccac gctgttttga cctccataga agacaccgac tctagaggat 4740
 ccaccggtcg ccaccatggt gagcaagggc gaggagctgt tcaccggggg ggtgcccac 4800
 ctggtcgagc tggacggcga cgtaaacggc cacaagttca gcgtgtccgg cgagggcgag 4860
 ggcgatgcca cctacggcaa gctgaccctg aagttcatct gcaccaccg caagctgccc 4920
 gtgccctggc ccaccctcgt gaccacctg acctacggcg tgcagtgett cagccgctac 4980
 cccgaccaca tgaagcagca cgacttctc aagtccgcca tggccgaagg ctacgtccag 5040
 gagcgcacca tcttcttcaa ggacgacggc aactacaaga cccgcgccga ggtgaagttc 5100
 gagggcgaca ccctggtgaa ccgcatcgag ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc 5160
 aacatcctgg ggcacaagct ggagtacaac tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc 5220
 gacaagcaga agaacggcat caaggtgaac ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc 5280
 agcgtgcagc tcgccacca ctaccagcag aacaccccca tcggcgacgg ccccgtgctg 5340
 ctgcccgaca accactacct gagcaccag tccgccctga gcaaagacc caacgagaag 5400
 cgcgatcaca tggtcctgct ggagttcgtg accgccgccg ggatcactct cggcatggac 5460
 gagctgtaca agtaaagcgg ccgcgtcgac aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa 5520

ES 2 368 603 T3

agattgactg gtatttcttaa ctatgttgct ccttttacgc tatgtggata cgctgcttta 5580
 atgcctttgt atcatgctat tgcttcccgt atggctttca ttttctctc cttgtataaa 5640
 tcctgggtgc tgtctcttta tgaggagttg tggcccgttg tcaggcaacg tggcgtggtg 5700
 tgactgtgt ttgctgacgc aacccccact gggtggggca ttgccaccac ctgtcagctc 5760
 ctttccggga ctttcgcttt cccctccct attgccacgg cggaactcat cgccgcctgc 5820
 cttgccgct gctggacagg ggctcggctg ttgggactg acaattccgt ggtgtgtgcg 5880
 ggggaagctga cgtcctttcc atggctgctc gcctgtgttg ccacctggat tctgcgctgg 5940
 acgtccttct gctacgtccc ttcggccctc aatccagcgg accttcctc ccgcggcctg 6000
 ctgccggctc tgcggcctct tccgcgtctt cgccttcgcc ctcagacgag tcggatctcc 6060
 ctttgggccg cctccccgcc tggaattcga gctcgggtacc ttttaagacca atgacttaca 6120
 aggcagctgt agatcttagc cactttttta aagaaaaggg gggactggaa gggctaattc 6180
 actcccaacg aagacaagat ctgctttttg cttgtactgg gtctctctgg ttagaccaga 6240
 tctgagcctg ggagctctct ggctaactag ggaaccact gcttaagcct caataaagct 6300
 tgccttgagt gcttcaagta gtgtgtgccc gtctgtgtg tgactctggt aactagagat 6360
 ccctcagacc ctttttagtca gtgtggaaaa tctctagcag tagtagttca tgtcatctta 6420
 ttattcagta tttataactt gcaaagaaat gaatatcaga gagtgagagg aacttgttta 6480
 ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat 6540
 ttttttact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct 6600
 ggctctagct atccccccc taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg 6660
 actaattttt tttatttatg cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa 6720
 gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg cttttgctc gagacgtacc caattcgccc 6780
 tatagtgagt cgtattacgc gcgctcactg gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa 6840
 aaccctggcg ttaccaact taatcgctt gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt 6900
 aatagcgaag aggcccgcac cgatcgccct tccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa 6960
 tggcgcgacg cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc 7020
 gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt tcgctttctt cccttccttt 7080
 ctgccacgt tcgccggctt tccccgtaa gctctaaatc gggggctccc tttagggttc 7140
 cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg attagggtga tggttcacgt 7200
 agtgggcat cgccctgata gacggttttt cgccctttga cgttggagtc cacgttcttt 7260
 aatagtggac tcttgttcca aactggaaca aactcaacc ctatctcggc ctattctttt 7320
 gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tatttggttaa aaaatgagct gatttaacaa 7380
 aaatttaacg cgaattttta caaatatta acgtttacaa tttcc 7425

<210> 2

<211> 2886

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de Met Decoy_FLAGhis

<400> 2

ES 2 368 603 T3

atgaaggccc	ccgctgtgct	tgcacctggc	atcctcgtgc	tcctgtttac	cttgggtgcag	60
aggagcaatg	gggagtgtaa	agaggcacta	gcaaagtccg	agatgaatgt	gaatatgaag	120
tatcagcttc	ccaacttcac	cgcggaaca	cccatccaga	atgtcattct	acatgagcat	180
cacattttcc	ttggtgccac	taactacatt	tatgttttaa	atgaggaaga	ccttcagaag	240
gttgctgagt	acaagactgg	gcctgtgctg	gaacacccag	attgtttccc	atgtcaggac	300
tgcagcagca	aagccaatth	atcaggaggt	gtttggaaag	ataacatcaa	catggctcta	360
gttgtcgaca	cctactatga	tgatcaactc	attagctgtg	gcagcgtcaa	cagagggacc	420
tgccagcgac	atgtctttcc	ccacaatcat	actgctgaca	tacagtcgga	ggttccactgc	480
atattctccc	cacagataga	agagcccagc	cagtgtcctg	actgtgtggt	gagcgccttg	540
ggagccaaag	tcctttcatc	tgtaaaggac	cggttcatca	acttctttgt	aggcaatacc	600
ataaattctt	cttattttcc	agatcatcca	ttgcattcga	tatcagtgag	aaggctaaag	660
gaaacgaaag	atggttttat	gtttttgacg	gaccagtcct	acattgatgt	tttacctgag	720
ttcagagatt	cttaccat	taagtatgtc	catgcctttg	aaagcaaca	ttttatttac	780
ttcttgacgg	tccaaagga	aactctagat	gctcagactt	ttcacacaag	aataatcagg	840
ttctgttcca	taaactctgg	attgcattcc	tacatggaaa	tgctctgga	gtgtattctc	900
acagaaaaga	gaaaaaagag	atccacaaaag	aaggaagtgt	ttaatatact	tcaggctgcg	960
tatgtcagca	agcctggggc	ccagcttgct	agacaaatag	gagccagcct	gaatgatgac	1020
attcttttcg	gggtgttcgc	acaaagcaag	ccagattctg	ccgaaccaat	ggatcgatct	1080
gccatgtgtg	cattccctat	caaatatgtc	aacgacttct	tcaacaagat	cgtaacaaa	1140
aacaatgtga	gatgtctcca	gcatttttac	ggaccaatc	atgagcactg	ctttaatagg	1200
acacttctga	gaaattcatc	aggctgtgaa	gcgcgccgtg	atgaatatcg	aacagagttt	1260
accacagctt	tgcagcgcgt	tgacttattc	atgggtcaat	tcagcgaagt	cctcttaaca	1320
tctatatcca	ccttcattaa	aggagacctc	accatagcta	atcttgggac	atcagagggg	1380
cgcttcatgc	aggttgtggt	ttctcgatca	ggaccatcaa	cccctcatgt	gaattttctc	1440
ctggactccc	atccagtgtc	tccagaagtg	attgtggagc	atáacattaaa	ccaaaatggc	1500
tacacactgg	ttatcactgg	gaagaagatc	acgaagatcc	cattgaatgg	cttgggctgc	1560
agacatttcc	agtctcgcag	tcaatgcctc	tctgccccac	cctttgttca	gtgtggctgg	1620
tgccacgaca	aatgtgtgcg	atcggaggaa	tgcttgagcg	ggacatggac	tcaacagatc	1680
tgtctgcctg	caatctaaa	ggttttccca	aatagtgcac	cccttgaagg	agggacaagg	1740
ctgaccatat	gtggctggga	ctttggattt	cggaggaata	ataaatttga	tttaaagaaa	1800
actagagttc	tccttggaaa	tgagagctgc	accttgactt	taagtgagag	cacgatgaat	1860
acattgaaat	gcacagttgg	tcctgccatg	aataagcatt	tcaatatgtc	cataattatt	1920

ES 2 368 603 T3

tcaa	atggcc	acgggacaac	acaatacagt	acattctcct	atgtggatcc	tgtaataaca	1980	
agtatt	tcgc	cgaaatacgg	tcctatggct	ggtggcactt	tacttacttt	aactggaaat	2040	
tacctaa	aca	gtgggaattc	tagacacatt	tcaattgggtg	gaaaaacatg	tactttaaaa	2100	
agtgtgt	caa	acagtattct	tgaatgttat	accccagccc	aaaccatttc	aactgagttt	2160	
gctgttaa	aat	tgaaaattga	cttagccaac	cgagagacaa	gcatcttcag	ttaccgtgaa	2220	
gatcccatt	g	tctatgaaat	tcatccaacc	aaatctttta	ttagtgggtg	gagcacaata	2280	
acaggtgt	t	ggaaaaacct	gaattcagtt	agtgtcccga	gaatggatc	aaatgtgcat	2340	
gaagcagg	aa	ggaactttac	agtggcatgt	caacatcgct	ctaattcaga	gataatctgt	2400	
tgtaccact	c	cttccctgca	acagctgaat	ctgcaactcc	ccctgaaaac	caaagccttt	2460	
ttcatgt	t	atgggatcct	ttccaaatac	tttgatctca	tttatgtaca	taatcctgtg	2520	
tttaagc	c	ttgaaaagcc	agtgatgatc	tcaatgggca	atgaaaatgt	actggaaatt	2580	
aagggaa	a	atattgacct	tgaagcagtt	aaaggtgaag	tgttaaaagt	tggaaataag	2640	
agctgtg	a	atatacactt	acattctgaa	gccgttttat	gcacgggtccc	caatgacctg	2700	
ctgaaatt	g	acagcgagct	aaatatagag	tggaagcaag	caatttcttc	aaccgtcctt	2760	
ggaaaag	t	aa	tagttcaacc	agatcagaat	ttcacagcta	gctctgacta	caaggacgac	2820
gatgaca	a	g	gcgattacaa	agacgatgat	gataagctgc	agcatcacca	ccatcatcac	2880
cattga							2886	

<210> 3

<211> 1590

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de Sema_FLAGhis

<400> 3

ES 2 368 603 T3

atgaaggccc	ccgctgtgct	tgcacctggc	atcctcgtgc	tcctgtttac	cttgggtgcag	60
aggagcaatg	gggagtgtaa	agaggcacta	gcaaagtccg	agatgaatgt	gaatatgaag	120
tatcagcttc	ccaacttcac	cgcggaaca	cccatccaga	atgtcattct	acatgagcat	180
cacatthttcc	ttggtgccac	taactacatt	tatgtthttaa	atgaggaaga	ccttcagaag	240
gttgctgagt	acaagactgg	gcctgtgctg	gaacacccag	attgtthttcc	atgtcaggac	300
tgcagcagca	aagccaatth	atcaggaggt	gtthtgaaag	ataacatcaa	catggctcta	360
gttgctgaca	cctactatga	tgatcaactc	attagctgtg	gcagcgtcaa	cagagggacc	420
tgccagcgcac	atgtctthttcc	ccacaatcat	actgctgaca	tacagtcgga	ggttcactgc	480
atattctccc	cacagataga	agagcccagc	cagtgtcctg	actgtgtggt	gagcgcctg	540
ggagccaaag	tcctthttcatc	tgtaaaggac	cggtthttcatca	actthttgt	aggcaatacc	600
ataaattctt	cttattthttccc	agatcatcca	ttgcattcga	tatcagtgag	aaggctaaag	660
gaaacgaaag	atggthtttat	gtthttgacg	gaccagtcct	acattgatgt	thttacctgag	720
ttcagagatt	cttaccat	taagtatgtc	catgcctthttg	aaagcaacaa	thttatttac	780
ttcttgacgg	tccaaagga	aactctagat	gctcagactt	ttcacacaag	aataatcagg	840
ttctgttcca	taaactctgg	attgcattcc	tacatggaaa	tgctctgga	gtgtattctc	900
acagaaaaga	gaaaaagag	atccacaaag	aaggaagtgt	ttaatatact	tcaggctgcg	960
tatgtcagca	agcctggggc	ccagcttgct	agacaaatag	gagccagcct	gaatgatgac	1020
attctthttcg	gggtgttcgc	acaaagcaag	ccagattctg	ccgaaccaat	ggatcgatct	1080
gccatgtgtg	cattccctat	caaatatgtc	aacgacttct	tcaacaagat	cgtaacaaa	1140
aacaatgtga	gatgtctcca	gcattthttac	ggaccaatc	atgagcactg	ctthtaatagg	1200
acacttctga	gaaattcatc	aggctgtgaa	gcgcgccgtg	atgaatatcg	aacagagtht	1260
accacagctt	tgcagcgcgt	tgacttattc	atgggtcaat	tcagcgaagt	cctcttaaca	1320
tctatatcca	ccttcattaa	aggagacctc	accatagcta	atcttgggac	atcagaggggt	1380
cgcttcatgc	aggthtgggt	ttctcgatca	ggaccatcaa	cccctcatgt	gaathttctc	1440
ctggactccc	atccagtgtc	tccagaagtg	attgtggagc	atacattaaa	ccaaaatggc	1500
gctagctctg	actacaagga	cgacgatgac	aagagcgatt	acaaagacga	tgatgataag	1560
ctgcagcatc	accaccatca	tcaccattag				1590

<210> 4

<211> 1779

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de codificación de sema-PSI_FLAGhis

<400> 4

ES 2 368 603 T3

atgaaggccc ccgctgtgct tgcacctggc atcctcgtgc tcctgtttac cttggtgcag 60
 aggagcaatg gggagtgtaa agaggcacta gcaaagtccg agatgaatgt gaatatgaag 120
 tatcagcttc ccaacttcac cgcggaaaca cccatccaga atgtcattct acatgagcat 180
 cacattttcc ttggtgccac taactacatt tatgttttaa atgaggaaga ccttcagaag 240
 gttgctgagt acaagactgg gcctgtgctg gaacacccag attgtttccc atgtcaggac 300
 tgcagcagca aagccaattt atcaggaggt gtttgaaag ataacatcaa catggctcta 360
 gttgtcgaca cctactatga tgatcaactc attagctgtg gcagcgtcaa cagagggacc 420
 tgccagcgac atgtctttcc ccacaatcat actgctgaca tacagtcgga ggttcactgc 480
 atattctccc cacagataga agagcccagc cagtgtcctg actgtgtggt gagcgcctg 540
 ggagccaaag tcctttcatc tgtaaaggac cggttcatca acttctttgt aggcaatacc 600
 ataaattctt cttattttcc agatcatcca ttgcattcga tatcagtgag aaggctaaag 660
 gaaacgaaag atggttttat gtttttgacg gaccagtcct acattgatgt tttacctgag 720
 ttcagagatt cttaccccat taagtatgtc catgcctttg aaagcaacaa ttttatttac 780
 ttcttgacgg tccaaagga aactctagat gctcagactt ttcacacaag aataatcagg 840
 ttctgttcca taaactctgg attgcattcc tacatggaaa tgctctgga gtgtattctc 900

 acagaaaaga gaaaaaagag atccacaaag aaggaagtgt ttaatatact tcaggctgcg 960
 tatgtcagca agcctggggc ccagcttgct agacaaatag gagccagcct gaatgatgac 1020
 attcttttcg ggggtgttcgc acaaagcaag ccagattctg ccgaaccaat ggatcgatct 1080
 gccatgtgtg cattccctat caaatatgtc aacgacttct tcaacaagat cgtcaacaaa 1140
 aacaatgtga gatgtctcca gcatttttac ggaccaatc atgagcactg ctttaatagg 1200
 acacttctga gaaattcatc aggctgtgaa gcgcgccgtg atgaatatcg aacagagttt 1260
 accacagctt tgcagcgcgt tgacttattc atgggtcaat tcagcgaagt cctcttaaca 1320
 tctatatcca cttcattaa aggagacctc accatagcta atcttgggac atcagagggg 1380
 cgcttcatgc aggttgtggt ttctcgatca ggaccatcaa cccctcatgt gaattttctc 1440
 ctggactccc atccagtgtc tccagaagtg attgtggagc atacattaaa ccaaatggc 1500
 tacacactgg ttatcactgg gaagaagatc acgaagatcc cattgaatgg cttgggctgc 1560
 agacatttcc agtcctgcag tcaatgcctc tctgccccac cttttgttca gtgtggctgg 1620
 tgccacgaca aatgtgtgcg atcggaggaa tgctgagcg ggacatggac tcaacagatc 1680
 tgtctgggag ctagctctga ctacaaggac gacgatgaca agagcgatta caaagacgat 1740
 gatgataagc tgcagcatca ccaccatcat caccattga 1779

<210> 5

<211> 1458

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

ES 2 368 603 T3

<223> Secuencia de codificación de PSI-IPT_FLAGhis

<400> 5

```

atgaaggccc ccgctgtgct tgcacctggc atcctcgtgc tcctgtttac cttggtgcag      60
aggagcaatg ggtacacact ggttatcact ggaagaaga tcacgaagat cccattgaat     120
ggcttgggct gcagacattt ccagtcctgc agtcaatgcc tctctgcccc accctttggt     180
cagtgtggct ggtgccacga caaatgtgtg cgatcggagg aatgcctgag cgggacatgg     240
actcaacaga tctgtctgcc tgcaatctac aaggttttcc caaatagtgc accccttgaa     300
ggagggacaa ggctgaccat atgtggctgg gactttggat ttcggaggaa taataaattt     360
gatttaaaga aaactagagt tctccttggg aatgagagct gcaccttgac tttaagtgag     420
agcacgatga atacattgaa atgcacagtt ggtcctgcca tgaataagca tttcaatatg     480
tccataatta tttcaaatgg ccacgggaca acacaataca gtacattctc ctatgtggat     540
cctgtaataa caagtatttc gccgaaatac ggtcctatgg ctggtggcac tttacttact     600
ttaactggaa attacctaaa cagtgggaat tctagacaca tttcaattgg tggaaaaaca     660
tgtactttaa aaagtgtgtc aaacagtatt cttgaatggt ataccccagc ccaaaccatt     720
tcaactgagt ttgctgttaa attgaaaatt gacttagcca accgagagac aagcatcttc     780
agttaccgtg aagatcccat tgtctatgaa attcatcaa ccaaatcttt tattagtggg     840
gggagcacia taacaggtgt tgggaaaaac ctgaattcag ttagtgtccc gagaatggtc     900

ataaatgtgc atgaagcagg aaggaacttt acagtggcat gtcaacatcg ctctaattca     960
gagataatct gttgtaccac tccttcctg caacagctga atctgcaact ccccctgaaa    1020
accaagcct ttttcatggt agatgggatc ctttccaaat actttgatct catttatgta    1080
cataatcctg tgtttaagcc ttttgaaaag ccagtgatga tctcaatggg caatgaaaat    1140
gtactggaaa ttaagggaaa tgatattgac cctgaagcag ttaaaggtga agtgttaaaa    1200
gttggaaata agagctgtga gaatacac ttacattctg aagccgtttt atgcacggtc    1260
cccaatgacc tgctgaaatt gaacagcgag ctaaataatag agtggaagca agcaatttct    1320
tcaaccgtcc ttggaaaagt aatagttcaa ccagatcaga atttcacagc tagctctgac    1380
tacaaggacg acgatgacaa gagcgttac aaagacgatg atgataagct gcagcatcac    1440
caccatcatc accattag                                     1458

```

5 <210> 6

<211> 1290

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia de codificación de IPT_FLAGhis

ES 2 368 603 T3

<400> 6

atgaaggccc	ccgctgtgct	tgcacctggc	atcctcgtgc	tcctgtttac	cttgggtgcag	60
aggagcaatg	gggagggggg	cggtggatcc	cctgcaatct	acaaggtttt	cccaaatagt	120
gcacccttg	aaggagggac	aaggctgacc	atatgtggct	gggactttgg	atttcggagg	180
aataataaat	ttgatttaa	gaaaactaga	gttctccttg	gaaatgagag	ctgcaccttg	240
actttaagt	agagcacgat	gaatacattg	aaatgcacag	ttggtcctgc	catgaataag	300
catttcaata	tgtccataat	tatttcaa	ggccacggga	caacacaata	cagtacattc	360
tcctatgtgg	atcctgtaat	aacaagtatt	tcgccgaaat	acggtcctat	ggctgggtggc	420
actttactta	ctttaactgg	aaattaccta	aacagtggga	attctagaca	catttcaatt	480
ggtgga	catgtacttt	aaaaagtgtg	tcaaacagta	ttcttgaatg	ttatacccca	540
gccc	aaacca	tttcaactga	gtttgctg	aaattg	aaataagc	600
acaagcatct	tcagttaccg	tgaagatccc	attgtctatg	aaattcatcc	aacc	660
tttattagtg	gtgggagcac	aataacaggt	gttggg	aaataac	agttagtg	720
ccgagaatgg	tcataaatgt	gcatgaagca	ggaaggaact	ttacagtggc	atgtcaacat	780
cgctctaatt	cagagataat	ctgttg	actccttccc	tgcaacagct	gaatctgcaa	840
ctccccctga	aaaccaaagc	cttttcatg	ttagatggga	tcctttccaa	atactttgat	900
ctcatttatg	tacataatcc	tgtgtttaag	ccttttgaaa	agccagtgat	gatctcaatg	960
ggcaatgaaa	atgtactgga	aattaaggga	aatgatattg	accctgaagc	agttaaagg	1020
gaagtgttaa	aagttgaaa	taagagctgt	gagaatatac	acttacattc	tgaagccgtt	1080
ttatgcacgg	tcccaatga	cctgctgaaa	ttgaacagcg	agctaaatat	agagtggaag	1140
caagcaattt	cttcaaccgt	ccttgga	gtaatagttc	aaccagatca	gaatttcaca	1200
gctagctctg	actacaagga	cgacgatgac	aagagcgatt	acaaagacga	tgatgataag	1260
ctgcagcatc	accacatca	tcaccattga				1290

<210> 7

5 <211> 1008

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de IPTdelta1_FLAGhis

10 <400> 7

ES 2 368 603 T3

atgaaggccc ccgctgtgct tgcacctggc atcctcgtgc tcctgtttac cttggtgcag 60
 aggagcaatg gggagggggg cgggtgatct cctgtaataa caagtatttc gccgaaatac 120
 ggtcctatgg ctggtggcac tttacttact ttaactggaa attacctaaa cagtgggaat 180
 tctagacaca tttcaattgg tggaaaaaca tgtactttaa aaagtgtgtc aaacagtatt 240
 cttgaatggt ataccccagc ccaaaccatt tcaactgagt ttgctgttaa attgaaaatt 300
 gacttagcca accgagagac aagcatcttc agttaccgtg aagatcccat tgtctatgaa 360
 attcatccaa ccaaactctt tattagtggg gggagcacia taacaggtgt tgggaaaaac 420
 ctgaattcag ttagtgtccc gagaatggc ataaatgtgc atgaagcagg aaggaacttt 480
 acagtggcat gtcaacatcg ctctaattca gagataatct gttgtaccac tccttcctg 540
 caacagctga atctgcaact ccccctgaaa accaaagcct ttttcatggt agatgggatc 600
 ctttccaaat actttgatct catttatgta cataatcctg tgtttaagcc ttttgaaaag 660
 ccagtgatga tctcaatggg caatgaaaat gtactggaaa ttaagggaaa tgatattgac 720
 cctgaagcag ttaaagggtga agtggttaaaa gttggaaata agagctgtga gaatatacac 780
 ttacattctg aagccgttt atgcacggc cccaatgacc tgctgaaatt gaacagcgag 840
 ctaaataatag agtgggaagca agcaatttct tcaaccgtcc ttggaaaagt aatagttcaa 900
 ccagatcaga atttcacagc tagctctgac tacaaggacg acgatgacaa gagcgattac 960
 aaagacgatg atgataagct gcagcatcac caccatcatc accattga 1008

<210> 8

<211> 753

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de IPTdelta1-2_FLAGhis

<400> 8

atgaaggccc ccgctgtgct tgcacctggc atcctcgtgc tcctgtttac cttggtgcag 60
 aggagcaatg gggagggggg cgggtgatct cccattgtct atgaaattca tccaaccaa 120
 tcttttatta gtggtgggag cacaataaca ggtgttggga aaaacctgaa ttcagttagt 180
 gtcccagaaa tggtcataaa tgtgcatgaa gcaggaagga actttacagt ggcatgtcaa 240
 catcgtctta attcagagat aatctgttgt accactcctt ccctgcaaca gctgaatctg 300

ES 2 368 603 T3

caactcccc tgaaaaccaa agcctttttc atggttagatg ggatcctttc caaatacttt 360
gatctcattt atgtacataa tcctgtgttt aagccttttg aaaagccagt gatgatctca 420
atgggcaatg aaaatgtact ggaaattaag ggaaatgata ttgaccctga agcagttaaa 480
ggtgaagtgt taaaagttgg aaataagagc tgtgagaata tacacttaca ttctgaagcc 540
gttttatgca cggcccccaa tgacctgctg aaattgaaca gcgagctaaa tatagagtgg 600
aagcaagcaa tttcttcaac cgtccttggg aaagtaatag ttcaaccaga tcagaatttc 660
acagctagct ctgactacaa ggacgacgat gacaagagcg attacaaaga cgatgatgat 720
aagctgcagc atcaccacca tcatcacat tga 753

<210> 9

<211> 471

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de IPT3_FLAGhis

<400> 9

atgaaggccc ccgctgtgct tgcacctggc atcctcgtgc tcctgtttac cttggtgcag 60
aggagcaatg gggagggggg cgggtgatct cccattgtct atgaaattca tccaaccaa 120
tcttttatta gtggtgggag cacaataaca ggtggtggga aaaacctgaa ttcagttagt 180
gtcccgagaa tggtcataaa tgtgcatgaa gcaggaagga actttacagt ggcatgtcaa 240
catcgtcta attcagagat aatctgttgt accactcctt ccctgcaaca gctgaatctg 300
caactcccc tgaaaaccaa agcctttttc atggttagatg ggatcctttc caaatacttt 360
gatctcattt atgtacataa tgctagctct gactacaagg acgacgatga caagagcgat 420
tacaagacg atgatgataa gctgcagcat caccaccatc atcaccattg a 471

10 <210> 10

<211> 462

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de codificación de IPT4_FLAGhis

<400> 10

ES 2 368 603 T3

```
atgaaggccc ccgctgtgct tgcacctggc atcctcgtgc tcctgtttac cttggtgcag    60
aggagcaatg gggagggggg cggtggatct cctgtgttta agccttttga aaagccagtg    120
atgatctcaa tgggcaatga aaatgtactg gaaattaagg gaaatgatat tgaccctgaa    180
gcagttaaag gtgaagtgtt aaaagttgga aataagagct gtgagaatat acacttacat    240
tctgaagccg ttttatgcac ggtccccaat gacctgctga aattgaacag cgagctaaat    300
atagagtgga agcaagcaat ttcttcaacc gtccttggaa aagtaatagt tcaaccagat    360
cagaatttca cagctagctc tgactacaag gacgacgatg acaagagcga ttacaaagac    420
gatgatgata agctgcagca tcaccaccat catcaccatt ga                          462
```

<210> 11

<211> 2040

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación para Met delta 25-741

<400> 11

ES 2 368 603 T3

atgaaggccc	ccgctgtgct	tgcacctggc	atcctcgtgc	tcctgtttac	cttgggtgcag	60
aggagcaatg	gggagggggg	cggtggatct	cccattgtct	atgaaattca	tccaacccaa	120
tcttttatta	gtgggtgggag	cacaataaca	ggtgttggga	aaaacctgaa	ttcagttagt	180
gtccccgagaa	tggtcataaa	tgtgcatgaa	gcaggaagga	actttacagt	ggcatgtcaa	240
catcgctcta	attcagagat	aatctgttgt	accactcctt	ccctgcaaca	gctgaatctg	300
caactcccc	tgaaaacca	agcctttttc	atgttagatg	ggatcctttc	caaatacttt	360
gatctcattt	atgtacataa	tcctgtgttt	aagccttttg	aaaagccagt	gatgatctca	420
atgggcaatg	aaaatgtact	ggaaattaag	ggaaatgata	ttgaccctga	agcagttaaa	480
ggtgaagtgt	taaaagttgg	aaataagagc	tgtgagaata	tacacttaca	ttctgaagcc	540
gttttatgca	cggccccca	tgacctgctg	aaattgaaca	gcgagctaaa	tatagagtgg	600
aagcaagcaa	tttcttcaac	cgctcttggg	aaagtaatag	ttcaaccaga	tcagaatttc	660
acaggattga	ttgctgggtg	tgtctcaata	tcaacagcac	tgttattact	acttgggttt	720
ttcctgtggc	tgaaaaagag	aaagcaaatt	aaagatctgg	gcagtgaatt	agttcgctac	780
gatgcaagag	tacacactcc	tcatttggat	aggcttgtaa	gtgcccgaag	tgtaagccca	840
actacagaaa	tggtttcaaa	tgaatctgta	gactaccgag	ctacttttcc	agaagatcag	900
tttctaatt	catctcagaa	cggttcatgc	cgacaagtgc	agtatcctct	gacagacatg	960
tccccatcc	taactagtgg	ggactctgat	atatccagtc	cattactgca	aaatactgtc	1020
cacattgacc	tcagtgtctt	aaatccagag	ctgggccagg	cagtgcagca	tgtagtgatt	1080
gggcccagta	gcctgattgt	gcatttcaat	gaagtcatag	gaagagggca	ttttggttgt	1140
gtatatcatg	ggactttggt	ggacaatgat	ggcaagaaaa	ttcactgtgc	tgtgaaatcc	1200
ttgaacagaa	tactgacat	aggagaagtt	tcccaatttc	tgaccgaggg	aatcatcatg	1260
aaagatttta	gtcatcccaa	tgtcctctcg	ctcctgggaa	tctgcctgcg	aagtgaaggg	1320
tctccgctgg	tggtcctacc	atacatgaaa	catggagatc	ttcgaaattt	cattcgaaat	1380
gagactcata	atccaactgt	aaaagatctt	attggctttg	gtcttcaagt	agccaaaggc	1440
atgaaatata	ttgcaagcaa	aaagtttgtc	cacagagact	tggtgcaag	aaactgtatg	1500
ctggatgaaa	aattcacagt	caaggttgct	gattttggtc	ttgccagaga	catgtatgat	1560
aaagaatact	atagtgtaca	caacaaaaca	ggtgcaaagc	tgccagtgaa	gtggatggct	1620
ttggaaagtc	tgcaactca	aaagtttacc	accaagtcag	atgtgtggtc	ctttggcgtg	1680
ctcctctggg	agctgatgac	aagaggagcc	ccaccttata	ctgatgtaaa	cacctttgat	1740
ataactgttt	acttgttgca	agggagaaga	ctcctacaac	ccgaatactg	cccagacccc	1800
ttatatgaag	taatgctaaa	atgctggcac	cctaaagccg	aaatgccc	atccttttct	1860
gaactgggtg	cccgatatac	agcaatcttc	tctactttca	ttggggagca	ctatgtccat	1920
gtgaacgcta	cttatgtgaa	cgtaaaatgt	gtcgtccat	atccttctct	gttgtcatca	1980
gaagataacg	ctgatgatga	ggtggacaca	cgaccagcct	ccttctggga	gacatcatag	2040

ES 2 368 603 T3

<210> 12

<211> 2259

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación para HGF_MYChis

<400> 12

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcatctcctc	60
ctgctcccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat	120
gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa	180
accaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt	240
ccattcactt gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctgggtcccc	300
ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa	360
aacaaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctacaa gggaacagta	420
tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac	480
agctttttgc cttcgagcta tcggggtaaa gacctacagg aaaactactg tcgaaatcct	540
cgaggggaag aagggggacc ctgggtgtttc acaagcaatc cagaggtacg ctacgaagtc	600
tgtgacattc ctcaagtgtc agaagttgaa tgcattgacct gcaatgggga gagttatcga	660
ggtctcatgg atcatacaga atcaggcaag atttgtcagc gctgggatca tcagacacca	720
caccggcaca aattcttgcc tgaaagatat cccgacaagg gctttgatga taattattgc	780
cgcaatcccc atggccagcc gaggccatgg tgctatactc ttgaccctca caccgctgg	840
gagtactgtg caattaaac atgctgctgac aatactatga atgacactga tgttcctttg	900
gaaacaactg aatgcatcca aggtcaagga gaaggctaca ggggactgt caataccatt	960
tggaatggaa ttccatgtca gcgttgggat tctcagtatc ctcacgagca tgacatgact	1020
cctgaaaatt tcaagtgcaa ggacctacga gaaaattact gccgaaatcc agatgggtct	1080
gaatcacctt ggtgttttac cactgatcca aacatccgag ttggctactg ctcccaaatt	1140
ccaaactgtg atatgtcaca tggacaagat tgttatcgtg ggaatggcaa aaattatatg	1200
ggcaacttat cccaacaag atctggacta acatgttcaa tgtgggacaa gaacatggaa	1260
gacttacatc gtcatatctt ctgggaacca gatgcaagta agctgaatga gaattactgc	1320
cgaaatccag atgatgatgc tcatggacct tgggtgctaca cgggaaatcc actcattcct	1380
tgggattatt gccctatttc tcgttgatgaa ggtgatacca cacctacaat agtcaattta	1440
gaccatcccc taatatcttg tgccaaaacg aaacaattgc gagttgtaaa tgggattcca	1500

ES 2 368 603 T3

acacgaacaa acataggatg gatggtagt ttgagataca gaaataaaca tatctgcgga 1560
 ggatcattga taaaggagag ttgggttctt actgcacgac agtgtttccc ttctcgagac 1620
 ttgaaagatt atgaagcttg gcttgaatt catgatgtcc acggaagagg agatgagaaa 1680
 tgcaaacagg ttctcaatgt ttcccagctg gtatatggcc ctgaaggatc agatctggtt 1740
 ttaatgaagc ttgccaggcc tgctgtcctg gatgattttg ttagtacgat tgatttacct 1800
 aattatggat gcacaattcc tgaaaagacc agttgcagtg tttatggctg gggctacact 1860
 ggattgatca actatgatgg cctattacga gtggcacatc tctatataat gggaaatgag 1920
 aatgcagcc agcatcatcg agggaagtg actctgaatg agtctgaaat atgtgctggg 1980
 gctgaaaaga ttggatcagg accatgtgag ggggattatg gtggcccact tgtttgtgag 2040
 caacataaaa tgagaatggt tcttgggtgc attgttcctg gtcgtggatg tgccattcca 2100
 aatcgtcctg gtatTTTTgt ccgagtagca tattatgcaa aatggataca caaaattatt 2160
 ttaacatata aggtaccaca gtcagctagc gaacaaaaac tcatctcaga agaggatctg 2220
 aatggagggc tcgagcatca ccaccatcac catcattga 2259

<210> 13

<211> 1494

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de HGF-alfa_MYChis

<400> 13

ES 2 368 603 T3

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcattctcctc 60
 ctgctcccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120
 gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa 180
 accaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt 240
 ccattcactt gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc 300
 ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttgcc atgaatttga cctctatgaa 360
 aacaaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctacaa gggaacagta 420
 tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac 480
 agctttttgc cttcgagcta tcggggtaaa gacctacagg aaaactactg tcgaaatcct 540
 cgaggggaag aagggggacc ctggtgtttc acaagcaatc cagaggtacg ctacgaagtc 600
 tgtgacattc ctcagtgttc agaagttgaa tgcattgacct gcaatgggga gagttatcga 660
 ggtctcatgg atcatacaga atcaggcaag atttgtcagc gctgggatca tcagacacca 720
 caccggcaca aattcttgcc tgaagatat cccgacaagg gctttgatga taattattgc 780
 cgcaatcccg atggccagcc gaggccatgg tgctatactc ttgaccctca cacccgctgg 840
 gagtactgtg caattaaac atgcgctgac aatactatga atgacactga tgttcctttg 900
 gaaacaactg aatgcatcca aggtcaagga gaaggctaca ggggactgt caataccatt 960
 tggaatggaa ttccatgtca gcgttgggat tctcagtatc ctcacgagca tgacatgact 1020

 cctgaaaatt tcaagtgcaa ggacctacga gaaaattact gccgaaatcc agatgggtct 1080
 gaatcacct ggtgttttac cactgatcca aacatccgag ttggctactg ctcccaaatt 1140
 ccaaactgtg atatgtcaca tggacaagat tgttatcgtg ggaatggcaa aaattatag 1200
 ggcaacttat cccaaacaag atctggacta acatgttcaa tgtgggacaa gaacatggaa 1260
 gacttacatc gtcatatctt ctgggaacca gatgcaagta agctgaatga gaattactgc 1320
 cgaaatccag atgatgacgc tcatggacc tggtgctaca cgggaaatcc actcattcct 1380
 tgggattatt gccctatttc tcgttgtgaa ggtgataccg ctagcgaaca aaaactcatc 1440
 tcagaagagg atctgaatgg agggctcgag catcaccacc atcaccatca ttga 1494

<210> 14

<211> 705

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de HGF NK1_MYChis

<400> 14

ES 2 368 603 T3

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcatctcctc 60
 ctgctcccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120
 gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa 180
 accaaaaaag 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
 agctttttgc cttcgagcta tcggggtaaa gacctacagg aaaactactg tcgaaatcct 540
 cgaggggaag aagggggacc ctggtgtttc acaagcaatc cagaggtacg ctacgaagtc 600
 tgtgacattc ctcagtgttc agaagttgaa gctagcgaac aaaaactcat ctcagaagag 660
 gatctgaatg gagggctcga gcatcaccac catcaccatc attga 705

<210> 15

<211> 903

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de HGF-beta_MYchis

<400> 15

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcatctcctc 60
 ctgctcccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120
 gaattcgttg taaatgggat tccaacacga acaaacatag gatggatggt tagtttgaga 180
 tacagaaata aacatatctg cggaggatca ttgataaagg agagttgggt tcttactgca 240

10

ES 2 368 603 T3

cgacagtgtt tcccttctcg agacttgaaa gattatgaag cttggcttgg aattcatgat	300
gtccacggaa gaggagatga gaaatgcaaa caggttctca atgtttcca gctggtatat	360
ggccctgaag gatcagatct ggttttaatg aagcttgcca ggcctgctgt cctggatgat	420
tttgtttagta cgattgattt acctaattat ggagccacaa ttcctgaaaa gaccagttgc	480
agtgtttatg gctggggcta cactggattg atcaactatg atggcctatt acgagtggca	540
catctctata taatgggaaa tgagaaatgc agccagcatc atcgagggaa ggtgactctg	600
aatgagtctg aaatatgtgc tggggctgaa aagattggat caggaccatg tgaggggat	660
tatggtggcc cacttgtttg tgagcaacat aaaatgagaa tggttcttgg tgcattggt	720
cctggtcgtg gatgtgccat tccaaatcgt cctggtatth ttgtccgagt agcatattat	780
gcaaaatgga tacacaaaat tattttaaca tataaggtac cacagtcagc tagcgaacaa	840
aaactcatct cagaagagga tctgaatgga gggctcgagc atcaccacca tcaccatcat	900
tga	903

<210> 16

<211> 2259

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de HGF_MYChis no escindible

<400> 16

ES 2 368 603 T3

atgtgggtga	ccaaactcct	gccagccctg	ctgctgcagc	atgtcctcct	gcatctcctc	60
ctgctcccca	tcgccatccc	ctatgcagag	ggacaaagga	aaagaagaaa	tacaattcat	120
gaattcaaaa	aatcagcaaa	gactacccta	atcaaaatag	atccagcact	gaagataaaa	180
accaaaaaag	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
agctttttgc	cttcgagcta	tcggggtaaa	gacctacagg	aaaactactg	tcgaaatcct	540
cgaggggaag	aagggggacc	ctgggtgttc	acaagcaatc	cagaggtacg	ctacgaagtc	600
tgtgacattc	ctcagtgttc	agaagttgaa	tgcatgacct	gcaatgggga	gagttatcga	660
ggtctcatgg	atcatacaga	atcaggcaag	atgtgtcagc	gctgggatca	tcagacacca	720
caccggcaca	aattcttgcc	tgaaagatat	cccgacaagg	gctttgatga	taattattgc	780
cgcaatcccg	atggccagcc	gaggccatgg	tgctatactc	ttgaccctca	cacccgctgg	840
gagtactgtg	caattaaaac	atgcgctgac	aatactatga	atgacactga	tgttcctttg	900
gaaacaactg	aatgcatcca	agggtcaagga	gaaggctaca	ggggcactgt	caataccatt	960
tggaatggaa	ttccatgtca	gcgttgggat	tctcagtatc	ctcacgagca	tgacatgact	1020
cctgaaaatt	tcaagtgcaa	ggacctacga	gaaaattact	gccgaaatcc	agatgggtct	1080

ES 2 368 603 T3

gaatcacct ggtgttttac cactgatcca aacatccgag ttggctactg ctcccaaatt 1140
 ccaaactgtg atatgtcaca tggacaagat tgttatcgtg ggaatggcaa aaattatatg 1200
 ggcaacttat cccaacaag atctggacta acatgttcaa tgtgggacaa gaacatggaa 1260
 gacttacatc gtcatatctt ctgggaacca gatgcaagta agctgaatga gaattactgc 1320
 cgaaatccag atgatgatgc tcatggaccc tggtgctaca cgggaaatcc actcattcct 1380
 tgggattatt gccctatttc tcgttgtgaa ggtgatacca cacctacaat agtcaattta 1440
 gaccatcccg taatatcttg tgccaaaacg aaacaactgc aggttgtaaa tgggattcca 1500
 acacgaacaa acataggatg gatggttagt ttgagataca gaaataaaca tatctgcgga 1560
 ggatcattga taaaggagag ttgggttctt actgcacgac agtgtttccc ttctcgagac 1620
 ttgaaagatt atgaagcttg gcttggatt catgatgtcc acggaagagg agatgagaaa 1680
 tgcaaacagg ttctcaatgt ttcccagctg gtatatggcc ctgaaggatc agatctggtt 1740
 ttaatgaagc ttgccaggcc tgctgtcctg gatgattttg ttagtacgat tgatttacct 1800
 aattatggat gcacaattcc tgaaaagacc agttgcagtg tttatggctg gggctacact 1860
 ggattgatca actatgatgg cctattacga gtggcacatc tctatataat gggaaatgag 1920
 aatgcagcc agcatcatcg agggaaggtg actctgaatg agtctgaaat atgtgctggg 1980
 gctgaaaaga ttggatcagg accatgtgag ggggattatg gtggcccact tgtttgtgag 2040
 caacataaaa tgagaatggt tcttgggtgc attgttctctg gtcgtggatg tgccattcca 2100
 aatcgtcctg gtatTTTTTgt ccgagtagca tattatgcaa aatggatata caaaattatt 2160
 ttaacatata aggtaccaca gtcagctagc gaacaaaaac tcatctcaga agaggatctg 2220
 aatggagggc tcgagcatca ccaccatcac catcattga 2259

<210> 17

<211> 1197

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de NK1-NK1_his

<400> 17

ES 2 368 603 T3

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcatctcctc 60
 ctgctcccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120
 gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaaatag atccagcact gaagataaaa 180
 accaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt 240
 ccattcactt gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc 300
 ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttgcc atgaatttga cctctatgaa 360
 aacaaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctacaa gggaacagta 420
 tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac 480
 agctttttgc cttcgagcta tcggggtaaa gacctacagg aaaactactg tcgaaatcct 540
 cgaggggaag aagggggacc ctggtgtttc acaagcaatc cagaggtacg ctacgaagtc 600
 tgtgacattc ctcagtgttc agaagttgaa gctagcgaat tcaaaaaatc agcaaagact 660
 accctaataa aaatagatcc agcactgaag ataaaaacca aaaaagtgaa tactgcagac 720
 caatgtgcta atagatgtac taggaataaa ggacttccat tcacttgcaa ggcttttggt 780
 tttgataaag caagaaaaca atgcctctgg ttccccttca atagcatgtc aagtggagtg 840
 aaaaaagaat ttggccatga atttgacctc tatgaaaaca aagactacat tagaaactgc 900
 atcattggta aaggacgcag ctacaagggg acagtatcta tactaagag tggcatcaaa 960
 tgtcagccct ggagttccat gataccacac gaacacagct ttttgccttc gagctatcgg 1020
 ggtaaagacc tacaggaaaa ctactgtcga aatcctcgag ggggaagaagg gggaccctgg 1080
 tgtttcacaa gcaatccaga ggtacgctac gaagtctgtg acattcctca gtgttcagaa 1140
 gttgaagcta gtgggggtgg tagtggagga gggcatcacc atcatcacca tcaactga 1197

<210> 18

<211> 1218

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de hAS_MYC

<400> 18

ES 2 368 603 T3

atggaacata aggaagtggg tcttctactt cttttatttc tgaaatcagg tcaaggagtg 60
 tatctctcag agtgcaagac tgggaatgga aagaactaca gagggacgat gtccaaaaca 120
 aaaaatggca tcacctgtca aaaatggagt tccacttctc cccacagacc tagattctca 180
 cctgctacac acccctcaga gggactggag gagaactact gcaggaatcc agacaacgat 240
 ccgagggggc cctggtgcta tactactgat ccagaaaaga gatatgacta ctgcgacatt 300
 cttgagtgtg aagaggaatg tatgcattgc agtggagaaa actatgacgg caaaatttcc 360
 aagaccatgt ctggactgga atgccaggcc tgggactctc agagcccaca cgctcatgga 420
 tacattcctt ccaaatttcc aaacaagaac ctgaagaaga attactgtcg taaccccgat 480
 agggagctgc ggccctggg tttcaccacc gaccccaaca agcgctggga actttgagac 540
 atcccccgct gcacaacacc tccaccatct tctgggtcca cctaccagtg tctgaagggg 600
 acaggtgaaa actatcgcgg gaatgtggct gttaccgttt ccggggcacac ctgtcagcac 660
 tggagtgcac agaccctca cacacataac aggacaccag aaaacttccc ctgcaaaaat 720
 ttggatgaaa actactgccg caatcctgac ggaaaaaggg ccccatggtg ccatacaacc 780
 aacagccaag tgcggtggga gtactgtaag ataccgtcct gtgactcctc cccagtatcc 840
 acggaacaat tggctcccac agcaccacct gagctaacc ctgtggtcca ggactgctac 900
 catggtgatg gacagagcta ccgaggcaca tcctccacca ccaccacagg aaagaagtgt 960
 cagtcttggc catctatgac accacaccgg caccagaaga cccagaaaa ctacccaat 1020
 gctggcctga caatgaacta ctgcaggaat ccagatgccg ataaaggccc ctggtgtttt 1080
 accacagacc ccagcgtcag gtgggagtac tgcaacctga aaaaatgctc aggaacagaa 1140

 gcggctagcg aacaaaaact catctcagaa gaggatctga atggagggct cgagcatcac 1200
 caccatcacc atcattga 1218

<210> 19

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Flag en el extremo C

<400> 19

Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

10

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

ES 2 368 603 T3

<223> Myc simple en el extreme C

<400> 20

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
1 5 10

<210> 21

5 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> marca poli-histidina

10 <400> 21

His His His His His His His
1 5

15

20

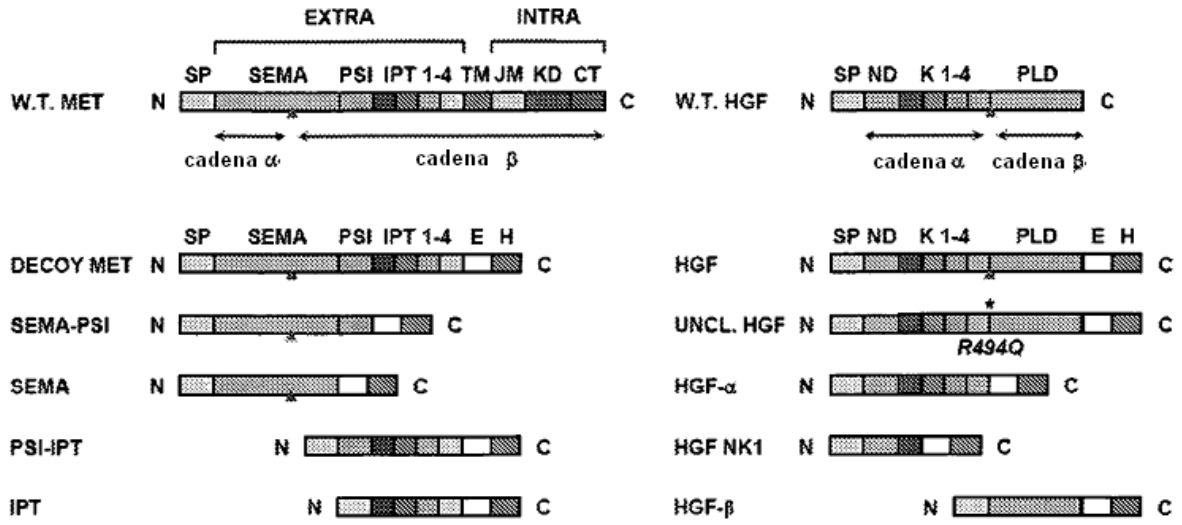
25

30

REIVINDICACIONES

1. Uso de un polinucleótido que codifica un polipéptido constituido por los dominios extracelulares IPT-3 e IPT-4 del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos para la selección de agentes farmacológicamente activos útiles en el tratamiento de cáncer.
- 5 2. Uso de un polipéptido constituido por los dominios extracelulares IPT-3 e IPT-4 del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos para la selección de agentes farmacológicamente activos útiles en el tratamiento de cáncer.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho agente farmacológicamente activo interfiere con la actividad catalítica, función, estabilidad y / o expresión del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos.
- 10 4. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho agente farmacológicamente activo regula por disminución la actividad catalítica, función, estabilidad y / o expresión del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos.
- 15 5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho agente farmacológicamente activo es un inhibidor y / o antagonista del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos.
6. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho agente farmacológicamente activo se selecciona entre inhibidores de moléculas pequeñas, aptámeros, nucleótidos no codificantes, inhibidores a base de ARN, ARNsi, anticuerpos, péptidos, negativos dominantes.
- 20 7. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el cáncer es un cáncer con disregulación de la actividad del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos.
8. Un procedimiento para detectar la capacidad de un agente de ensayo para actuar como un antagonista/inhibidor del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos útil en el tratamiento de cáncer, preferiblemente un cáncer con disregulación de la actividad del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos, que comprende las etapas de:
 - 25 (a) poner en contacto un agente de ensayo con i) un polinucleótido que codifica un polipéptido constituido por los dominios extracelulares IPT-3 e IPT-4 del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos, ii) un polipéptido constituido por los dominios extracelulares IPT-3 e IPT-4 del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos, o iii) células que expresan los dominios extracelulares IPT-3 e IPT-4, la hélice transmembrana y la región citoplásmica completa del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos,
 - 30 (b) medir la actividad, función, estabilidad y / o expresión del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos, y
 - (c) seleccionar el agente que reduce la actividad, función, estabilidad y / o expresión del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha medición de en la etapa b) comprende medir la señalización de las células, supervivencia celular, y proliferación celular.
- 35 10. Los dominios extracelulares IPT-3 e IPT-4 del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos para uso como un medicamento para tratamiento de cáncer.
11. Vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido constituido por los dominios extracelulares IPT-3 e IPT-4 del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos para uso como un medicamento para tratamiento de cáncer.

A



B

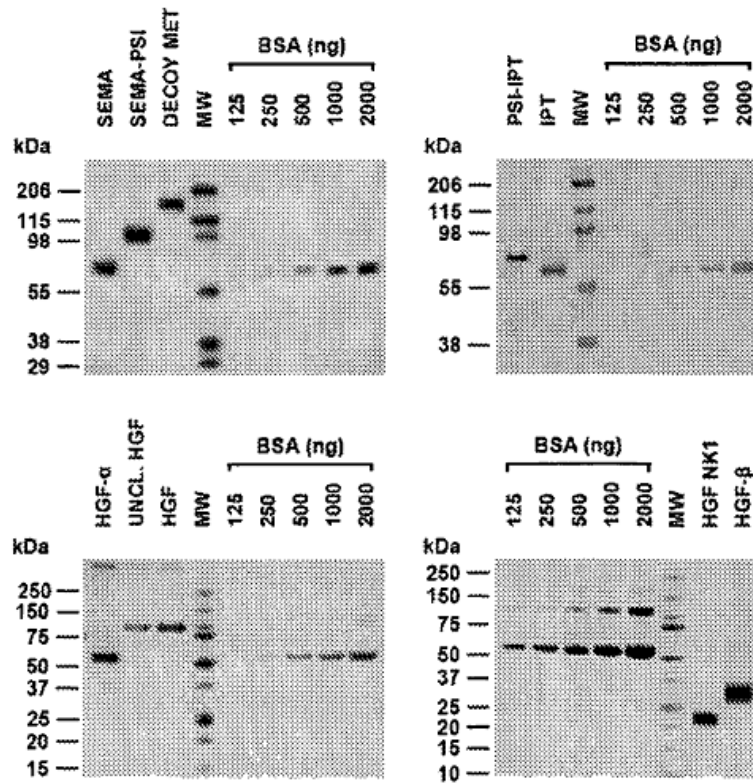


Figura 1

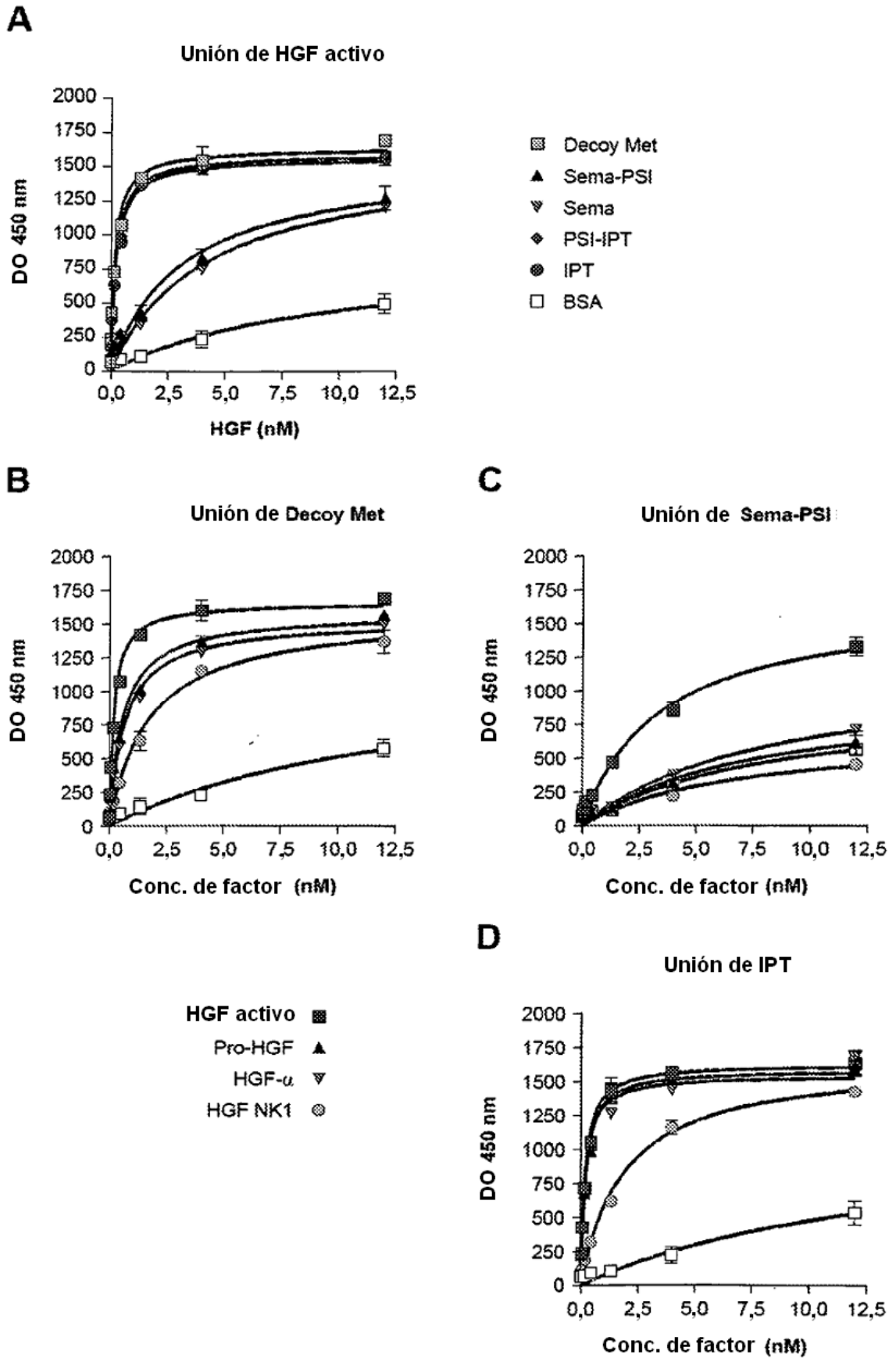
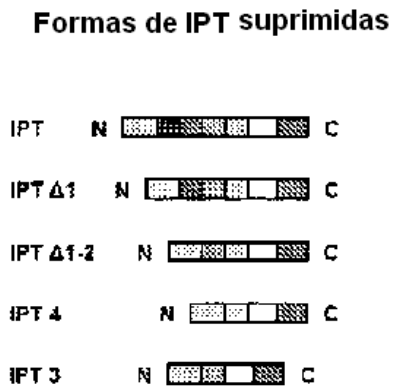


Figura 2

A



B

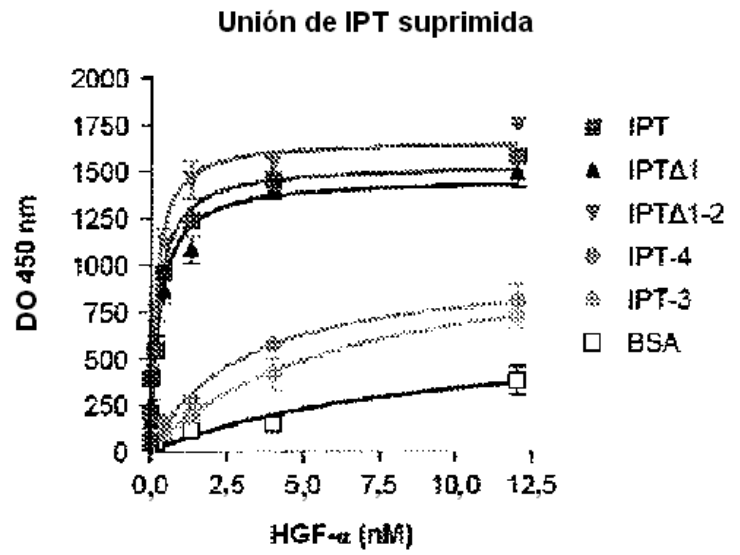


Figura 3

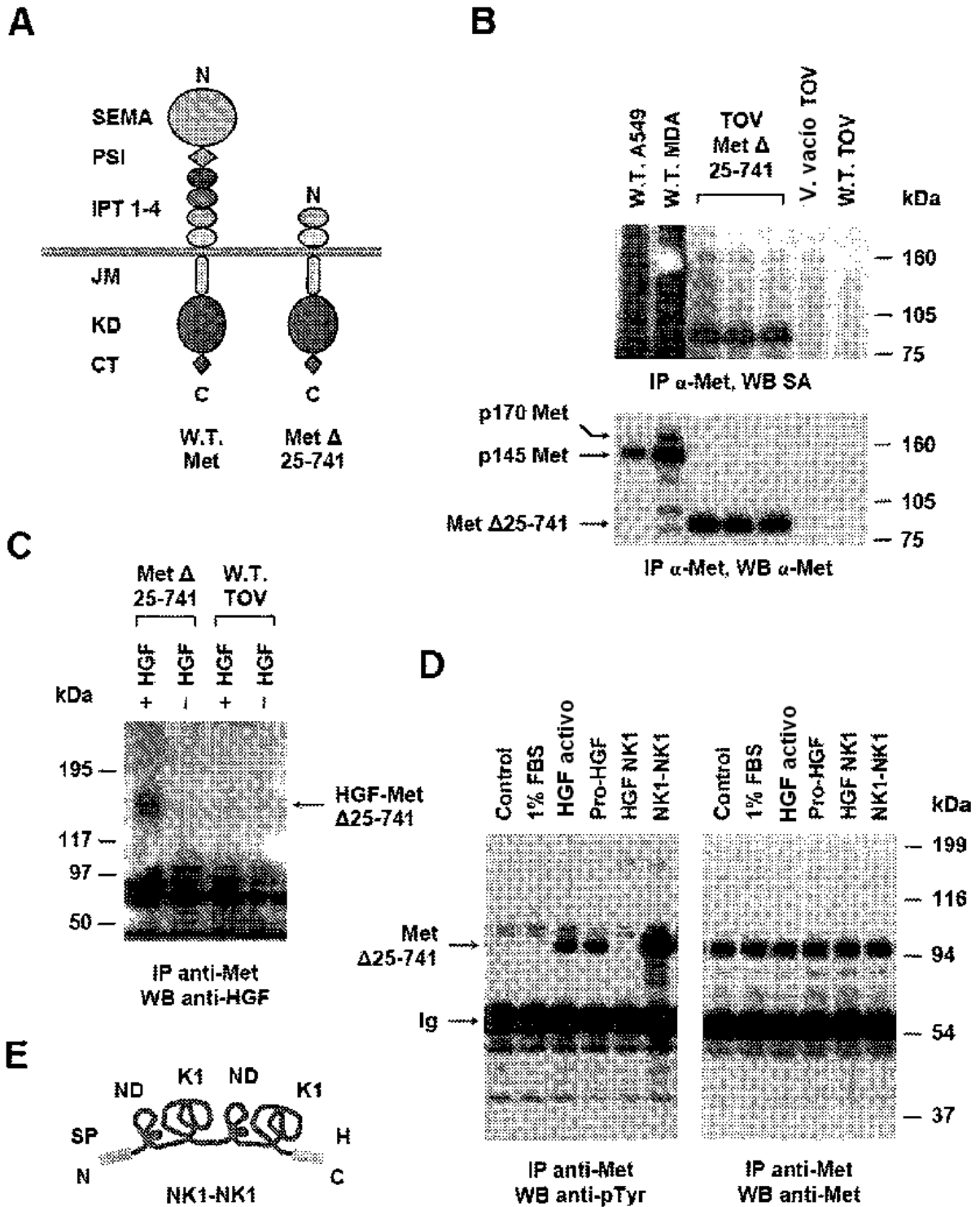


Figura 4

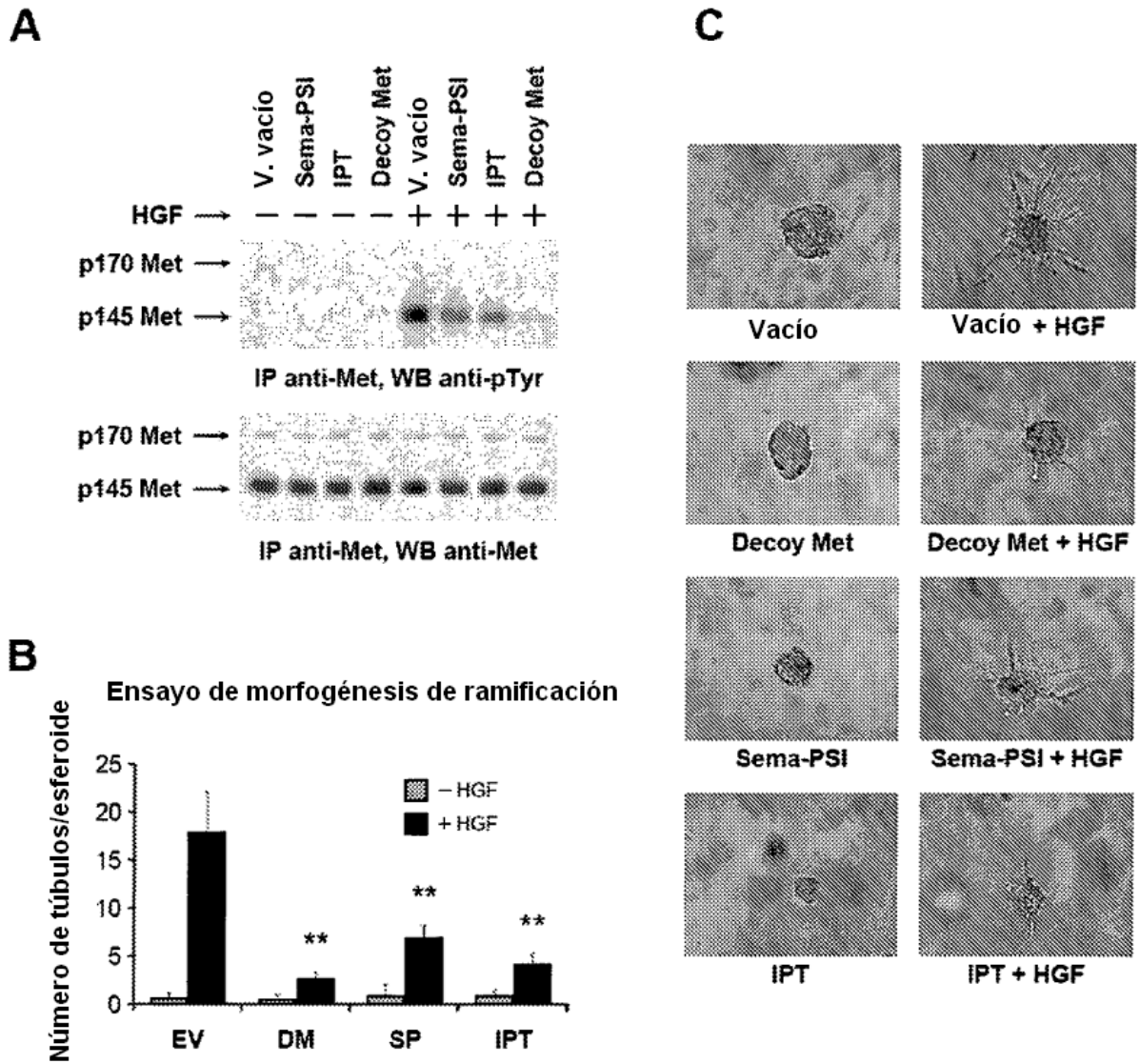


Figura 5

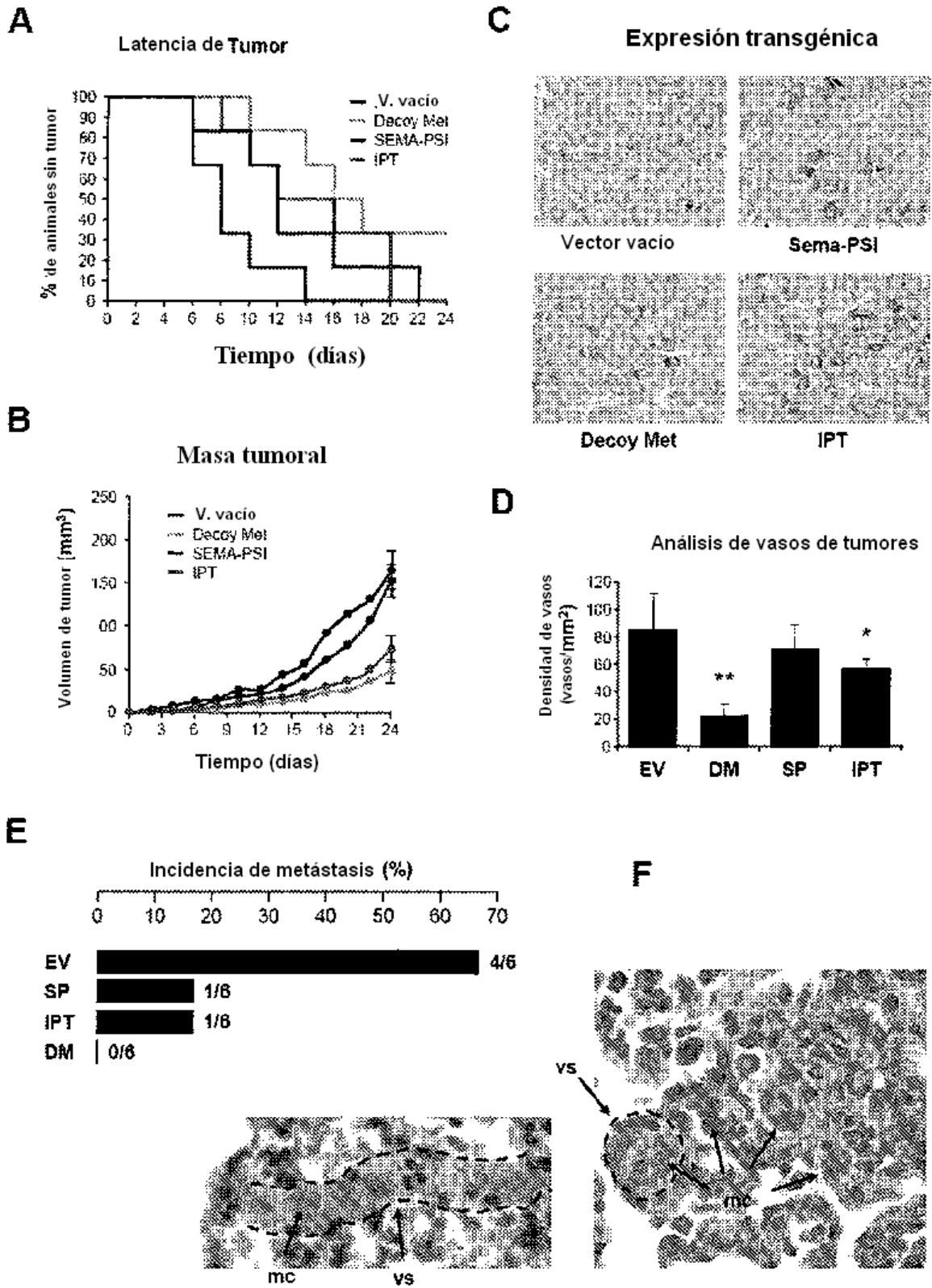


Figura 6