

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 794**

51 Int. Cl.:

C07K 14/755 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2004** **E 10013146 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015** **EP 2338911**

54 Título: **Uso de chaperonas moleculares para aumentar la producción de proteínas recombinantes secretadas en células de mamífero**

30 Prioridad:

27.06.2003 US 483505 P

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

24.06.2015

73 Titular/es:

**BAYER HEALTHCARE LLC (100.0%)
100 Bayer Boulevard, PO Box 915
Whippany, NJ 07981, US**

72 Inventor/es:

**CHAN, SHAM-YUEN;
TANG, HSINYJ YVETTE;
TAO, YIWEN;
WU, YONGJIAN y
KELLY, RUTH**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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).

ES 2 538 794 T3

DESCRIPCIÓN

Uso de chaperonas moleculares para aumentar la producción de proteínas recombinantes secretadas en células de mamífero

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al campo general de la producción de proteínas recombinantes en una célula hospedadora de mamífero. Específicamente, la presente invención se refiere a aumentar la producción de bikunina recombinante o proteína Factor VIII mediante la coexpresión de al menos una proteína chaperona Erp57 en la célula hospedadora de mamífero.

Antecedentes de la invención

- 10 En las células procariotas y eucariotas, las proteínas chaperonas moleculares catalizan el intercambio de enlaces disulfuro y ayudan en el plegamiento correcto de proteínas recién sintetizadas. Esta observación ha conducido a una gran cantidad de estudios y se han propuesto usos para estas proteínas de control de calidad. Por ejemplo, el aumento de la actividad pDI (proteína disulfuro isomerasa) en sistemas de expresión de células bacterianas, de insecto y de levadura puede tener efectos beneficiosos sobre la solubilidad de la proteína y el plegamiento y, en algunos casos, puede conducir a un aumento de la secreción de proteínas heterólogas (1-7). Además, otros estudios han mostrado que la chaperona molecular, proteína de unión a la cadena pesada de la inmunoglobulina (BiP, también conocida como proteína regulada por glucosa) y la proteína de choque térmico 70 humana (Hsp 70), tienen un efecto beneficioso sobre la expresión de proteínas recombinantes en sistemas de células de insectos (5, 8-12).

- 20 Las chaperonas moleculares no han tenido el mismo nivel de éxito sobre la expresión y la secreción de proteínas recombinantes en sistemas de células de mamífero. Por ejemplo, la hiperexpresión de la chaperona pDI en células de ovario de hámster chino (CHO) no solo no tuvo efecto sobre los niveles de secreción de IL-15, sino que además causó una disminución en la secreción, y un aumento de la retención celular de una proteína de fusión receptor de factor de necrosis tumoral-Fc (TNFR: Fc) (13). Otros estudios han mostrado que la hiperexpresión de la chaperona BiP en células de mamífero puede conducir a una mayor retención celular y a una disminución de la secreción de proteínas recombinantes (14-15 y el documento de Patente de EE.UU. n° 4.912.040). Los mecanismos reguladores implicados en el procesamiento de proteínas dentro de la célula de mamífero son complejos y probablemente implican la cooperación de muchas de estas proteínas chaperonas. Por lo tanto, no se puede predecir si una chaperona particular producirá un aumento de la producción de una determinada proteína recombinante.

- 30 Debido a las teorías contradictorias en este tema, el efecto de las proteínas chaperonas sobre la producción de un producto proteico recombinante secretado no se entiende ni se aprecia. El documento de Patente de EE.UU. n° 6.451.597 (la patente 597) describe un método para mejorar la producción de partículas víricas, y especula sobre el efecto de las chaperonas en la mejora del rendimiento de una proteína recombinante en células eucariotas. Sin embargo, no se describe ninguna expresión real de una proteína recombinante. Sin embargo, otros estudios han encontrado que la hiperexpresión de chaperonas en líneas de células eucariotas o bien no tuvo efecto sobre los rendimientos del producto o había una reducción de la secreción de las proteínas recombinantes (14, 15). Véase también el documento de Patente de EE.UU. n° 4.912.040. Teniendo en cuenta las teorías contradictorias en este tema, la patente 597 no permite que un experto en la técnica utilice chaperonas para mejorar la producción y la secreción de una proteína recombinante en células eucariotas. El estado de la técnica no explica cómo predecir qué efecto va a tener una chaperona particular sobre la producción y la secreción de una proteína recombinante dada en modelos de cultivos celulares, tales como los descritos en el presente documento. Los solicitantes se sorprendieron en consecuencia, por encontrar que cuando las chaperonas descritas en este estudio se transfectaban en líneas celulares de mamífero que expresaban una proteína recombinante secretada, el efecto resultante era un aumento general en la producción de la proteína secretada.

Compendio de la invención

- 45 En un primer aspecto de la invención, se proporciona una célula hospedadora CHO de mamífero para mejorar la expresión de una proteína bikunina recombinante, teniendo dicha célula CHO de mamífero un material genético que codifica para la expresión de dicha proteína bikunina recombinante y estando transformada con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona Erp57.

En una realización del primer aspecto de la invención, el producto proteico recombinante se secreta.

- 50 En otra realización de la invención, el material genético que codifica para la expresión de dicho producto proteico recombinante está integrado en el ADN de la célula hospedadora.

En otra realización de la invención, la célula hospedadora de mamífero se transforma adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.

- 55 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para producir una célula hospedadora CHO de mamífero para mejorar la expresión de una proteína bikunina recombinante, en donde el método comprende proporcionar una

célula CHO de mamífero que tiene material genético que codifica para la expresión de una proteína bikunina recombinante; y transformar la célula CHO de mamífero con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona Erp57.

En una realización de este aspecto de la invención, el producto proteico recombinante se secreta.

- 5 En otra realización de la invención, el material genético que codifica para la expresión de dicho producto proteico recombinante está integrado en el ADN de la célula hospedadora.

En otra realización de la invención, la célula hospedadora de mamífero se transforma adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.

- 10 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para producir un producto proteico recombinante secretado, en donde el método comprende las etapas de: cultivar una célula hospedadora de mamífero de la reivindicación 1 o la reivindicación 2; y recuperar a partir del medio de cultivo la proteína recombinante así producida y secretada de esta manera.

En una realización de este aspecto de la invención, el producto proteico recombinante es secretado.

- 15 En otra realización de la invención, el material genético que codifica para la expresión de dicho producto proteico recombinante está integrado en el ADN de la célula hospedadora.

En otra realización de la invención, la célula hospedadora de mamífero se transforma adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.

- 20 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para mejorar el rendimiento de una proteína bikunina recombinante en donde el material genético que codifica para la expresión de dicha proteína recombinante se ha introducido previamente en la línea celular para formar la primera línea celular, comprendiendo dicho método las etapas de: insertar al menos un vector de expresión de la proteína chaperona que comprende ADN que codifica una proteína chaperona Erp57 en dicha primera línea celular para formar de este modo una línea celular modificada; y seleccionar a partir de dicha línea celular modificada al menos una segunda línea celular que muestra un rendimiento mejorado de la proteína recombinante.

- 25 En una realización de este aspecto de la invención, el producto proteico recombinante es secretado.

En otra realización de la invención, el material genético que codifica para la expresión de dicho producto proteico recombinante está integrado en el ADN de la primera línea celular.

En otra realización de la invención, la segunda línea celular se transforma adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.

- 30 En otra realización de la invención, se produce al menos una segunda línea celular a partir de dicha primera línea celular seleccionando una porción de dicha primera línea celular que muestra integración del vector de expresión de la proteína chaperona dentro del ADN del hospedador.

- 35 También se describe un método para mejorar el rendimiento de una proteína recombinante o de un fragmento de la misma en una célula de mamífero, en donde el método comprende introducir material genético que codifica una proteína recombinante o un fragmento de la misma en una línea celular que muestra una expresión mejorada de la proteína chaperona.

En una realización, el producto proteico recombinante es secretado.

En otra realización, el material genético que codifica para la expresión de dicho producto proteico recombinante se integra en el ADN de la célula hospedadora.

- 40 En otra realización, la célula se transforma adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.

En otra realización, el producto proteico recombinante comprende bikunina, Factor VIII, IL2SA o un fragmento de los mismos.

En otra realización, la proteína chaperona comprende calnexina, calreticulina, Erp57, Hsp40 o Hsp70.

- 45 En otra realización, la proteína chaperona comprende calreticulina y Erp57.

Breve descripción de los dibujos

La invención se entenderá mejor tomando en cuenta la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones, junto con los dibujos, en los cuales:

la Figura 1 muestra las secuencias de cebadores de RT-PCR usados para amplificar el ADNc de chaperonas del RE procedentes de una genoteca de ADNc humano. La parte subrayada indica un sitio de restricción construido para EcoRI (cebador 5') o XbaI (cebador 3'). CNX: calnexina; CRT: calreticulina;

5 la Figura 2A representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos completas de calnexina clonadas mediante RT-PCR. Los sitios 5' EcoRI y 3' XbaI dentro de los cebadores están subrayados. El codón de inicio y el codón de parada se muestran en negrita;

la Figura 2B representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos completas de calreticulina clonadas mediante RT-PCR. Los sitios 5' EcoRI y 3' XbaI están subrayados. El codón de inicio y el codón de parada se muestran en negrita;

10 la Figura 2C representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos completas de Erp57 clonadas mediante RT-PCR. Los sitios 5' EcoRI y 3' XbaI están subrayados. El codón de inicio y el codón de parada se muestran en negrita;

la Figura 2D representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos completas de la región que codifica el gen de Hsp70 humana;

15 la Figura 2E representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos completas de la región que codifica el gen de Hsp40 humana. El codón de inicio se muestra en negrita y subrayado;

la Figura 2F representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos completas de la región que codifica el gen de la sintetasa de glutamina. El codón de inicio se muestra en negrita y subrayado;

20 la Figura 3 es una ilustración de la hiperexpresión de bikunina en clones supertransfectados con calnexina (X4.14:5, X4/14:30), Hsp70 (7-3) o Erp57 (X4/19:62). La tasa de producción específica de bikunina para todas las líneas celulares se expresa como pg de bikunina/célula/día (SPR). Cada día se recogieron células y se transfirieron a medio de nuevo aporte y se incubaron durante 24 horas a 37°C en matraces de agitación. Al día siguiente, las células se recogieron de nuevo, se contaron y resuspendieron en medio de nuevo aporte del mismo volumen y se incubaron de manera similar durante otras 24 horas. Las mediciones de la actividad de bikunina (pg/célula/día) se realizaron sobre muestras de medios agotados. El mismo procedimiento se repitió cada día hasta que el número de células y la viabilidad empezaron a disminuir. La línea celular testigo (CF 9-20) expresa bikunina pero no expresa ninguna de las proteínas chaperonas;

la Figura 4 es una ilustración de la hiperexpresión de bikunina en clones supertransfectados con Hsp70. Todos los clones, excepto CF9-20 (células testigo) están supertransfectados con Hsp70. El procedimiento del experimento es el mismo que el descrito en la Figura 3; y

30 la Figura 5 representa la secuencia de aminoácidos de bikunina.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método y a reactivos para el mismo, para mejorar la expresión de un producto proteico recombinante secretado en una célula hospedadora de mamífero.

35 En una realización de la invención, se proporciona una célula hospedadora CHO de mamífero para mejorar la expresión de una proteína bikunina recombinante, en donde dicha célula CHO de mamífero comprende material genético que codifica para la expresión de dicha proteína bikunina recombinante y se transforma con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona Erp57.

40 En otra realización de la invención, la célula hospedadora de mamífero se transforma de manera estable con el material genético que codifica para la expresión de dicho producto proteico recombinante.

La expresión "célula hospedadora de mamífero" se utiliza para referirse a una célula de mamífero que ha sido transfectada, o que es capaz de ser transfectada con una secuencia de ácido nucleico y a continuación expresar un gen seleccionado de interés. La expresión incluye la progenie de la célula progenitora, sea la progenie idéntica o no en la morfología o en la composición genética, frente a la progenitora original, siempre que el gen seleccionado esté presente.

45 Las células de mamífero adecuadas para uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a células de ovario de hámster chino (CHO) y células de riñón de cría de hámster (BHK). Las líneas celulares se pueden adquirir fácilmente en la ATCC.

50 El término "transfección" se utiliza para referirse a la captación de ADN extraño o exógeno en una célula, y una célula ha sido "transfectada" cuando el ADN exógeno se ha introducido al interior de la membrana celular. Se conocen bien en la técnica una variedad de técnicas de transfección y se describen en el presente documento. Véanse, por ejemplo, Graham et al., 1973, *Virology* 52:456; Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology* (Elsevier, 1986); y

Chu et al., 1981, *Gene* 13:197. Tales técnicas se pueden utilizar para introducir uno o varios restos de ADN exógeno en células hospedadoras adecuadas.

Técnicas adecuadas de transfección para uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a transfección mediada con fosfato de calcio, transfección mediada con DEAE-dextrano y electroporación. La transfección con lípidos catiónicos que emplea reactivos disponibles comercialmente, incluyendo el reactivo de transfección de Boehringer Mannheim (amoniometilsulfato de N->1-(2,3-dioleoiloxi)propil-N,N,N-trimetilo, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.) o también se puede utilizar el reactivo LIPOFECTINA o LIPOFECTAMINA o DMRIE (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD).

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "supertransfección" se refiere a transfectar más de un vector de expresión a una célula hospedadora que ya expresa un gen recombinante.

El término "transformación" tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un cambio en una característica genética de una célula, y una célula se ha transformado cuando se modifica para contener un nuevo ADN. Por ejemplo, una célula se transforma cuando se modifica genéticamente a partir de su estado natural. Después de la transfección, el ADN transformante se puede recombinar con el de la célula mediante integración física en un cromosoma de la célula, se puede conservar de forma temporal como un elemento episomal sin replicarlo, o se puede replicar independientemente como un plásmido. Una célula se considera que se ha transformado de manera estable cuando el ADN se replica con la división de la célula.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "línea celular modificada" se refiere a una línea celular, ya sea transformada de forma temporal o estable, con una o varias estructuras artificiales de ADN.

Los polinucleótidos, el material genético, las moléculas de ADN recombinante, los vectores de expresión y semejantes, utilizados en la puesta en práctica de la presente invención, se pueden aislar utilizando métodos de clonación convencionales tales como los descritos por Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Alternativamente, los polinucleótidos que codifican un producto proteico recombinante de la presente invención se pueden sintetizar usando métodos convencionales que son bien conocidos en la técnica, tales como la síntesis en un sintetizador de ADN automatizado. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican la proteína calnexina son sintetizadas mediante RT-PCR usando cebadores descritos en la Figura 1.

Tal como se usa en el presente documento un "vector de expresión" se refiere a una molécula de ADN, o a un clon de una molécula de ese tipo, que se ha modificado gracias a la intervención humana para contener segmentos de ADN, combinados y yuxtapuestos de una manera que de lo contrario no existiría en la naturaleza. Las estructuras artificiales de ADN se pueden producir mediante ingeniería genética para incluir un primer segmento de ADN que codifica un polipéptido de la presente invención ligado funcionalmente a segmentos de ADN adicionales requeridos para la expresión del primer segmento de ADN. En el contexto de la presente invención, los segmentos adicionales de ADN incluirán generalmente promotores y terminadores de la transcripción y puede incluir, además, potenciadores y otros elementos. Uno o varios marcadores seleccionables también pueden estar incluidos. Las estructuras artificiales de ADN útiles para expresar segmentos de ADN clonados en una variedad de células hospedadoras procariotas y eucariotas, se pueden preparar a partir de componentes fáciles de conseguir o se pueden adquirir a partir de proveedores comerciales.

Las estructuras artificiales de ADN también pueden contener segmentos de ADN necesarios para dirigir la secreción de un polipéptido o una proteína de interés. Tales segmentos de ADN pueden incluir al menos una secuencia señal secretora. Las secuencias señal secretoras, también llamadas secuencias líder, secuencias prepro y/o secuencias pre, son secuencias de aminoácidos que actúan para dirigir la secreción de polipéptidos o proteínas maduras a partir de una célula. Tales secuencias se caracterizan por un núcleo de aminoácidos hidrófobos y se encuentran típicamente (pero no exclusivamente) en los extremos amino de las proteínas recién sintetizadas. Muy frecuentemente, el péptido secretor se escinde de la proteína madura durante la secreción. Tales péptidos secretores contienen sitios de procesamiento que permiten la escisión del péptido secretor a partir de la proteína madura, a medida que pasa a través de la vía secretora. Una proteína recombinante puede contener una secuencia señal secretora en su secuencia de aminoácidos original, o se puede modificar genéticamente para convertirse en una proteína secretada mediante la inserción de una secuencia señal secretora modificada genéticamente en su secuencia de aminoácidos original. La elección de promotores, terminadores y señales secretoras adecuadas pertenece al nivel de experiencia normal en la técnica. La expresión de genes clonados en células de mamífero cultivadas y en *E. coli*, por ejemplo, se describe detalladamente en Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "producto proteico recombinante" se refiere a una proteína recombinante o a un fragmento de la misma, expresados a partir del material genético introducido en la célula hospedadora de mamífero.

Después de la transfección, la célula se puede mantener transformada de forma temporal o transformada de forma estable con dicha estructura artificial de ADN. La introducción de estructuras artificiales múltiples de ADN, y la

- selección de las células que contienen las estructuras artificiales múltiples de ADN se puede hacer de forma simultánea o, más preferiblemente, secuencialmente. El método para establecer una línea celular transformada de forma estable con un material genético o un vector de expresión es bien conocido en la técnica (Current Protocols in Molecular Biology). En general, después de la transfección, el medio de crecimiento seleccionará las células que contienen la estructura artificial de ADN mediante, por ejemplo, selección con fármacos o carencia de un nutriente esencial, que se complementa con un marcador seleccionable en la estructura artificial de ADN o que se ha cotransfectado con la estructura artificial de ADN. Las células de mamífero se cultivan generalmente en medio que contiene suero o que está exento de suero, disponible comercialmente. La selección de un medio apropiado para la célula hospedadora particular empleada, está dentro del nivel de experiencia ordinaria en la técnica.
- Los marcadores seleccionables adecuados para la selección con fármacos empleados en esta invención, incluyen, pero no se limitan a neomicina (G418), higromicina, puromicina, zeocina, colchicina, metotrexato y metionina sulfoximina.
- Una vez que se establece una población de células resistentes a un fármaco, los clones individuales se pueden seleccionar y escrutar en busca de clones con expresión elevada. Los métodos para establecer una línea celular clonada son bien conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, el uso de un cilindro de clonación o por dilución limitante. La expresión del producto recombinante de interés a partir de cada clon se puede medir por métodos tales como, pero no limitados a, inmunoensayo, ensayo enzimático o ensayo cromogénico.
- La línea celular transformada de forma estable con una primera estructura artificial de ADN se puede utilizar a continuación como célula hospedadora para la transfección con una segunda estructura artificial de ADN o varias, y se pueden someter a diferentes selecciones con fármacos.
- En una realización de la invención se proporciona una célula hospedadora CHO de mamífero para mejorar la expresión de una proteína bikunina, en donde la célula hospedadora CHO de mamífero se transforma adicionalmente con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica para la proteína chaperona Erp57.
- Tal como se utiliza en esta memoria, el término "bikunina" se refiere a cualquier proteína, que tiene al menos un dominio Kunitz. Los dominios de tipo Kunitz se han descrito en referencias tales como Laskowsld et al., 1980, Ann Rev Biochem. 49:593-626; y el documento de Patente de EE.UU. nº 5.914.315 (22 de junio, 1999). En una realización preferida, el término bikunina empleado en esta memoria se refiere a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 5. Otras proteínas bikuninas y fragmentos de las mismas se describen en los documentos de Solicitud de EE.UU. con números de serie 09/144.428, 09/974.026, 09/218.913 y 09/441.966, y las solicitudes PCT con números de serie US97/03894, publicada como WO 97/33996, y US99/04381, publicada como WO 00/37099.
- En otra realización de la invención, la invención proporciona una célula hospedadora BHK de mamífero que potencia la expresión y la secreción de proteína del Factor VIII y la célula hospedadora BHK de mamífero se transforma adicionalmente con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica la proteína chaperona Erp57 y al menos un vector de expresión que comprende calreticulina.
- En una realización preferida, la proteína Factor VIII tiene la secuencia representada en el documento de Patente de EE.UU. nº 4.965.199.
- También se describe en esta memoria una célula hospedadora de mamífero con una expresión y secreción potenciadas de la proteína IL2SA o de un fragmento de la misma, y la célula hospedadora de mamífero se transforma adicionalmente con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona seleccionada entre el grupo que consiste en calnexina, calreticulina, Erp57, Hsp40 o Hsp70.
- En una realización preferida, la proteína IL2SA tiene la secuencia descrita en el documento de patente de EE.UU. nº 6.348.192.
- En otra realización preferida, la célula hospedadora de mamífero con aumento de la expresión y la secreción de IL2SA, es una célula CHO.
- En otra realización más de la invención, la célula hospedadora de mamífero se transforma adicionalmente con un vector de expresión que codifica una proteína sintetasa de glutamina.
- La presente invención también proporciona un método para producir una célula hospedadora de mamífero como se define en la reivindicación 1 ó 2, para mejorar la expresión de dicha proteína recombinante diana que comprende: proporcionar una célula de mamífero que tiene material genético que codifica para la expresión de dicha proteína recombinante diana; y transformar la célula de mamífero con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona Erp57.
- En una realización de la invención, el material genético que codifica para la expresión de dicho producto proteico recombinante está integrado en el ADN de la célula hospedadora.

En otra realización de la invención, la célula hospedadora de mamífero se transforma adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.

En una realización preferida de la invención, el producto proteico recombinante es bikunina y la transformación tiene lugar con un vector de expresión que comprende el ADN que codifica Erp57.

- 5 En otra realización preferida de la invención, el producto proteico recombinante es Factor VIII y la transformación tiene lugar con un primer vector de expresión que comprende ADN que codifica calreticulina y un segundo vector de expresión que comprende ADN que codifica Erp57.

10 También se describe en esta memoria un producto proteico recombinante que es el Factor VIII o un fragmento del mismo, y la transformación tiene lugar con un vector de expresión que comprende ADN que codifica calnexina o Hsp70.

También se describe en esta memoria un producto proteico recombinante que es IL2SA o un fragmento de la misma, y la transformación tiene lugar con un vector de expresión que comprende ADN que codifica Hsp70.

15 La presente invención también proporciona un método para producir un producto proteico recombinante secretado que comprende cultivar una célula hospedadora de mamífero de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, y recuperar a partir del medio de cultivo la proteína recombinante producida y secretada de esta forma.

En una realización de la invención, el método para producir un producto proteico recombinante secretado comprende cultivar una célula hospedadora de mamífero, en donde la célula hospedadora de mamífero se transforma de manera estable con un material genético que codifica para la expresión de dicho producto recombinante.

20 En otra realización de la invención, el método para producir un producto proteico recombinante secretado comprende además transfectar la célula hospedadora de mamífero con un vector de expresión que codifica una proteína sintetasa de glutamina.

25 Una realización de la invención proporciona un método para producir una proteína bikunina que comprende cultivar una célula hospedadora CHO de mamífero que expresa bikunina y al menos una proteína chaperona Erp57; y recuperar a partir del medio de cultivo la proteína bikunina producida y secretada de este modo.

30 En una realización de la invención, se proporciona un método para mejorar la producción de una proteína bikunina recombinante en una célula CHO, en donde un material genético que codifica para la expresión de dicho bikunina recombinante se ha introducido previamente en una primera línea celular CHO (como se describe en el documento de Solicitud de Patente de EE.UU. n° de serie 09/441654 de Chan, presentada el 12 de noviembre 1999), comprendiendo las etapas de: insertar al menos un vector de expresión de proteína chaperona, que comprende un ADN que codifica proteína chaperona Erp57, en dicha primera línea celular CHO para formar una línea celular CHO modificada; y seleccionar a partir de dicha línea celular CHO modificada al menos una segunda célula que presenta un mayor rendimiento de la proteína bikunina recombinante.

35 En otra realización, el método para mejorar el rendimiento de bikunina recombinante en una línea celular CHO comprende introducir un material genético para tal bikunina en una línea celular CHO, en donde la línea celular CHO muestra una expresión mejorada de la proteína chaperona.

40 En otra realización más de la invención, se proporciona un método para mejorar la producción de proteína Factor VIII recombinante en una célula BHK, en donde un material genético que codifica para la expresión de dicho Factor VIII recombinante se ha introducido previamente en una primera línea celular BHK, que comprende las etapas de: insertar al menos un vector de expresión de proteína chaperona que comprende un ADN que codifica proteína chaperona Erp57 y un ADN que codifica proteína chaperona CRT en dicha primera línea celular BHK a fin de formar una línea celular BHK modificada; y seleccionar a partir de dicha línea celular BHK modificada al menos una segunda célula que presenta mayor rendimiento de la proteína Factor VIII recombinante.

45 En aún otra realización, el método para mejorar el rendimiento del Factor VIII recombinante en una línea celular BHK comprende introducir un material genético para tal Factor VIII en una línea celular BHK, en donde la línea celular BHK muestra una expresión mejorada de la proteína chaperona.

50 También se describe en esta memoria un método para mejorar la producción de una proteína IL2SA recombinante en una célula CHO, en donde un material genético que codifica para la expresión de dicha IL2SA recombinante se ha introducido previamente en una primera línea celular CHO, que comprende las etapas de: insertar al menos un vector de expresión de proteína chaperona en dicha primera línea celular CHO para formar una línea celular CHO modificada; y seleccionar a partir de dicha línea celular CHO modificada al menos una segunda célula que presenta mayor rendimiento de la proteína recombinante IL2SA.

En otra realización, el método para mejorar el rendimiento de IL2SA recombinante en una línea celular CHO comprende introducir un material genético para tal IL2SA en una línea celular CHO, en donde la línea celular CHO

muestra una expresión mejorada de la proteína chaperona.

Los siguientes ejemplos tienen únicamente fines de ilustración, y no se deben interpretar de ningún modo como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

5 Ejemplo 1 Clonación del ADNc de chaperona.

Todas las secuencias de chaperonas se clonaron a partir de genotecas de ADNc humano, seguido por la verificación de las secuencias de nucleótidos. Las secuencias de ADN que representaban las tres chaperonas del RE se clonaron mediante RT-PCR a partir de una genoteca de ADNc humano. Los cebadores de RT-PCR utilizados en estas reacciones se diseñaron para amplificar la región codificadora completa usando las secuencias apropiadas, obtenidas a partir de Genbank. Cada pareja de cebadores 5' y 3' incluye un sitio de restricción EcoRI (cebador 5') o XbaI (cebador 3') (Figura 1) para facilitar la clonación del producto de la PCR en el vector de expresión, pCI-neo (Promega).

Las reacciones de PCR se realizaron empleando enzima PFU de alta fidelidad (Stratagene). Las bandas del tamaño esperado se purificaron, se digirieron con EcoRI y XbaI y se clonaron en el vector pCI-neo digerido de manera similar. Los vectores recombinantes procedentes de esta etapa se propagaron en *E. coli* seguido por el aislamiento y la purificación de las secuencias del vector. Las inserciones de secuencias que representaban las chaperonas se secuenciaron usando cebadores que se unían justo fuera de los sitios de clonación múltiple del vector, así como dentro de la secuencia de la chaperona. La secuenciación se realizó utilizando el método de terminador Big Dye en un ciclador térmico de MJ Research y se analizó usando un analizador genético ABI 310. Las secuencias de ADNc de calnexina, calreticulina y Erp57 humana se muestran en las Figuras 2A-2C.

El fragmento de ADNc de longitud completa de Hsp70 humana se obtuvo por RT-PCR usando ARN poliA⁺ de cerebro humano (Clontech Cat: 6516-1) y dos cebadores denominados F-Hsp70 = 5' AGG GAA CCG CAT GGC CAA AG y R-Hsp70 = 5' GAA AGG CCCCTA ATC TAC CTC CTC A. Las secuencias de los cebadores de Hsp 70 se obtuvieron a partir de la secuencia publicada anteriormente para el gen de la proteína de choque térmico humana (Hsp70) [9]. Los cebadores F-Hsp70 y R-Hsp70 incluían o bien una secuencia de EcoRI o de XbaI, respectivamente. El fragmento de PCR deseado se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa y se confirmó por secuenciación de los nucleótidos. El fragmento de ADNc de Hsp70 humana de longitud completa se insertó a continuación en los sitios de clonación EcoRI y XbaI del vector pCI-neo, para formar el vector pCI-neo-Hsp70. El vector pCI-neo-Hsp70 se propagó en *E. coli* seguido de aislamiento y purificación de las secuencias del vector. El ADN del plásmido pCI-neo-Hsp70 se secuenció con un analizador genético ABI PRISM 310. La secuencia de Hsp70 humana se muestra en la Figura 2D.

Ejemplo 2. La producción de bikunina se incrementa en células CHO después de la transfección de una chaperona del RE tal como calnexina, calreticulina, Erp57 o Hsp70.

Una línea celular CHO que secretaba la proteína recombinante bikunina (documento de Solicitud de Patente de EE.UU. con n° de serie 09/441654) se supertransfectó con diversas combinaciones de chaperonas del RE, calnexina (CNX), calreticulina (CRT), Erp57 o Hsp70, seguido de selección con G418. Se obtuvieron poblaciones y se escrutaron mediante el ensayo de calicreína (documento de Solicitud de Patente de EE.UU. con n° de serie 09/441654). Brevemente, bikunina convencional o fluido del cultivo se diluyó en serie y se incubó con un volumen igual de calicreína a 37°C durante 30 minutos, después de lo cual se añadió un sustrato cromogénico, N-benzoyl-Pro-Phe-Arg-pNA. La reacción se incubó durante 15 minutos antes de la adición de ácido acético al 50%. La cantidad de p-nitroanilida liberada se midió a 405 nM. Las poblaciones que mostraban los títulos más altos de bikunina, se clonaron a continuación a partir de una sola célula y se cultivaron durante un período de varias semanas. Los clones que mostraban constantemente los títulos más elevados de bikunina (2-4 veces) con respecto a las células testigo CF9-20, se conservaron y se cultivaron en matraces de agitación para su posterior análisis. Estos clones se redujeron aún más basándose en títulos de bikunina y características del crecimiento, mostrados durante el crecimiento en el entorno de matraz de agitación. Los clones candidatos finales se seleccionaron después de varias rondas y análisis exhaustivos en la etapa de matraz de agitación.

La tasa de producción específica de bikunina para todas las líneas celulares se expresa como pg de bikunina/célula/día (SPR). Cada día las células se recogieron y se transfirieron a un medio de nuevo aporte y se incubaron durante 24 horas a 37°C en matraces de agitación. Al día siguiente, las células se recogieron de nuevo, se contaron y se resuspendieron en medio de nuevo aporte con el mismo volumen y se incubaron de forma similar durante otras 24 horas. Las mediciones de la actividad bikunina (pg/célula/día) se realizaron en muestras de medios agotados. El mismo procedimiento se repitió cada día hasta que el número de células y la viabilidad empezaron a disminuir.

El efecto de las proteínas chaperonas sobre la expresión de bikunina se muestra en las Figuras 3 y 4. La línea celular testigo (CF9-20) expresa bikunina pero no expresa ninguna de las proteínas chaperonas. El efecto de la calnexina, calreticulina y Erp57 sobre la expresión de bikunina se resume con más detalle en la Tabla 1.

Tabla 1. Los niveles de producción general de bikunina son 2-4 veces superiores en clones que se han supertransfectado con una chaperona

Clon	Incremento de bikunina en relación con el testigo	Chaperona
X4/14:5	2-4	CNX
X4/14:30	2-4	CNX
X4/19:62	2-4	Erp57
T4/13:22	1,5-2	CRT

Las mediciones de la actividad de plegamiento se realizan en relación con una línea celular testigo que expresa bikunina pero no expresa ninguna de las proteínas chaperonas. Las células se cultivaron en medio exento de suero en cultivos en matraz de agitación.

Ejemplo 3. La producción de Factor VIII recombinante se incrementa en células BHK después de la transfección con chaperonas RE.

Las células estables productoras de Factor VIII (MWCB1) (documento de Patente de EE.UU. nº 4.965.199; ATCC nº CRL 8544) se transfectaron con vectores de expresión de chaperonas además de pPUR, un vector que contenía el gen de resistencia a la puomicina, en una proporción de 10:1. Aproximadamente 4×10^6 células MWCB1 se transfectaron con un total de 5 µg de ADN utilizando el reactivo DMRIE-C y medio OPTI-MEM (Life Technology, MD) en placas de 6 pocillos. Tres días después de la transfección, se sembraron 100.000 células en placas de 6 pocillos y después se seleccionaron en presencia de 1 - 2 µg/ml de puomicina con medio OPTI-MEM que contenía FBS al 2%, durante 2 semanas. Las colonias resistentes a la puomicina se seleccionaron manualmente y se sembraron en placas de 96 pocillos y se cultivaron sin la presencia de fármaco. Las poblaciones de clones individuales se escrutaron en busca de producción de Factor VIII, utilizando un kit COATEST (Chromogenix, Italia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los clones con producción elevada se cultivaron de forma secuencial desde la placa con 6 pocillos, a un matraz T75, seguido de la etapa en matraz de agitación para las pruebas de estabilidad y productividad. Las chaperonas Calnexina (CNX), Calreticulina (CRT), Erp57, Hsp40 y Hsp70 se transfectaron a continuación en células, individualmente o de dos en dos. Se observó un aumento significativo de 2 a 3 veces en la productividad de Factor VIII en los clones transfectados con CNX, CRT y Erp57, Hsp70 y Hsp40, mientras que el testigo con vector vacío (PCI-Neo) no mostró ninguna diferencia en comparación con las células progenitoras MWCB1 (Tabla 2).

Tabla 2. Productividad del Factor VIII recombinante en clones

	Factor VIII (U/ml)	Plegamiento de Inc (SPR)
MWCB1 (27000JC)	0,11	1,00
PCI-Neo + pPUR	0,09	1,00
CNX + pPUR	0,31	2,88
CRT + pPUR	0,13	1,25
Erp57 + pPUR	0,05	0,91
CRT, Erp57 + pPUR	0,29	2,50
Hsp70 + pPUR	0,37	2,50
Hsp40 + pPUR	0,11	1,00
Hsp70, 40 + pPUR	0,28	1,66

Las células se sembraron a 1×10^6 por ml, en un total de 15 ml en matraz de agitación, durante 2 días

Ejemplo 4. La coexpresión de BiP y PDI no aumenta la expresión del Factor VIII y anticuerpo anti-TNF en células BHK y CHO.

Las células CHO recombinantes (tal y como se han descrito en el Ejemplo 2) que expresaban niveles elevados de bikunina, y las células BHK recombinantes (tal y como se han descrito en el Ejemplo 3) que expresaban niveles elevados de Factor VIII recombinante (rFVIII) se supertransfectaron con pHyg (plásmido que confiere resistencia a la higromicina) y pBiP. Las condiciones de la transfección y las condiciones de la selección fueron las mismas que en el Ejemplo 2. Después de una selección en higromicina y clonación por dilución limitante, los clones se evaluaron para estudiar la productividad de bikunina y la actividad de rFVIII. No se observó una diferencia significativa en la productividad específica de los clones obtenidos a partir de células transfectadas solo con el vector testigo (pHyg) y

de los clones obtenidos a partir de células transfectadas con pBiP.

Ejemplo 5. Transfección de un clon que produce IL2SA con sintetasa de glutamina (GS) y Hsp70.

La línea celular CHO que produce IL2SA (agonista selectivo de IL2; documento de Patente de EE.UU. n° 6.348.192), 49-19-H42 (una variante clónica del depósito de ATCC PTA-8), se cotransfectó con PCI-GS y PCI-neo-Hsp70. Se transfectaron 4×10^6 células con 2,5 µg de ADN plasmídico utilizando reactivos DMRIE-C y medio OPTI-MEM (Life Technology, MD) en placas de 6 pocillos, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tres días después de la transfección, las células se sembraron en placas de 150 mm y 96 pocillos y luego se seleccionaron en presencia de MSX 10 µM (metionina sulfoximina) y 250 µg/ml de G418 con medio DME:F12 (1:1) carente de glutamina que contenía 2% de FBS dializado, durante 2 semanas. Las colonias de células individuales se recogieron y se sembraron de nuevo en placas de 96 pocillos. Los clones se seleccionaron durante otra semana con aumento de las concentraciones de MSX (20 µM) y G418 (400 µg/ml). Se generó un grupo a partir de una placa de 150 mm después de la selección durante 3 semanas. El grupo y los clones se cultivaron pasándolos gradualmente a matraces de agitación y se examinaron para estudiar la productividad de IL2 utilizando ELISA. La expresión de las proteínas GS y Hsp70 se confirmó mediante análisis FACS usando un citómetro de flujo. Las células "positivas para GS" se cultivaron en un medio exento de glutamina complementado con glutamato 5,6 mM y 4 g/L de glucosa. El tiempo de duplicación de estos clones variaba de 24 a 48 h. Una comparación de la productividad del progenitor y los clones se muestra en la Tabla 3. Se observó un incremento de 2-4 veces en el título total y un incremento de 2-3 veces en la productividad específica en todos los clones de células individuales cuando se compararon con el grupo o la línea progenitora.

Tabla 3. Productividad de células productoras de IL2SA

	Título (µg/ml)	Densidad celular (10^6 /ml)	SPR (pg/c/d)	GS	Hsp70
Línea progenitora 49-19H42	18,78	3,51	2,67	(-)	(-)
49-19H42 GShsp70-SC n° 12	33,87	2,63	6,44	+++	+++
49-19H42 GShsp70-SC n° 14	22,08	1,83	6,03	+++	+++
49-19H42 GShsp70-SC n° 17	64,00	3,05	10,50	+++	+++
49-19H42 GShsp70-grupo	10,59	1,74	3,04	+++	+

Las células se sembraron a 1 millón por ml el día 0 en 15 ml de medio completo (para la línea progenitora) o medio exento de glutamina. Se tomaron muestras 2 días después de la siembra y se analizaron mediante ELISA. Para la expresión de GS y de Hsp70, las células se fijaron con 70% de EtOH, se marcaron con los anticuerpos apropiados y se analizaron por FACS.

+++ = todas las células expresaron GS o Hsp70; + = 30% de las células expresó GS o Hsp70; (-) = sin expresión.

Referencias

(1) Wunderlich, M.; Glockshuber, R. In vivo control of redox potential during protein folding catalyzed by bacterial protein disulfide-isomerase (DsbA). *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 24547-24550.

(2) Glockshuber, R.; Wunderlich, M.; Skerra, A.; Rudolph, R. Increasing the yield of disulfide-bridged heterologous proteins secreted from transgenic microorganisms. *Eur. Pat. No. 92-106978 920423* 1995.

(3) Tuite, M. F.; Freedman, R. B.; Schultz, L. D.; Ellis, R. W.; Markus, H. Z.; Montgomery, D. L. Method for increasing production of disulfide bonded recombinant proteins by *saccharomyces cerevisiae*. *Aust. Pat. No. AU679448B2* 1997.

(4) Ostermeier, M.; De Sutter, K.; Georgiou, G. Eukaryotic protein disulfide isomerase complements *Escherichia coli* dsbA mutants and increases the yield of a heterologous secreted protein with disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 10616-10622.

(5) Shusta, E. V.; Raines, R. T.; Pluckthun, A.; Wittrup, K. D. Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragments. *Nat. Bio-technol.* 1998, 16, 773-777.

(6) Robinson, A. S.; Hines, V.; Wittrup, K. D. Protein disulfide isomerase overexpression increases secretion of foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology (N. Y.)* 1994, 12, 381-384.

(7) Dunn, A.; Luz, J. M.; Natalia, D.; Gamble, J. A.; Freedman, R. B.; Tuite, M. F. Protein disulphide isomerase (PDI) is required for the secretion of a native disulphide-bonded protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Soc. Trans.* 1995, 23, 78S.

(8) Hsu, T. A.; Watson, S.; Eiden, J. J.; Betenbaugh, M. J. Rescue of immunoglobulins from insolubility is facilitated by PDI in the baculovirus expression system. *Protein Expr. Purif.* 1996, 7, 281-288.

(9) Hsu, T. A.; Betenbaugh, M. J. Co-expression of molecular chaperone BiP improves immunoglobulin solubility and IgG secretion from *Trichoplusia* in insect cells. *Biotechnol. Prog.* 1997, 13, 96-104.

(10) Hsu, T. A.; Eiden, J. J.; Bourgarel, P.; Meo, T.; Betenbaugh, M. J. Effects of coexpressing chaperone BiP on functional antibody production in the baculovirus system. *Protein Expr. Purif.* 1994, 5, 595-603.

(11) Ailor, E.; Betenbaugh, M. J. Overexpression of a cytosolic chaperone to improve solubility and secretion of a recombinant IgG protein in insect cells. *Biotechnol. Bioeng.* 1998, 58, 196-203.

(12) Ailor, E.; Betenbaugh, M. J. Modifying secretion and post-translational processing in insect cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999, 10, 142-145.

(13) Davis, R.; Schooley, K.; Rasmussen, B.; Thomas, J.; Reddy, P. Effect of PDI Overexpression on Recombinant Protein Secretion in CHO Cells. *Biotechnol. Prog.* 2000, 16, 736-743.

(14) Dorner, A. J.; Wasley, L. C.; Raney, P.; Haugejorden, S.; Green, M.; Kaufman, R. J. The stress response in Chinese hamster ovary cells. Regulation of ERp72 and protein disulfide isomerase expression and secretion. *J. Biol. Chem.* 1990, 265, 22029-22034.

(15) Dorner, A. J.; Wasley, L. C.; Kaufman, R. J. Overexpression of GRP78 mitigates stress induction of glucose regulated proteins and blocks secretion of selective proteins in Chinese hamster ovary cells. *EMBO J.* 1992, 11, 1563-1571.

(16) *Current Protocols in Molecular Biology*, 2003, John Wiley & Sons, Inc.

En la presente memoria también se describe lo siguiente:

1. Una célula hospedadora de mamífero para mejorar la expresión de un producto proteico recombinante, teniendo dicha célula de mamífero un material genético que codifica para la expresión de dicho producto proteico recombinante y se transforma con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona seleccionada del grupo que consiste en calnexina, calreticulina, Erp57, Hsp40 y Hsp70.
2. La célula hospedadora de mamífero según la realización 1, en la que el producto proteico recombinante es secretado.
3. La célula hospedadora de mamífero según la realización 2, en la que el material genético que codifica para la expresión de dicho producto proteico recombinante está integrado en el ADN de la célula hospedadora.
4. La célula hospedadora de mamífero según la realización 3, transformada adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.
5. La célula hospedadora de mamífero según la realización 2, en donde el producto proteico recombinante es bikunina o un fragmento de la misma.
6. La célula hospedadora de mamífero según la realización 5, en donde la transformación tiene lugar con un vector de expresión que comprende ADN que codifica calnexina.
7. La célula hospedadora de mamífero según la realización 5, en donde la transformación tiene lugar con un vector de expresión que comprende ADN que codifica Erp57.
8. La célula hospedadora de mamífero según la realización 5, en donde la transformación tiene lugar con un vector de expresión que comprende ADN que codifica calreticulina.
9. La célula hospedadora de mamífero según la realización 5, en donde la transformación tiene lugar con un vector de expresión que comprende ADN que codifica Hsp70.
10. La célula hospedadora de mamífero según la realización 2, en donde el producto proteico recombinante es Factor VIII o un fragmento del mismo.
11. La célula hospedadora de mamífero según la realización 10, en donde dicha transformación tiene lugar con un primer vector de expresión que comprende ADN que codifica calreticulina y un segundo vector de expresión que comprende ADN que codifica Erp57.
12. La célula hospedadora de mamífero según la realización 10, en donde dicha transformación tiene lugar con un vector de expresión que comprende ADN que codifica calnexina.
13. La célula hospedadora de mamífero según la realización 10, en donde dicha transformación tiene lugar con un vector de expresión que comprende ADN que codifica Hsp70.
14. La célula hospedadora de mamífero según la realización 2, en donde el producto proteico recombinante es IL2SA o un fragmento de la misma.
15. La célula hospedadora de mamífero según la realización 14, en donde dicha transformación tiene lugar con un vector de expresión que comprende ADN que codifica Hsp70.
16. Una célula hospedadora de mamífero para mejorar la expresión de bikunina o de un fragmento de la misma, en donde dicha célula de mamífero tiene un material genético que codifica para la expresión de bikunina o de un fragmento de la misma y se transforma con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona seleccionada entre el grupo que consiste en calnexina, calreticulina, Erp57, Hsp40 y Hsp70.
17. La célula hospedadora de mamífero según la realización 16, en donde el material genético que codifica para la expresión de bikunina o de un fragmento de la misma está integrado en el ADN de la célula hospedadora.
18. La célula hospedadora de mamífero según la realización 16, que se transforma además con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.
19. Una célula hospedadora de mamífero para mejorar la expresión del Factor VIII o de un fragmento del mismo, en donde dicha célula de mamífero tiene un material genético que codifica para la expresión del Factor VIII o de un fragmento del mismo y se transforma con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona seleccionada a partir del grupo que consiste en calnexina, calreticulina, Erp57, Hsp40 y Hsp70.
20. La célula hospedadora de mamífero según la realización 19, en donde el material genético que codifica para la expresión del Factor VIII o de un fragmento del mismo está integrado en el ADN de la célula hospedadora.
21. La célula hospedadora de mamífero según la realización 20, transformada además con un vector de expresión

que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.

22. Una célula hospedadora de mamífero para la expresión mejorada de IL2SA o de un fragmento de la misma, en donde dicha célula de mamífero tiene un material genético que codifica para la expresión de IL2SA o de un fragmento de la misma y se transforma con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona seleccionada entre el grupo que consiste en calnexina, calreticulina, Erp57, Hsp40 y Hsp70.
23. La célula hospedadora de mamífero según la realización 22, en donde el material genético que codifica para la expresión de IL2SA o de un fragmento de la misma está integrado en el ADN de la célula hospedadora.
24. La célula hospedadora de mamífero según la realización 23, que se transforma además con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.
25. Un método para producir una célula hospedadora de mamífero para mejorar la expresión de una proteína recombinante diana o un fragmento de la misma que comprende proporcionar una célula de mamífero que tiene material genético que codifica para la expresión de una proteína recombinante diana o de un fragmento de la misma; y transformar la célula de mamífero con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona seleccionada entre el grupo que consiste en calnexina, calreticulina, Erp57, Hsp40 y Hsp70.
26. El método según la realización 25, en el que el producto proteico recombinante se secreta.
27. El método según la realización 26, en el que el material genético que codifica para la expresión de dicho producto proteico recombinante se integra en el ADN de la célula hospedadora.
28. El método según la realización 28, que se transforma además con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.
29. El método según la realización 26, en el que el producto proteico recombinante es bikunina o un fragmento de la misma.
30. El método 1 según la realización 29, en el que la transformación se produce con un vector de expresión que comprende ADN que codifica calnexina.
31. El método según la realización 29, en el que la transformación se produce con un vector de expresión que comprende ADN que codifica Erp57.
32. El método según la realización 29, en el que se produce la transformación con un vector de expresión que comprende ADN que codifica calreticulina.
33. El método según la realización 29, en el que se produce la transformación con un vector de expresión que comprende ADN que codifica Hsp70.
34. El método según la realización 26, en el que el producto proteico recombinante es el Factor VIII o un fragmento del mismo.
35. El método según la realización 34, en el que dicha transformación se produce con un primer vector de expresión que comprende ADN que codifica calreticulina y un segundo vector de expresión que comprende ADN que codifica Erp57.
36. El método según la realización 34, en el que dicha transformación se produce con un vector de expresión que comprende ADN que codifica calnexina.
37. El método según la realización 34, en el que dicha transformación se produce con un vector de expresión que comprende ADN que codifica Hsp70.
38. El método según la realización 26, en el que el producto proteico recombinante es IL2SA o un fragmento de la misma.
39. El método según la realización 38, en el que dicha transformación se produce con un vector de expresión que comprende ADN que codifica Hsp70.
40. Un método para producir un producto proteico recombinante secretado que comprende las etapas de:
 - cultivar una célula hospedadora de mamífero, en donde dicha célula hospedadora de mamífero tiene un material genético que codifica para la expresión de dicho producto proteico recombinante y se transforma con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona seleccionada entre el grupo que consiste en calnexina, calreticulina, Erp57, Hsp40 y Hsp70; y

recuperar a partir del medio de cultivo el producto proteico recombinante producido y secretado de este modo.

41. El método según la realización 40, en el que el material genético que codifica para la expresión de dicho producto proteico recombinante se integra en el ADN de la célula hospedadora.

5 42. El método según la realización 41, en el que dicha célula hospedadora de mamífero se transforma además con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.

43. Un método para producir una proteína bikunina o un fragmento de la misma que comprende cultivar la célula hospedadora de mamífero según la realización 5 y recuperar a partir del medio de cultivo la proteína bikunina o un fragmento de la misma producido y secretado de este modo.

10 44. El método según la realización 43, en el que dicha célula hospedadora de mamífero se transforma además con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.

45. Un método para producir una proteína del Factor VIII o un fragmento de la misma que comprende cultivar la célula hospedadora de mamífero según la realización 10 y recuperar a partir del medio de cultivo la proteína del Factor VIII o un fragmento de la misma producido y secretado de este modo.

15 46. El método según la realización 45, en el que dicha célula hospedadora de mamífero se transforma además con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.

47. Un método para producir una proteína IL2SA o un fragmento de la misma que comprende cultivar la célula hospedadora de mamífero según la realización 14 y recuperar a partir del medio de cultivo la proteína IL2SA o un fragmento de la misma producido y secretado de este modo.

20 48. El método según la realización 47, en el que dicha célula hospedadora de mamífero se transforma además con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.

49. Un método para mejorar el rendimiento de proteína recombinante bikunina en una línea celular CHO, en el que un material genético que codifica para la expresión de dicha bikunina recombinante se ha introducido previamente en una primera línea celular CHO, comprendiendo dicho método las etapas de:

25 insertar al menos un vector de expresión de la proteína chaperona en dicha primera línea celular CHO a fin de formar una línea celular CHO modificada; y

seleccionar a partir de dicha línea celular CHO modificada al menos una segunda línea celular que muestra un rendimiento mejorado de la proteína bikunina recombinante.

50. El método según la realización 49, en el que el material genético que codifica para la expresión de dicha bikunina recombinante se integra en el ADN de la primera célula CHO.

30 51. El método según la realización 50, en el que la segunda línea celular se transforma además con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.

52. El método según la realización 49, en el que se produce al menos una segunda línea celular a partir de dicha primera línea celular mediante la selección de una porción de dicha primera línea celular que presenta la integración del vector de expresión de la proteína chaperona en el ADN del hospedador.

35 53. El método según la realización 49, en donde dicho vector de expresión de la proteína chaperona comprende ADN que codifica una proteína chaperona seleccionada entre el grupo que consiste en calnexina, calreticulina, Erp57, Hsp40 y Hsp70.

54. El método según la realización 49, en el que dicha selección se produce en presencia de G418.

40 55. Un método para mejorar el rendimiento del Factor VIII recombinante en una línea celular de riñón de cría de hámster (BHK), en el que un material genético que codifica para la expresión de dicho Factor VIII recombinante se ha introducido previamente en una primera línea celular BHK, comprendiendo dicho método las etapas de:

insertar al menos un vector de expresión de la proteína chaperona en dicha primera línea celular BHK a fin de formar una línea celular BHK modificada; y

45 seleccionar a partir de dicha línea celular BHK modificada al menos una segunda línea celular que muestra un rendimiento mejorado del producto del Factor VIII recombinante.

56. El método según la realización 55, en el que el material genético que codifica para la expresión de dicho Factor VIII recombinante se integra en el ADN de la primera célula BHK.

57. El método según la realización 55, en el que la segunda línea celular se transforma además con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.

58. El método según la realización 55, en el que se produce al menos una segunda línea celular a partir de dicha primera línea celular mediante la selección de una porción de dicha primera línea celular que presenta la integración del vector de expresión de la proteína chaperona en el ADN del hospedador.
59. El método según la realización 55, en donde dicho vector de expresión de la proteína chaperona comprende ADN que codifica una proteína chaperona seleccionada a partir del grupo que consiste en calnexina, calreticulina, Erp57, Hsp40 o Hsp70.
60. El método según la realización 55, en el que dicha célula BHK se transfecta adicionalmente con un vector que incluye un gen de resistencia a la puromicina.
61. El método según la realización 55, en el que la selección se produce en presencia de puromicina.
62. Un método para mejorar el rendimiento de la proteína IL2SA recombinante en una línea celular CHO, en el que el material genético que codifica para la expresión de dicha IL2SA recombinante se ha introducido previamente en una primera línea celular CHO, comprendiendo dicho método las etapas de:
- insertar al menos un vector de expresión de la proteína chaperona en dicha primera línea celular CHO a fin de formar una línea celular CHO modificada; y
- seleccionar a partir de dicha línea celular CHO modificada al menos una segunda línea celular que muestra un rendimiento mejorado de la proteína IL2SA recombinante.
63. El método según la realización 62, en el que el material genético que codifica para la expresión de dicha IL2SA recombinante está integrado en el ADN de la primera célula CHO.
64. El método según la realización 63, en el que la segunda línea celular se transforma además con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.
65. El método según la realización 62, en donde dicho vector de expresión de la proteína chaperona comprende ADN que codifica una proteína chaperona seleccionada entre el grupo que consiste en calnexina, calreticulina, Erp57, Hsp40 y Hsp70.
66. Un método para mejorar el rendimiento de una bikunina recombinante o de un fragmento en una línea celular CHO que comprende introducir material genético que codifica bikunina o un fragmento de la misma en una línea celular CHO que muestra una expresión mejorada de la proteína chaperona.
67. El método según la realización 66, en el que la línea celular CHO se transforma además con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.
68. Un método para mejorar el rendimiento de un Factor VIII recombinante o de un fragmento del mismo en una línea celular BHK que comprende introducir material genético que codifica tal Factor VIII o un fragmento del mismo en una línea celular BHK que muestra una expresión mejorada de la proteína chaperona.
69. El método según la realización 68, en el que la línea celular BHK se transforma además con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.
70. Un método para mejorar el rendimiento de una IL2SA recombinante o de un fragmento de la misma en una línea celular CHO que comprende introducir material genético que codifica tal IL2SA en una línea celular CHO que muestra una expresión mejorada de la proteína chaperona.
71. El método según la realización 70, en el que la línea celular CHO se transforma además con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Chan, Sham-Yuen Tang, Hsinyi Y Tao, Yiwen Wu, Yongjian Kelly, Ruth	
5	<120> Uso de chaperonas moleculares para aumentar la producción de proteínas recombinantes secretadas en células de mamífero	
	<130> 03-302-A	
10	<140> 10/792,571 <141> 04-03-2004	
	<150> 60/483,505 <151> 27-06-2003	
15	<160> 22	
	<170> PatentIn versión 3.3	
20	<210> 1 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> oligonucleótido sintético	
	<400> 1 atgaattccg ggaggctaga gatcatgg	28
30	<210> 2 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> oligonucleótido sintético	
40	<400> 2 attctagatg caggggagga gggagaag	28
45	<210> 3 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> oligonucleótido sintético	
	<400> 3 atgaattccc gccatgctgc tatccgtg	28
55	<210> 4 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
60	<220> <223> oligonucleótido sintético	
	<400> 4 attctagact ggaggcaggc ctctctac	28
	<210> 5 <211> 28	

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 5
 atgaattcct ccgcagctccc agccgagc 28

 10 <210> 6
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 6
 attctagact ctgcggccctg agaggtaa 28

 20 <210> 7
 <211> 1856
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 25 <220>
 <221> CDS
 <222> (23)..(1801)

 30 <400> 7
 gaattccggg aggctagaga tc atg gaa ggg aag tgg ttg ctg tgt atg tta 52
 Met Glu Gly Lys Trp Leu Leu Cys Met Leu
 1 5 10

 ctg gtg ctt gga act gct att gtt gag gct cat gat gga cat gat gat 100
 Leu Val Leu Gly Thr Ala Ile Val Glu Ala His Asp Gly His Asp Asp

ES 2 538 794 T3

15					20					25						
gat	gtg	att	gat	att	gag	gat	gac	ctt	gac	gat	gtc	att	gaa	gag	gta	148
Asp	Val	Ile	Asp	Ile	Glu	Asp	Asp	Leu	Asp	Asp	Val	Ile	Glu	Glu	Val	
30					35					40						
gaa	gac	tca	aaa	cca	gat	acc	act	gct	cct	cct	tca	tct	ccc	aag	gtt	196
Glu	Asp	Ser	Lys	Pro	Asp	Thr	Thr	Ala	Pro	Pro	Ser	Ser	Pro	Lys	Val	
45					50					55						
act	tac	aaa	gct	cca	gtt	cca	aca	ggg	gaa	gta	tat	ttt	gct	gat	tct	244
Thr	Tyr	Lys	Ala	Pro	Val	Pro	Thr	Gly	Glu	Val	Tyr	Phe	Ala	Asp	Ser	
60					65					70						
ttt	gac	aga	gga	act	ctg	tca	ggg	tgg	att	tta	tcc	aaa	gcc	aag	aaa	292
Phe	Asp	Arg	Gly	Thr	Leu	Ser	Gly	Trp	Ile	Leu	Ser	Lys	Ala	Lys	Lys	
75	80					85					90					
gac	gat	acc	gat	gat	gaa	att	gcc	aaa	tat	gat	gga	aag	tgg	gag	gta	340
Asp	Asp	Thr	Asp	Asp	Glu	Ile	Ala	Lys	Tyr	Asp	Gly	Lys	Trp	Glu	Val	
95					100					105						
gag	gaa	atg	aag	gag	tca	aag	ctt	cca	ggt	gat	aaa	gga	ctt	gtg	ttg	388
Glu	Glu	Met	Lys	Glu	Ser	Lys	Leu	Pro	Gly	Asp	Lys	Gly	Leu	Val	Leu	
110					115					120						
atg	tct	cgg	gcc	aag	cat	cat	gcc	atc	tct	gct	aaa	ctg	aac	aag	ccc	436
Met	Ser	Arg	Ala	Lys	His	His	Ala	Ile	Ser	Ala	Lys	Leu	Asn	Lys	Pro	
125					130					135						
ttc	ctg	ttt	gac	acc	aag	cct	ctc	att	gtt	cag	tat	gag	gtt	aat	ttc	484
Phe	Leu	Phe	Asp	Thr	Lys	Pro	Leu	Ile	Val	Gln	Tyr	Glu	Val	Asn	Phe	
140					145					150						
caa	aat	gga	ata	gaa	tgt	ggt	ggt	gcc	tat	gtg	aaa	ctg	ctt	tct	aaa	532
Gln	Asn	Gly	Ile	Glu	Cys	Gly	Gly	Ala	Tyr	Val	Lys	Leu	Leu	Ser	Lys	
155	160					165					170					
aca	cca	gaa	ctc	aac	ctg	gat	cag	ttc	cat	gac	aag	acc	cct	tat	acg	580
Thr	Pro	Glu	Leu	Asn	Leu	Asp	Gln	Phe	His	Asp	Lys	Thr	Pro	Tyr	Thr	
175					180					185						
att	atg	ttt	ggt	cca	gat	aaa	tgt	gga	gag	gac	tat	aaa	ctg	cac	ttc	628
Ile	Met	Phe	Gly	Pro	Asp	Lys	Cys	Gly	Glu	Asp	Tyr	Lys	Leu	His	Phe	
190					195					200						
atc	ttc	cga	cac	aaa	aac	ccc	aaa	acg	ggt	atc	tat	gaa	gaa	aaa	cat	676
Ile	Phe	Arg	His	Lys	Asn	Pro	Lys	Thr	Gly	Ile	Tyr	Glu	Glu	Lys	His	
205					210					215						
gct	aag	agg	cca	gat	gca	gat	ctg	aag	acc	tat	ttt	act	gat	aag	aaa	724
Ala	Lys	Arg	Pro	Asp	Ala	Asp	Leu	Lys	Thr	Tyr	Phe	Thr	Asp	Lys	Lys	
220					225					230						
aca	cat	ctt	tac	aca	cta	atc	ttg	aat	cca	gat	aat	agt	ttt	gaa	ata	772
Thr	His	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ile	Leu	Asn	Pro	Asp	Asn	Ser	Phe	Glu	Ile	

ES 2 538 794 T3

235	240	245	250	
ctg gtt gac caa tct gtg gtg aat agt gga aat ctg ctc aat gac atg				820
Leu Val Asp Gln Ser Val Val Asn Ser Gly Asn Leu Leu Asn Asp Met				
	255	260	265	
act cct cct gta aat cct tca cgt gaa att gag gac cca gaa gac cgg				868
Thr Pro Pro Val Asn Pro Ser Arg Glu Ile Glu Asp Pro Glu Asp Arg				
	270	275	280	
aag ccc gag gat tgg gat gaa aga cca aaa atc cca gat cca gaa gct				916
Lys Pro Glu Asp Trp Asp Glu Arg Pro Lys Ile Pro Asp Pro Glu Ala				
	285	290	295	
gtc aag cca gat gac tgg gat gaa gat gcc cct gct aag att cca gat				964
Val Lys Pro Asp Asp Trp Asp Glu Asp Ala Pro Ala Lys Ile Pro Asp				
	300	305	310	
gaa gag gcc aca aaa ccc gaa ggc tgg tta gat gat gag cct gag tac				1012
Glu Glu Ala Thr Lys Pro Glu Gly Trp Leu Asp Asp Glu Pro Glu Tyr				
	315	320	325	330
gta cct gat cca gac gca gag aaa cct gag gat tgg gat gaa gac atg				1060
Val Pro Asp Pro Asp Ala Glu Lys Pro Glu Asp Trp Asp Glu Asp Met				
	335	340	345	
gat gga gaa tgg gag gct cct cag att gcc aac cct aga tgt gag tca				1108
Asp Gly Glu Trp Glu Ala Pro Gln Ile Ala Asn Pro Arg Cys Glu Ser				
	350	355	360	
gct cct gga tgt ggt gtc tgg cag cga cct gtg att gac aac ccc aat				1156
Ala Pro Gly Cys Gly Val Trp Gln Arg Pro Val Ile Asp Asn Pro Asn				
	365	370	375	
tat aaa ggc aaa tgg aag cct cct atg att gac aat ccc agt tac cag				1204
Tyr Lys Gly Lys Trp Lys Pro Pro Met Ile Asp Asn Pro Ser Tyr Gln				
	380	385	390	
gga atc tgg aaa ccc agg aaa ata cca aat cca gat ttc ttt gaa gat				1252
Gly Ile Trp Lys Pro Arg Lys Ile Pro Asn Pro Asp Phe Phe Glu Asp				
	395	400	405	410
ctg gaa cct ttc aga atg act cct ttt agt gct att ggt ttg gag ctg				1300
Leu Glu Pro Phe Arg Met Thr Pro Phe Ser Ala Ile Gly Leu Glu Leu				
	415	420	425	
tgg tcc atg acc tct gac att ttt ttt gac aac ttt atc att tgt gct				1348
Trp Ser Met Thr Ser Asp Ile Phe Phe Asp Asn Phe Ile Ile Cys Ala				
	430	435	440	
gat cga aga ata gtt gat gat tgg gcc aat gat gga tgg ggc ctg aag				1396
Asp Arg Arg Ile Val Asp Asp Trp Ala Asn Asp Gly Trp Gly Leu Lys				
	445	450	455	
aaa gct gct gat ggg gct gct gag cca ggc gtt gtg ggg cag atg atc				1444
Lys Ala Ala Asp Gly Ala Ala Glu Pro Gly Val Val Gly Gln Met Ile				

ES 2 538 794 T3

460	465	470	
gag gca gct gaa gag cgc ccg tgg ctg tgg gta gtc tat att cta act			1492
Glu Ala Ala Glu Glu Arg Pro Trp Leu Trp Val Val Tyr Ile Leu Thr			
475	480	485	490
gta gcc ctt cct gtg ttc ctg gtt atc ctc ttc tgc tgt tct gga aag			1540
Val Ala Leu Pro Val Phe Leu Val Ile Leu Phe Cys Cys Ser Gly Lys			
	495	500	505
aaa cag acc agt ggt atg gag tat aag aaa act gat gca cct caa ccg			1588
Lys Gln Thr Ser Gly Met Glu Tyr Lys Lys Thr Asp Ala Pro Gln Pro			
	510	515	520
gat gtg aag gaa gag gaa gaa gag aag gaa gag gaa aag gac aag gga			1636
Asp Val Lys Glu Glu Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Lys Asp Lys Gly			
	525	530	535
gat gag gag gag gaa gga gaa gag aaa ctt gaa gag aaa cag aaa agt			1684
Asp Glu Glu Glu Glu Gly Glu Glu Lys Leu Glu Glu Lys Gln Lys Ser			
	540	545	550
gat gct gaa gaa gat ggt ggc act gtc agt caa gag gag gaa gac aga			1732
Asp Ala Glu Glu Asp Gly Gly Thr Val Ser Gln Glu Glu Glu Asp Arg			
	555	560	565
aaa cct aaa gca gag gag gat gaa att ttg aac aga tca cca aga aac			1780
Lys Pro Lys Ala Glu Glu Asp Glu Ile Leu Asn Arg Ser Pro Arg Asn			
	575	580	585
aga aag cca cga aga gag tga aacaatctta agagcttgat ctgtgatttc			1831
Arg Lys Pro Arg Arg Glu			
	590		
ttctccctcc tcccctgcat ctaga			1856
<210> 8			
<211> 592			
5	<212> PRT		
<213> Homo sapiens			
<400> 8			
Met Glu Gly Lys Trp Leu Leu Cys Met Leu Leu Val Leu Gly Thr Ala			
1	5	10	15
Ile Val Glu Ala His Asp Gly His Asp Asp Asp Val Ile Asp Ile Glu			
	20	25	30
Asp Asp Leu Asp Asp Val Ile Glu Glu Val Glu Asp Ser Lys Pro Asp			
	35	40	45

ES 2 538 794 T3

Thr Thr Ala Pro Pro Ser Ser Pro Lys Val Thr Tyr Lys Ala Pro Val
50 55 60

Pro Thr Gly Glu Val Tyr Phe Ala Asp Ser Phe Asp Arg Gly Thr Leu
65 70 75 80

Ser Gly Trp Ile Leu Ser Lys Ala Lys Lys Asp Asp Thr Asp Asp Glu
85 90 95

Ile Ala Lys Tyr Asp Gly Lys Trp Glu Val Glu Glu Met Lys Glu Ser
100 105 110

Lys Leu Pro Gly Asp Lys Gly Leu Val Leu Met Ser Arg Ala Lys His
115 120 125

His Ala Ile Ser Ala Lys Leu Asn Lys Pro Phe Leu Phe Asp Thr Lys
130 135 140

Pro Leu Ile Val Gln Tyr Glu Val Asn Phe Gln Asn Gly Ile Glu Cys
145 150 155 160

Gly Gly Ala Tyr Val Lys Leu Leu Ser Lys Thr Pro Glu Leu Asn Leu
165 170 175

Asp Gln Phe His Asp Lys Thr Pro Tyr Thr Ile Met Phe Gly Pro Asp
180 185 190

Lys Cys Gly Glu Asp Tyr Lys Leu His Phe Ile Phe Arg His Lys Asn
195 200 205

Pro Lys Thr Gly Ile Tyr Glu Glu Lys His Ala Lys Arg Pro Asp Ala
210 215 220

Asp Leu Lys Thr Tyr Phe Thr Asp Lys Lys Thr His Leu Tyr Thr Leu
225 230 235 240

Ile Leu Asn Pro Asp Asn Ser Phe Glu Ile Leu Val Asp Gln Ser Val
245 250 255

Val Asn Ser Gly Asn Leu Leu Asn Asp Met Thr Pro Pro Val Asn Pro
260 265 270

ES 2 538 794 T3

Ser Arg Glu Ile Glu Asp Pro Glu Asp Arg Lys Pro Glu Asp Trp Asp
275 280 285

Glu Arg Pro Lys Ile Pro Asp Pro Glu Ala Val Lys Pro Asp Asp Trp
290 295 300

Asp Glu Asp Ala Pro Ala Lys Ile Pro Asp Glu Glu Ala Thr Lys Pro
305 310 315 320

Glu Gly Trp Leu Asp Asp Glu Pro Glu Tyr Val Pro Asp Pro Asp Ala
325 330 335

Glu Lys Pro Glu Asp Trp Asp Glu Asp Met Asp Gly Glu Trp Glu Ala
340 345 350

Pro Gln Ile Ala Asn Pro Arg Cys Glu Ser Ala Pro Gly Cys Gly Val
355 360 365

Trp Gln Arg Pro Val Ile Asp Asn Pro Asn Tyr Lys Gly Lys Trp Lys
370 375 380

Pro Pro Met Ile Asp Asn Pro Ser Tyr Gln Gly Ile Trp Lys Pro Arg
385 390 395 400

Lys Ile Pro Asn Pro Asp Phe Phe Glu Asp Leu Glu Pro Phe Arg Met
405 410 415

Thr Pro Phe Ser Ala Ile Gly Leu Glu Leu Trp Ser Met Thr Ser Asp
420 425 430

Ile Phe Phe Asp Asn Phe Ile Ile Cys Ala Asp Arg Arg Ile Val Asp
435 440 445

Asp Trp Ala Asn Asp Gly Trp Gly Leu Lys Lys Ala Ala Asp Gly Ala
450 455 460

Ala Glu Pro Gly Val Val Gly Gln Met Ile Glu Ala Ala Glu Glu Arg
465 470 475 480

Pro Trp Leu Trp Val Val Tyr Ile Leu Thr Val Ala Leu Pro Val Phe
485 490 495

ES 2 538 794 T3

Leu Val Ile Leu Phe Cys Cys Ser Gly Lys Lys Gln Thr Ser Gly Met
500 505 510

Glu Tyr Lys Lys Thr Asp Ala Pro Gln Pro Asp Val Lys Glu Glu Glu
515 520 525

Glu Glu Lys Glu Glu Glu Lys Asp Lys Gly Asp Glu Glu Glu Glu Gly
530 535 540

Glu Glu Lys Leu Glu Glu Lys Gln Lys Ser Asp Ala Glu Glu Asp Gly
545 550 555 560

Gly Thr Val Ser Gln Glu Glu Glu Asp Arg Lys Pro Lys Ala Glu Glu
565 570 575

Asp Glu Ile Leu Asn Arg Ser Pro Arg Asn Arg Lys Pro Arg Arg Glu
580 585 590

<210> 9
<211> 1287
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
10 <222> (12)..(1265)

<400> 9
gaattcccgcc c atg ctg cta tcc gtg ccg ctg ctg ctc ggc ctc ctc ggc 50
Met Leu Leu Ser Val Pro Leu Leu Leu Gly Leu Leu Gly
1 5 10
ctg gcc gtc gcc gag cct gcc gtc tac ttc aag gag cag ttt ctg gac 98
Leu Ala Val Ala Glu Pro Ala Val Tyr Phe Lys Glu Gln Phe Leu Asp
15 20 25
gga gac ggg tgg act tcc cgc tgg atc gaa tcc aaa cac aag tca gat 146
Gly Asp Gly Trp Thr Ser Arg Trp Ile Glu Ser Lys His Lys Ser Asp
30 35 40 45
ttt ggc aaa ttc gtt ctc agt tcc ggc aag ttc tac ggt gac gag gag 194
Phe Gly Lys Phe Val Leu Ser Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Asp Glu Glu
50 55 60
aaa gat aaa ggt ttg cag aca agc cag gat gca cgc ttt tat gct ctg 242
Lys Asp Lys Gly Leu Gln Thr Ser Gln Asp Ala Arg Phe Tyr Ala Leu
65 70 75
tcg gcc agt ttc gag cct ttc agc aac aaa ggc cag acg ctg gtg gtg 290

ES 2 538 794 T3

Ser	Ala	Ser	Phe	Glu	Pro	Phe	Ser	Asn	Lys	Gly	Gln	Thr	Leu	Val	Val	
	80						85					90				
cag	ttc	acg	gtg	aaa	cat	gag	cag	aac	atc	gac	tgt	ggg	ggc	ggc	tat	338
Gln	Phe	Thr	Val	Lys	His	Glu	Gln	Asn	Ile	Asp	Cys	Gly	Gly	Gly	Tyr	
	95					100					105					
gtg	aag	ctg	ttt	cct	aat	agt	ttg	gac	cag	aca	gac	atg	cac	gga	gac	386
Val	Lys	Leu	Phe	Pro	Asn	Ser	Leu	Asp	Gln	Thr	Asp	Met	His	Gly	Asp	
110					115					120					125	
tca	gaa	tac	aac	atc	atg	ttt	ggg	ccc	gac	atc	tgt	ggc	cct	ggc	acc	434
Ser	Glu	Tyr	Asn	Ile	Met	Phe	Gly	Pro	Asp	Ile	Cys	Gly	Pro	Gly	Thr	
				130					135					140		
aag	aag	gtt	cat	gtc	atc	ttc	aac	tac	aag	ggc	aag	aac	gtg	ctg	atc	482
Lys	Lys	Val	His	Val	Ile	Phe	Asn	Tyr	Lys	Gly	Lys	Asn	Val	Leu	Ile	
			145					150					155			
aac	aag	gac	atc	cgt	tgc	aag	gat	gat	gag	ttt	aca	cac	ctg	tac	aca	530
Asn	Lys	Asp	Ile	Arg	Cys	Lys	Asp	Asp	Glu	Phe	Thr	His	Leu	Tyr	Thr	
		160					165					170				
ctg	att	gtg	cgg	cca	gac	aac	acc	tat	gag	gtg	aag	att	gac	aac	agc	578
Leu	Ile	Val	Arg	Pro	Asp	Asn	Thr	Tyr	Glu	Val	Lys	Ile	Asp	Asn	Ser	
	175					180					185					
cag	gtg	gag	tcc	ggc	tcc	ttg	gaa	gac	gat	tgg	gac	ttc	ctg	cca	ccc	626
Gln	Val	Glu	Ser	Gly	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp	Trp	Asp	Phe	Leu	Pro	Pro	
190					195					200					205	
aag	aag	ata	aag	gat	cct	gat	gct	tca	aaa	ccg	gaa	gac	tgg	gat	gag	674
Lys	Lys	Ile	Lys	Asp	Pro	Asp	Ala	Ser	Lys	Pro	Glu	Asp	Trp	Asp	Glu	
				210					215					220		
cgg	gcc	aag	atc	gat	gat	ccc	aca	gac	tcc	aag	cct	gag	gac	tgg	gac	722
Arg	Ala	Lys	Ile	Asp	Asp	Pro	Thr	Asp	Ser	Lys	Pro	Glu	Asp	Trp	Asp	
			225					230					235			
aag	ccc	gag	cat	atc	cct	gac	cct	gat	gct	aag	aag	ccc	gag	gac	tgg	770
Lys	Pro	Glu	His	Ile	Pro	Asp	Pro	Asp	Ala	Lys	Lys	Pro	Glu	Asp	Trp	
		240					245					250				
gat	gaa	gag	atg	gac	gga	gag	tgg	gaa	ccc	cca	gtg	att	cag	aac	cct	818
Asp	Glu	Glu	Met	Asp	Gly	Glu	Trp	Glu	Pro	Pro	Val	Ile	Gln	Asn	Pro	
	255					260					265					
gag	tac	aag	ggg	gag	tgg	aag	ccc	cgg	cag	atc	gac	aac	cca	gat	tac	866
Glu	Tyr	Lys	Gly	Glu	Trp	Lys	Pro	Arg	Gln	Ile	Asp	Asn	Pro	Asp	Tyr	
270					275					280					285	
aag	ggc	act	tgg	atc	cac	cca	gaa	att	gac	aac	ccc	gag	tat	tct	ccc	914
Lys	Gly	Thr	Trp	Ile	His	Pro	Glu	Ile	Asp	Asn	Pro	Glu	Tyr	Ser	Pro	
				290					295					300		
gat	ccc	agt	atc	tat	gcc	tat	gat	aac	ttt	ggc	gtg	ctg	ggc	ctg	gac	962

Asp Pro Ser Ile Tyr Ala Tyr Asp Asn Phe Gly Val Leu Gly Leu Asp
 305 310 315
 ctc tgg cag gtc aag tct ggc acc atc ttt gac aac ttc ctc atc acc 1010
 Leu Trp Gln Val Lys Ser Gly Thr Ile Phe Asp Asn Phe Leu Ile Thr
 320 325 330
 aac gat gag gca tac gct gag gag ttt ggc aac gag acg tgg ggc gta 1058
 Asn Asp Glu Ala Tyr Ala Glu Glu Phe Gly Asn Glu Thr Trp Gly Val
 335 340 345
 aca aag gca gca gag aaa caa atg aag gac aaa cag gac gag gag cag 1106
 Thr Lys Ala Ala Glu Lys Gln Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln
 350 355 360 365
 agg ctt aag gag gag gaa gaa gac aag aaa cgc aaa gag gag gag gag 1154
 Arg Leu Lys Glu Glu Glu Asp Lys Lys Arg Lys Glu Glu Glu Glu
 370 375 380
 gca gag gac aag gag gat gat gag gac aaa gat gag gat gag gag gat 1202
 Ala Glu Asp Lys Glu Asp Asp Glu Asp Lys Asp Glu Asp Glu Glu Asp
 385 390 395
 gag gag gac aag gag gaa gat gag gag gaa gat gtc ccc ggc cag gcc 1250
 Glu Glu Asp Lys Glu Glu Asp Glu Glu Glu Asp Val Pro Gly Gln Ala
 400 405 410
 aag gac gag ctg tag agaggcctgc ctccagtcta ga 1287
 Lys Asp Glu Leu
 415
 <210> 10
 <211> 417
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 Met Leu Leu Ser Val Pro Leu Leu Leu Gly Leu Leu Gly Leu Ala Val
 1 5 10 15
 Ala Glu Pro Ala Val Tyr Phe Lys Glu Gln Phe Leu Asp Gly Asp Gly
 20 25 30
 Trp Thr Ser Arg Trp Ile Glu Ser Lys His Lys Ser Asp Phe Gly Lys
 35 40 45
 Phe Val Leu Ser Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Asp Glu Glu Lys Asp Lys
 50 55 60
 Gly Leu Gln Thr Ser Gln Asp Ala Arg Phe Tyr Ala Leu Ser Ala Ser

ES 2 538 794 T3

65		70		75		80									
Phe	Glu	Pro	Phe	Ser	Asn	Lys	Gly	Gln	Thr	Leu	Val	Val	Gln	Phe	Thr
				85					90					95	
Val	Lys	His	Glu	Gln	Asn	Ile	Asp	Cys	Gly	Gly	Gly	Tyr	Val	Lys	Leu
			100					105					110		
Phe	Pro	Asn	Ser	Leu	Asp	Gln	Thr	Asp	Met	His	Gly	Asp	Ser	Glu	Tyr
		115					120					125			
Asn	Ile	Met	Phe	Gly	Pro	Asp	Ile	Cys	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Lys	Val
	130					135					140				
His	Val	Ile	Phe	Asn	Tyr	Lys	Gly	Lys	Asn	Val	Leu	Ile	Asn	Lys	Asp
145					150					155					160
Ile	Arg	Cys	Lys	Asp	Asp	Glu	Phe	Thr	His	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ile	Val
				165					170					175	
Arg	Pro	Asp	Asn	Thr	Tyr	Glu	Val	Lys	Ile	Asp	Asn	Ser	Gln	Val	Glu
			180					185					190		
Ser	Gly	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp	Trp	Asp	Phe	Leu	Pro	Pro	Lys	Lys	Ile
		195					200					205			
Lys	Asp	Pro	Asp	Ala	Ser	Lys	Pro	Glu	Asp	Trp	Asp	Glu	Arg	Ala	Lys
	210					215					220				
Ile	Asp	Asp	Pro	Thr	Asp	Ser	Lys	Pro	Glu	Asp	Trp	Asp	Lys	Pro	Glu
225					230					235					240
His	Ile	Pro	Asp	Pro	Asp	Ala	Lys	Lys	Pro	Glu	Asp	Trp	Asp	Glu	Glu
				245					250					255	
Met	Asp	Gly	Glu	Trp	Glu	Pro	Pro	Val	Ile	Gln	Asn	Pro	Glu	Tyr	Lys
			260					265					270		
Gly	Glu	Trp	Lys	Pro	Arg	Gln	Ile	Asp	Asn	Pro	Asp	Tyr	Lys	Gly	Thr
		275					280					285			
Trp	Ile	His	Pro	Glu	Ile	Asp	Asn	Pro	Glu	Tyr	Ser	Pro	Asp	Pro	Ser

ES 2 538 794 T3

290

295

300

Ile Tyr Ala Tyr Asp Asn Phe Gly Val Leu Gly Leu Asp Leu Trp Gln
305 310 315 320

Val Lys Ser Gly Thr Ile Phe Asp Asn Phe Leu Ile Thr Asn Asp Glu
325 330 335

Ala Tyr Ala Glu Glu Phe Gly Asn Glu Thr Trp Gly Val Thr Lys Ala
340 345 350

Ala Glu Lys Gln Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Leu Lys
355 360 365

Glu Glu Glu Glu Asp Lys Lys Arg Lys Glu Glu Glu Glu Ala Glu Asp
370 375 380

Lys Glu Asp Asp Glu Asp Lys Asp Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp
385 390 395 400

Lys Glu Glu Asp Glu Glu Glu Asp Val Pro Gly Gln Ala Lys Asp Glu
405 410 415

Leu

<210> 11

<211> 1696

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (65)..(1582)

<400> 11

gaattcctcc gcagtcccag ccgagcccg acccttcgg ccgtccccac cccacctcgc 60

cgcc atg cgc ctc cgc cgc cta gcg ctg ttc ccg ggt gtg gcg ctg ctt 109

Met Arg Leu Arg Arg Leu Ala Leu Phe Pro Gly Val Ala Leu Leu

1 5 10 15

ctt gcc gcg gcc cgc ctc gcc gct gcc tcc gac gtg cta gaa ctc acg 157

Leu Ala Ala Ala Arg Leu Ala Ala Ala Ser Asp Val Leu Glu Leu Thr

20 25 30

ES 2 538 794 T3

gac gac aac ttc gag agt cgc atc tcc gac acg ggc tct gcg ggc ctc Asp Asp Asn Phe Glu Ser Arg Ile Ser Asp Thr Gly Ser Ala Gly Leu 35 40 45	205
atg ctc gtc gag ttc ttc gct ccc tgg tgt gga cac tgc aag aga ctt Met Leu Val Glu Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Arg Leu 50 55 60	253
gca cct gag tat gaa gct gca gct acc aga tta aaa gga ata gtc cca Ala Pro Glu Tyr Glu Ala Ala Ala Thr Arg Leu Lys Gly Ile Val Pro 65 70 75	301
tta gca aag gtt gat tgc act gcc aac act aac acc tgt aat aaa tat Leu Ala Lys Val Asp Cys Thr Ala Asn Thr Asn Thr Cys Asn Lys Tyr 80 85 90 95	349
gga gtc agt gga tat cca acc ctg aag ata ttt aga gat ggt gaa gaa Gly Val Ser Gly Tyr Pro Thr Leu Lys Ile Phe Arg Asp Gly Glu Glu 100 105 110	397
gca ggt gct tat gat gga cct agg act gct gat gga att gtc agc cac Ala Gly Ala Tyr Asp Gly Pro Arg Thr Ala Asp Gly Ile Val Ser His 115 120 125	445
ttg aag aag cag gca gga cca gct tca gtg cct ctc agg act gag gaa Leu Lys Lys Gln Ala Gly Pro Ala Ser Val Pro Leu Arg Thr Glu Glu 130 135 140	493
gaa ttt aag aaa ttc att agt gat aaa gat gcc tct ata gta ggt ttt Glu Phe Lys Lys Phe Ile Ser Asp Lys Asp Ala Ser Ile Val Gly Phe 145 150 155	541
ttc gat gat tca ttc agt gag gct cac tcc gag ttc cta aaa gca gcc Phe Asp Asp Ser Phe Ser Glu Ala His Ser Glu Phe Leu Lys Ala Ala 160 165 170 175	589
agc aac ttg agg gat aac tac cga ttt gca cat acg aat gtt gag tct Ser Asn Leu Arg Asp Asn Tyr Arg Phe Ala His Thr Asn Val Glu Ser 180 185 190	637
ctg gtg aac gag tat gat gat aat gga gag ggt atc atc tta ttt cgt Leu Val Asn Glu Tyr Asp Asp Asn Gly Glu Gly Ile Ile Leu Phe Arg 195 200 205	685
cct tca cat ctc act aac aag ttt gag gac aag act gtg gca tat aca Pro Ser His Leu Thr Asn Lys Phe Glu Asp Lys Thr Val Ala Tyr Thr 210 215 220	733
gag caa aaa atg acc agt ggc aaa att aaa aag ttt atc cag gaa aac Glu Gln Lys Met Thr Ser Gly Lys Ile Lys Lys Phe Ile Gln Glu Asn 225 230 235	781
att ttt ggt atc tgc cct cac atg aca gaa gac aat aaa gat ttg ata Ile Phe Gly Ile Cys Pro His Met Thr Glu Asp Asn Lys Asp Leu Ile 240 245 250 255	829

cag ggc aag gac tta ctt att gct tac tat gat gtg gac tat gaa aag Gln Gly Lys Asp Leu Leu Ile Ala Tyr Tyr Asp Val Asp Tyr Glu Lys 260 265 270	877
aac gct aaa ggt tcc aac tac tgg aga aac agg gta atg atg gtg gca Asn Ala Lys Gly Ser Asn Tyr Trp Arg Asn Arg Val Met Met Val Ala 275 280 285	925
aag aaa ttc ctg gat gct ggg cac aaa ctc aac ttt gct gta gct agc Lys Lys Phe Leu Asp Ala Gly His Lys Leu Asn Phe Ala Val Ala Ser 290 295 300	973
cgc aaa acc ttt agc cat gaa ctt tct gat ttt ggc ttg gag agc act Arg Lys Thr Phe Ser His Glu Leu Ser Asp Phe Gly Leu Glu Ser Thr 305 310 315	1021
gct gga gag att cct gtt gtt gct atc aga act gct aaa gga gag aag Ala Gly Glu Ile Pro Val Val Ala Ile Arg Thr Ala Lys Gly Glu Lys 320 325 330 335	1069
ttt gtc atg cag gag gag ttc tcg cgt gat ggg aag gct ctg gag agg Phe Val Met Gln Glu Glu Phe Ser Arg Asp Gly Lys Ala Leu Glu Arg 340 345 350	1117
ttc ctg cag gat tac ttt gat ggc aat ctg aag aga tac ctg aag tct Phe Leu Gln Asp Tyr Phe Asp Gly Asn Leu Lys Arg Tyr Leu Lys Ser 355 360 365	1165
gaa cct atc cca gag agc aat gat ggg cct gtg aag gta gtg gta gca Glu Pro Ile Pro Glu Ser Asn Asp Gly Pro Val Lys Val Val Val Ala 370 375 380	1213
gag aat ttt gat gaa ata gtg aat aat gaa aat aaa gat gtg ctg att Glu Asn Phe Asp Glu Ile Val Asn Asn Glu Asn Lys Asp Val Leu Ile 385 390 395	1261
gaa ttt tat gcc cct tgg tgt ggt cat tgt aag aac ctg gag ccc aag Glu Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Asn Leu Glu Pro Lys 400 405 410 415	1309
tat aaa gaa ctt ggc gag aag ctc agc aaa gac cca aat atc gtc ata Tyr Lys Glu Leu Gly Glu Lys Leu Ser Lys Asp Pro Asn Ile Val Ile 420 425 430	1357
gcc aag atg gat gcc aca gcc aat gat gtg cct tct cca tat gaa gtc Ala Lys Met Asp Ala Thr Ala Asn Asp Val Pro Ser Pro Tyr Glu Val 435 440 445	1405
aga ggt ttt cct acc ata tac ttc tct cca gcc aac aag aag cta aat Arg Gly Phe Pro Thr Ile Tyr Phe Ser Pro Ala Asn Lys Lys Leu Asn 450 455 460	1453
cca aag aaa tat gaa ggt ggc cgt gaa tta agt gat ttt att agc tat Pro Lys Lys Tyr Glu Gly Gly Arg Glu Leu Ser Asp Phe Ile Ser Tyr 465 470 475	1501
cta caa aga gaa gct aca aac ccc cct gta att caa gaa gaa aaa ccc Leu Gln Arg Glu Ala Thr Asn Pro Pro Val Ile Gln Glu Glu Lys Pro 480 485 490 495	1549
aag aag aag aag aag gca cag gag gat ctc taa agcagtagcc aaacaccact Lys Lys Lys Lys Lys Ala Gln Glu Asp Leu 500 505	1602
ttgtaaaagg actcttccat cagagatggg aaaaccattg gggaggacta ggacccatat	1662
gggaattatt acctctcagg gccgagagtc taga	1696

<210> 12
<211> 505

ES 2 538 794 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Arg Leu Arg Arg Leu Ala Leu Phe Pro Gly Val Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Ala Ala Ala Arg Leu Ala Ala Ala Ser Asp Val Leu Glu Leu Thr Asp
20 25 30

Asp Asn Phe Glu Ser Arg Ile Ser Asp Thr Gly Ser Ala Gly Leu Met
35 40 45

Leu Val Glu Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Arg Leu Ala
50 55 60

Pro Glu Tyr Glu Ala Ala Ala Thr Arg Leu Lys Gly Ile Val Pro Leu
65 70 75 80

Ala Lys Val Asp Cys Thr Ala Asn Thr Asn Thr Cys Asn Lys Tyr Gly
85 90 95

Val Ser Gly Tyr Pro Thr Leu Lys Ile Phe Arg Asp Gly Glu Glu Ala
100 105 110

Gly Ala Tyr Asp Gly Pro Arg Thr Ala Asp Gly Ile Val Ser His Leu
115 120 125

Lys Lys Gln Ala Gly Pro Ala Ser Val Pro Leu Arg Thr Glu Glu Glu
130 135 140

5

ES 2 538 794 T3

Phe Lys Lys Phe Ile Ser Asp Lys Asp Ala Ser Ile Val Gly Phe Phe
 145 150 155 160

Asp Asp Ser Phe Ser Glu Ala His Ser Glu Phe Leu Lys Ala Ala Ser
 165 170 175

Asn Leu Arg Asp Asn Tyr Arg Phe Ala His Thr Asn Val Glu Ser Leu
 180 185 190

Val Asn Glu Tyr Asp Asp Asn Gly Glu Gly Ile Ile Leu Phe Arg Pro
 195 200 205

Ser His Leu Thr Asn Lys Phe Glu Asp Lys Thr Val Ala Tyr Thr Glu
 210 215 220

Gln Lys Met Thr Ser Gly Lys Ile Lys Lys Phe Ile Gln Glu Asn Ile
 225 230 235 240

Phe Gly Ile Cys Pro His Met Thr Glu Asp Asn Lys Asp Leu Ile Gln
 245 250 255

Gly Lys Asp Leu Leu Ile Ala Tyr Tyr Asp Val Asp Tyr Glu Lys Asn
 260 265 270

Ala Lys Gly Ser Asn Tyr Trp Arg Asn Arg Val Met Met Val Ala Lys
 275 280 285

Lys Phe Leu Asp Ala Gly His Lys Leu Asn Phe Ala Val Ala Ser Arg
 290 295 300

Lys Thr Phe Ser His Glu Leu Ser Asp Phe Gly Leu Glu Ser Thr Ala
 305 310 315 320

Gly Glu Ile Pro Val Val Ala Ile Arg Thr Ala Lys Gly Glu Lys Phe
 325 330 335

Val Met Gln Glu Glu Phe Ser Arg Asp Gly Lys Ala Leu Glu Arg Phe
 340 345 350

Leu Gln Asp Tyr Phe Asp Gly Asn Leu Lys Arg Tyr Leu Lys Ser Glu
 355 360 365

ES 2 538 794 T3

Pro Ile Pro Glu Ser Asn Asp Gly Pro Val Lys Val Val Val Ala Glu
370 375 380

Asn Phe Asp Glu Ile Val Asn Asn Glu Asn Lys Asp Val Leu Ile Glu
385 390 395 400

Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Asn Leu Glu Pro Lys Tyr
405 410 415

Lys Glu Leu Gly Glu Lys Leu Ser Lys Asp Pro Asn Ile Val Ile Ala
420 425 430

Lys Met Asp Ala Thr Ala Asn Asp Val Pro Ser Pro Tyr Glu Val Arg
435 440 445

Gly Phe Pro Thr Ile Tyr Phe Ser Pro Ala Asn Lys Lys Leu Asn Pro
450 455 460

Lys Lys Tyr Glu Gly Gly Arg Glu Leu Ser Asp Phe Ile Ser Tyr Leu
465 470 475 480

Gln Arg Glu Ala Thr Asn Pro Pro Val Ile Gln Glu Glu Lys Pro Lys
485 490 495

Lys Lys Lys Lys Ala Gln Glu Asp Leu
500 505

<210> 13
<211> 1926
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(1926)

<400> 13
atg gcc aaa gcc gcg gcg atc ggc atc gac ctg ggc acc acc tac tcc 48
Met Ala Lys Ala Ala Ala Ile Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Tyr Ser
1 5 10 15
tgc gtg ggg gtg ttc caa cac ggc aag gtg gag atc atc gcc aac gac 96
Cys Val Gly Val Phe Gln His Gly Lys Val Glu Ile Ile Ala Asn Asp
20 25 30
cag ggc aac cgc acc acc ccc agc tac gtg gcc ttc acg gac acc gag 144

ES 2 538 794 T3

Gln	Gly	Asn	Arg	Thr	Thr	Pro	Ser	Tyr	Val	Ala	Phe	Thr	Asp	Thr	Glu	
		35					40					45				
cgg	ctc	atc	ggg	gat	gcg	gcc	aag	aac	cag	gtg	gcg	ctg	aac	ccg	cag	192
Arg	Leu	Ile	Gly	Asp	Ala	Ala	Lys	Asn	Gln	Val	Ala	Leu	Asn	Pro	Gln	
	50					55				60						
aac	acc	gtg	ttt	gac	gcg	aag	cgg	ctg	atc	ggc	cgc	aag	ttc	ggc	gac	240
Asn	Thr	Val	Phe	Asp	Ala	Lys	Arg	Leu	Ile	Gly	Arg	Lys	Phe	Gly	Asp	
65				70					75					80		
ccg	gtg	gtg	cag	tcg	gac	atg	aag	cac	tgg	cct	ttc	cag	gtg	atc	aac	288
Pro	Val	Val	Gln	Ser	Asp	Met	Lys	His	Trp	Pro	Phe	Gln	Val	Ile	Asn	
				85					90					95		
gac	gga	gac	aag	ccc	aag	gtg	cag	gtg	agc	tac	aag	ggg	gag	acc	aag	336
Asp	Gly	Asp	Lys	Pro	Lys	Val	Gln	Val	Ser	Tyr	Lys	Gly	Glu	Thr	Lys	
			100					105					110			
gca	ttc	tac	ccc	gag	gag	atc	tcg	tcc	atg	gtg	ctg	acc	aag	atg	aag	384
Ala	Phe	Tyr	Pro	Glu	Glu	Ile	Ser	Ser	Met	Val	Leu	Thr	Lys	Met	Lys	
	115					120						125				
gag	atc	gcc	gag	gcg	tac	ctg	ggc	tac	ccg	gtg	acc	aac	gcg	gtg	atc	432
Glu	Ile	Ala	Glu	Ala	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Pro	Val	Thr	Asn	Ala	Val	Ile	
	130					135					140					
acc	gtg	ccg	gcc	tac	ttc	aac	gac	tcg	cag	cgc	cag	gcc	acc	aag	gat	480
Thr	Val	Pro	Ala	Tyr	Phe	Asn	Asp	Ser	Gln	Arg	Gln	Ala	Thr	Lys	Asp	
145				150					155						160	
gcg	ggt	gtg	atc	gcg	ggg	ctc	aac	gtg	ctg	cgg	atc	atc	aac	gag	ccc	528
Ala	Gly	Val	Ile	Ala	Gly	Leu	Asn	Val	Leu	Arg	Ile	Ile	Asn	Glu	Pro	
				165					170					175		
acg	gcc	gcc	gcc	atc	gcc	tac	ggc	ctg	gac	aga	acg	ggc	aag	ggg	gag	576
Thr	Ala	Ala	Ala	Ile	Ala	Tyr	Gly	Leu	Asp	Arg	Thr	Gly	Lys	Gly	Glu	
			180					185					190			
cgc	aac	gtg	ctc	atc	ttt	gac	ctg	ggc	ggg	ggc	acc	ttc	gac	gtg	tcc	624
Arg	Asn	Val	Leu	Ile	Phe	Asp	Leu	Gly	Gly	Gly	Thr	Phe	Asp	Val	Ser	
		195					200					205				
atc	ctg	acg	atc	gac	gac	ggc	atc	ttc	gag	gtg	aag	gcc	acg	gcc	ggg	672
Ile	Leu	Thr	Ile	Asp	Asp	Gly	Ile	Phe	Glu	Val	Lys	Ala	Thr	Ala	Gly	
	210					215					220					
gac	acc	cac	ctg	ggt	ggg	gag	gac	ttt	gac	aac	agg	ctg	gtg	aac	cac	720
Asp	Thr	His	Leu	Gly	Gly	Glu	Asp	Phe	Asp	Asn	Arg	Leu	Val	Asn	His	
225				230					235					240		
ttc	gtg	gag	gag	ttc	aag	aga	aaa	cac	aag	aag	gac	atc	agc	cag	aac	768
Phe	Val	Glu	Glu	Phe	Lys	Arg	Lys	His	Lys	Lys	Asp	Ile	Ser	Gln	Asn	
				245					250					255		
aag	cga	gcc	gtg	agg	cgg	ctg	cgc	acc	gcc	tgc	gag	agg	gcc	aag	agg	816

ES 2 538 794 T3

Lys Arg Ala Val Arg Arg Leu Arg Thr Ala Cys Glu Arg Ala Lys Arg	
260 265 270	
acc ctg tcg tcc agc acc cag gcc agc ctg gag atc gac tcc ctg ttt	864
Thr Leu Ser Ser Ser Thr Gln Ala Ser Leu Glu Ile Asp Ser Leu Phe	
275 280 285	
gag gcc atc gac ttc tac acg tcc atc acc agg gcg agg ttc gag gag	912
Glu Gly Ile Asp Phe Tyr Thr Ser Ile Thr Arg Ala Arg Phe Glu Glu	
290 295 300	
ctg tgc tcc gac ctg ttc cga agc acc ctg gag ccc gtg gag aag gct	960
Leu Cys Ser Asp Leu Phe Arg Ser Thr Leu Glu Pro Val Glu Lys Ala	
305 310 315 320	
ctg cgc gac gcc aag ctg gac aag gcc cag att cac gac ctg gtc ctg	1008
Leu Arg Asp Ala Lys Leu Asp Lys Ala Gln Ile His Asp Leu Val Leu	
325 330 335	
gtc ggg gcc tcc acc cgc atc ccc aag gtg cag aag ctg ctg cag gac	1056
Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile Pro Lys Val Gln Lys Leu Leu Gln Asp	
340 345 350	
ttc ttc aac ggg cgc gac ctg aac aag agc atc aac ccc gac gag gct	1104
Phe Phe Asn Gly Arg Asp Leu Asn Lys Ser Ile Asn Pro Asp Glu Ala	
355 360 365	
gtg gcc tac ggg gcg gcg gtg cag gcg gcc atc ctg atg ggg gac aag	1152
Val Ala Tyr Gly Ala Ala Val Gln Ala Ala Ile Leu Met Gly Asp Lys	
370 375 380	
tcc gag aac gtg cag gac ctg ctg ctg ctg gac gtg gct ccc ctg tcg	1200
Ser Glu Asn Val Gln Asp Leu Leu Leu Leu Asp Val Ala Pro Leu Ser	
385 390 395 400	
ctg ggg ctg gag acg gcc gga ggc gtg atg act gcc ctg atc aag cgc	1248
Leu Gly Leu Glu Thr Ala Gly Gly Val Met Thr Ala Leu Ile Lys Arg	
405 410 415	
aac tcc acc atc ccc acc aag cag acg cag atc ttc acc acc tac tcc	1296
Asn Ser Thr Ile Pro Thr Lys Gln Thr Gln Ile Phe Thr Thr Tyr Ser	
420 425 430	
gac aac caa ccc ggg gtg ctg atc cag gtg tac gag gcc gag agg gcc	1344
Asp Asn Gln Pro Gly Val Leu Ile Gln Val Tyr Glu Gly Glu Arg Ala	
435 440 445	
atg acg aaa gac aac aat ctg ttg ggg cgc ttc gag ctg agc gcc atc	1392
Met Thr Lys Asp Asn Asn Leu Leu Gly Arg Phe Glu Leu Ser Gly Ile	
450 455 460	
cct ccg gcc ccc agg ggc gtg ccc cag atc gag gtg acc ttc gac atc	1440
Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln Ile Glu Val Thr Phe Asp Ile	
465 470 475 480	
gat gcc aac ggc atc ctg aac gtc acg gcc acg gac aag agc acc ggc	1488

Asp	Ala	Asn	Gly	Ile	Leu	Asn	Val	Thr	Ala	Thr	Asp	Lys	Ser	Thr	Gly		
				485					490					495			
aag	gcc	aac	aag	atc	acc	atc	acc	aac	gac	aag	ggc	cgc	ctg	agc	aag		1536
Lys	Ala	Asn	Lys	Ile	Thr	Ile	Thr	Asn	Asp	Lys	Gly	Arg	Leu	Ser	Lys		
			500					505					510				
gag	gag	atc	gag	cgc	atg	gtg	cag	gag	gcg	gag	aag	tac	aaa	gcg	gag		1584
Glu	Glu	Ile	Glu	Arg	Met	Val	Gln	Glu	Ala	Glu	Lys	Tyr	Lys	Ala	Glu		
			515				520					525					
gac	gag	gtg	cag	cgc	gag	agg	gtg	tca	gcc	aag	aac	gcc	ctg	gag	tcc		1632
Asp	Glu	Val	Gln	Arg	Glu	Arg	Val	Ser	Ala	Lys	Asn	Ala	Leu	Glu	Ser		
	530					535					540						
tac	gcc	ttc	aac	atg	aag	agc	gcc	gtg	gag	gat	gag	ggg	ctc	aag	ggc		1680
Tyr	Ala	Phe	Asn	Met	Lys	Ser	Ala	Val	Glu	Asp	Glu	Gly	Leu	Lys	Gly		
545					550				555						560		
aag	atc	agc	gag	gcc	gac	aag	aag	aag	gtg	ctg	gac	aag	tgt	caa	gag		1728
Lys	Ile	Ser	Glu	Ala	Asp	Lys	Lys	Lys	Val	Leu	Asp	Lys	Cys	Gln	Glu		
				565					570					575			
gtc	atc	tcg	tgg	ctg	gac	gcc	aac	acc	ttg	gcc	gag	aag	gac	gag	ttt		1776
Val	Ile	Ser	Trp	Leu	Asp	Ala	Asn	Thr	Leu	Ala	Glu	Lys	Asp	Glu	Phe		
			580					585					590				
gag	cac	aag	agg	aag	gag	ctg	gag	cag	gtg	tgt	aac	ccc	atc	atc	agc		1824
Glu	His	Lys	Arg	Lys	Glu	Leu	Glu	Gln	Val	Cys	Asn	Pro	Ile	Ile	Ser		
		595					600					605					
gga	ctg	tac	cag	ggc	ggc	ggc	ccc	ggg	cct	ggg	ggc	ttc	ggg	gct			1872
Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Ala	Gly	Gly	Pro	Gly	Pro	Gly	Gly	Phe	Gly	Ala		
	610					615					620						
cag	ggc	ccc	aag	gga	ggg	tct	ggg	tca	ggc	ccc	acc	att	gag	gag	gta		1920
Gln	Gly	Pro	Lys	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Pro	Thr	Ile	Glu	Glu	Val		
625					630					635					640		
gat	tag																1926
Asp																	

<210> 14
 <211> 641
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Met Ala Lys Ala Ala Ala Ile Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Tyr Ser
 1 5 10 15

Cys Val Gly Val Phe Gln His Gly Lys Val Glu Ile Ile Ala Asn Asp

ES 2 538 794 T3

20					25					30					
Gln	Gly	Asn	Arg	Thr	Thr	Pro	Ser	Tyr	Val	Ala	Phe	Thr	Asp	Thr	Glu
		35					40					45			
Arg	Leu	Ile	Gly	Asp	Ala	Ala	Lys	Asn	Gln	Val	Ala	Leu	Asn	Pro	Gln
	50					55					60				
Asn	Thr	Val	Phe	Asp	Ala	Lys	Arg	Leu	Ile	Gly	Arg	Lys	Phe	Gly	Asp
65						70					75				80
Pro	Val	Val	Gln	Ser	Asp	Met	Lys	His	Trp	Pro	Phe	Gln	Val	Ile	Asn
				85					90					95	
Asp	Gly	Asp	Lys	Pro	Lys	Val	Gln	Val	Ser	Tyr	Lys	Gly	Glu	Thr	Lys
			100						105				110		
Ala	Phe	Tyr	Pro	Glu	Glu	Ile	Ser	Ser	Met	Val	Leu	Thr	Lys	Met	Lys
		115					120					125			
Glu	Ile	Ala	Glu	Ala	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Pro	Val	Thr	Asn	Ala	Val	Ile
	130					135					140				
Thr	Val	Pro	Ala	Tyr	Phe	Asn	Asp	Ser	Gln	Arg	Gln	Ala	Thr	Lys	Asp
145						150					155				160
Ala	Gly	Val	Ile	Ala	Gly	Leu	Asn	Val	Leu	Arg	Ile	Ile	Asn	Glu	Pro
				165					170					175	
Thr	Ala	Ala	Ala	Ile	Ala	Tyr	Gly	Leu	Asp	Arg	Thr	Gly	Lys	Gly	Glu
			180					185					190		
Arg	Asn	Val	Leu	Ile	Phe	Asp	Leu	Gly	Gly	Gly	Thr	Phe	Asp	Val	Ser
		195					200					205			
Ile	Leu	Thr	Ile	Asp	Asp	Gly	Ile	Phe	Glu	Val	Lys	Ala	Thr	Ala	Gly
	210					215					220				
Asp	Thr	His	Leu	Gly	Gly	Glu	Asp	Phe	Asp	Asn	Arg	Leu	Val	Asn	His
225						230					235				240
Phe	Val	Glu	Glu	Phe	Lys	Arg	Lys	His	Lys	Lys	Asp	Ile	Ser	Gln	Asn

ES 2 538 794 T3

245					250					255					
Lys	Arg	Ala	Val	Arg	Arg	Leu	Arg	Thr	Ala	Cys	Glu	Arg	Ala	Lys	Arg
			260					265					270		
Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Thr	Gln	Ala	Ser	Leu	Glu	Ile	Asp	Ser	Leu	Phe
		275					280					285			
Glu	Gly	Ile	Asp	Phe	Tyr	Thr	Ser	Ile	Thr	Arg	Ala	Arg	Phe	Glu	Glu
	290					295					300				
Leu	Cys	Ser	Asp	Leu	Phe	Arg	Ser	Thr	Leu	Glu	Pro	Val	Glu	Lys	Ala
305					310					315					320
Leu	Arg	Asp	Ala	Lys	Leu	Asp	Lys	Ala	Gln	Ile	His	Asp	Leu	Val	Leu
				325					330					335	
Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Arg	Ile	Pro	Lys	Val	Gln	Lys	Leu	Leu	Gln	Asp
			340					345					350		
Phe	Phe	Asn	Gly	Arg	Asp	Leu	Asn	Lys	Ser	Ile	Asn	Pro	Asp	Glu	Ala
		355					360					365			
Val	Ala	Tyr	Gly	Ala	Ala	Val	Gln	Ala	Ala	Ile	Leu	Met	Gly	Asp	Lys
	370					375					380				
Ser	Glu	Asn	Val	Gln	Asp	Leu	Leu	Leu	Leu	Asp	Val	Ala	Pro	Leu	Ser
385					390					395					400
Leu	Gly	Leu	Glu	Thr	Ala	Gly	Gly	Val	Met	Thr	Ala	Leu	Ile	Lys	Arg
				405					410					415	
Asn	Ser	Thr	Ile	Pro	Thr	Lys	Gln	Thr	Gln	Ile	Phe	Thr	Thr	Tyr	Ser
			420					425					430		
Asp	Asn	Gln	Pro	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Val	Tyr	Glu	Gly	Glu	Arg	Ala
		435					440					445			
Met	Thr	Lys	Asp	Asn	Asn	Leu	Leu	Gly	Arg	Phe	Glu	Leu	Ser	Gly	Ile
	450					455					460				
Pro	Pro	Ala	Pro	Arg	Gly	Val	Pro	Gln	Ile	Glu	Val	Thr	Phe	Asp	Ile

ES 2 538 794 T3

465		470		475		480									
Asp	Ala	Asn	Gly	Ile	Leu	Asn	Val	Thr	Ala	Thr	Asp	Lys	Ser	Thr	Gly
			485						490					495	
Lys	Ala	Asn	Lys	Ile	Thr	Ile	Thr	Asn	Asp	Lys	Gly	Arg	Leu	Ser	Lys
			500					505					510		
Glu	Glu	Ile	Glu	Arg	Met	Val	Gln	Glu	Ala	Glu	Lys	Tyr	Lys	Ala	Glu
		515					520					525			
Asp	Glu	Val	Gln	Arg	Glu	Arg	Val	Ser	Ala	Lys	Asn	Ala	Leu	Glu	Ser
	530					535					540				
Tyr	Ala	Phe	Asn	Met	Lys	Ser	Ala	Val	Glu	Asp	Glu	Gly	Leu	Lys	Gly
545					550					555					560
Lys	Ile	Ser	Glu	Ala	Asp	Lys	Lys	Lys	Val	Leu	Asp	Lys	Cys	Gln	Glu
				565					570					575	
Val	Ile	Ser	Trp	Leu	Asp	Ala	Asn	Thr	Leu	Ala	Glu	Lys	Asp	Glu	Phe
			580					585					590		
Glu	His	Lys	Arg	Lys	Glu	Leu	Glu	Gln	Val	Cys	Asn	Pro	Ile	Ile	Ser
		595					600					605			
Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Ala	Gly	Gly	Pro	Gly	Pro	Gly	Gly	Phe	Gly	Ala
	610					615					620				
Gln	Gly	Pro	Lys	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Pro	Thr	Ile	Glu	Glu	Val
625					630					635					640

Asp

<210> 15

<211> 1023

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1023)

<400> 15

atg ggt aaa gac tac tac cag acg ttg ggc ctg gcc cgc ggc gcg tcg Met Gly Lys Asp Tyr Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ala Arg Gly Ala Ser 1 5 10 15	48
gac gag gag atc aag cgg gcc tac cgc cgc cag gcg ctg cgc tac cac Asp Glu Glu Ile Lys Arg Ala Tyr Arg Arg Gln Ala Leu Arg Tyr His 20 25 30	96
ccg gac aag aac aag gag ccc ggc gcc gag gag aag ttc aag gag atc Pro Asp Lys Asn Lys Glu Pro Gly Ala Glu Glu Lys Phe Lys Glu Ile 35 40 45	144
gct gag gcc tac gac gtg ctc agc gac ccg cgc aag cgc gag atc ttc Ala Glu Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Arg Lys Arg Glu Ile Phe 50 55 60	192
gac cgc tac ggg gag gaa ggc cta aag ggg agt ggc ccc agt ggc ggt Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Lys Gly Ser Gly Pro Ser Gly Gly 65 70 75 80	240
agc ggc ggt ggt gcc aat ggt acc tct ttc agc tac aca ttc cat gga Ser Gly Gly Gly Ala Asn Gly Thr Ser Phe Ser Tyr Thr Phe His Gly 85 90 95	288
gac cct cat gcc atg ttt gct gag ttc ttc ggt ggc aga aat ccc ttt Asp Pro His Ala Met Phe Ala Glu Phe Phe Gly Gly Arg Asn Pro Phe 100 105 110	336
gac acc ttt ttt ggg cag cgg aac ggg gag gaa ggc atg gac att gat Asp Thr Phe Phe Gly Gln Arg Asn Gly Glu Glu Gly Met Asp Ile Asp 115 120 125	384
gac cca ttc tct ggc ttc cct atg ggc atg ggt ggc ttc acc aac gtg Asp Pro Phe Ser Gly Phe Pro Met Gly Met Gly Gly Phe Thr Asn Val 130 135 140	432
aac ttt ggc cgc tcc cgc tct gcc caa gag ccc gcc cga aag aag caa Asn Phe Gly Arg Ser Arg Ser Ala Gln Glu Pro Ala Arg Lys Lys Gln 145 150 155 160	480
gat ccc cca gtc acc cac gac ctt cga gtc tcc ctt gaa gag atc tac Asp Pro Pro Val Thr His Asp Leu Arg Val Ser Leu Glu Glu Ile Tyr 165 170 175	528
agc ggc tgt acc aag aag atg aaa atc tcc cac aag cgg cta aac ccc Ser Gly Cys Thr Lys Lys Met Lys Ile Ser His Lys Arg Leu Asn Pro 180 185 190	576
gac gga aag agc att cga aac gaa gac aaa ata ttg acc atc gaa gtg Asp Gly Lys Ser Ile Arg Asn Glu Asp Lys Ile Leu Thr Ile Glu Val 195 200 205	624
aag aag ggg tgg aaa gaa gga acc aaa atc act ttc ccc aag gaa gga Lys Lys Gly Trp Lys Glu Gly Thr Lys Ile Thr Phe Pro Lys Glu Gly 210 215 220 225 230 235 240	672

ES 2 538 794 T3

210	215	220	
gac cag acc tcc aac aac att cca gct gat atc gtc ttt gtt tta aag			720
Asp Gln Thr Ser Asn Asn Ile Pro Ala Asp Ile Val Phe Val Leu Lys			
225	230	235	240
gac aag ccc cac aat atc ttt aag aga gat ggc tct gat gtc att tat			768
Asp Lys Pro His Asn Ile Phe Lys Arg Asp Gly Ser Asp Val Ile Tyr			
245	250		255
cct gcc agg atc agc ctc cgg gag gct ctg tgt ggc tgc aca gtg aac			816
Pro Ala Arg Ile Ser Leu Arg Glu Ala Leu Cys Gly Cys Thr Val Asn			
260	265		270
gtc ccc act ctg gac ggc agg acg ata ccc gtc gta ttc aaa gat gtt			864
Val Pro Thr Leu Asp Gly Arg Thr Ile Pro Val Val Phe Lys Asp Val			
275	280		285
atc agg cct ggc atg cgg cga aaa gtt cct gga gaa ggc ctc ccc ctc			912
Ile Arg Pro Gly Met Arg Arg Lys Val Pro Gly Glu Gly Leu Pro Leu			
290	295		300
ccc aaa aca ccc gag aaa cgt ggg gac ctc att att gag ttt gaa gtg			960
Pro Lys Thr Pro Glu Lys Arg Gly Asp Leu Ile Ile Glu Phe Glu Val			
305	310		315
atc ttc ccc gaa agg att ccc cag aca tca aga acc gta ctt gag cag			1008
Ile Phe Pro Glu Arg Ile Pro Gln Thr Ser Arg Thr Val Leu Glu Gln			
325	330		335
gtt ctt cca ata tag			1023
Val Leu Pro Ile			
340			

<210> 16
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Met Gly Lys Asp Tyr Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ala Arg Gly Ala Ser
 1 5 10 15

Asp Glu Glu Ile Lys Arg Ala Tyr Arg Arg Gln Ala Leu Arg Tyr His
 20 25 30

Pro Asp Lys Asn Lys Glu Pro Gly Ala Glu Glu Lys Phe Lys Glu Ile
 35 40 45

Ala Glu Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Arg Lys Arg Glu Ile Phe
 50 55 60

ES 2 538 794 T3

Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Lys Gly Ser Gly Pro Ser Gly Gly
 65 70 75 80

Ser Gly Gly Gly Ala Asn Gly Thr Ser Phe Ser Tyr Thr Phe His Gly
 85 90 95

Asp Pro His Ala Met Phe Ala Glu Phe Phe Gly Gly Arg Asn Pro Phe
 100 105 110

Asp Thr Phe Phe Gly Gln Arg Asn Gly Glu Glu Gly Met Asp Ile Asp
 115 120 125

Asp Pro Phe Ser Gly Phe Pro Met Gly Met Gly Gly Phe Thr Asn Val
 130 135 140

Asn Phe Gly Arg Ser Arg Ser Ala Gln Glu Pro Ala Arg Lys Lys Gln
 145 150 155 160

Asp Pro Pro Val Thr His Asp Leu Arg Val Ser Leu Glu Glu Ile Tyr
 165 170 175

Ser Gly Cys Thr Lys Lys Met Lys Ile Ser His Lys Arg Leu Asn Pro
 180 185 190

Asp Gly Lys Ser Ile Arg Asn Glu Asp Lys Ile Leu Thr Ile Glu Val
 195 200 205

Lys Lys Gly Trp Lys Glu Gly Thr Lys Ile Thr Phe Pro Lys Glu Gly
 210 215 220

Asp Gln Thr Ser Asn Asn Ile Pro Ala Asp Ile Val Phe Val Leu Lys
 225 230 235 240

Asp Lys Pro His Asn Ile Phe Lys Arg Asp Gly Ser Asp Val Ile Tyr
 245 250 255

Pro Ala Arg Ile Ser Leu Arg Glu Ala Leu Cys Gly Cys Thr Val Asn
 260 265 270

Val Pro Thr Leu Asp Gly Arg Thr Ile Pro Val Val Phe Lys Asp Val
 275 280 285

ES 2 538 794 T3

Ile Arg Pro Gly Met Arg Arg Lys Val Pro Gly Glu Gly Leu Pro Leu
290 295 300

Pro Lys Thr Pro Glu Lys Arg Gly Asp Leu Ile Ile Glu Phe Glu Val
305 310 315 320

Ile Phe Pro Glu Arg Ile Pro Gln Thr Ser Arg Thr Val Leu Glu Gln
325 330 335

Val Leu Pro Ile
340

<210> 17
<211> 1122
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(1122)

<400> 17
atg acc acc tca gca agt tcc cac tta aat aaa ggc atc aag cag gtg 48
Met Thr Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Val
1 5 10 15

tac atg tcc ctg cct cag ggt gag aaa gtc cag gcc atg tat atc tgg 96
Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
20 25 30

atc gat ggt act gga gaa gga ctg cgc tgc aag acc cgg acc ctg gac 144
Ile Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
35 40 45

agt gag ccc aag tgt gtg gaa gag ttg cct gag tgg aat ttc gat ggc 192
Ser Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Asp Gly
50 55 60

tcc agt act tta cag tct gag ggt tcc aac agt gac atg tat ctc gtg 240
Ser Ser Thr Leu Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu Val
65 70 75 80

cct gct gcc atg ttt cgg gac ccc ttc cgt aag gac cct aac aag ctg 288
Pro Ala Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu
85 90 95

gtg tta tgt gaa gtt ttc aag tac aat cga agg cct gca gag acc aat 336
Val Leu Cys Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Arg Pro Ala Glu Thr Asn
100 105 110

ES 2 538 794 T3

ttg agg cac acc tgt aaa cgg ata atg gac atg gtg agc aac cag cac	384
Leu Arg His Thr Cys Lys Arg Ile Met Asp Met Val Ser Asn Gln His	
115 120 125	
ccc tgg ttt ggc atg gag cag gag tat acc ctc atg ggg aca gat ggg	432
Pro Trp Phe Gly Met Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Met Gly Thr Asp Gly	
130 135 140	
cac ccc ttt ggt tgg cct tcc aac ggc ttc cca ggg ccc cag ggt cca	480
His Pro Phe Gly Trp Pro Ser Asn Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Pro	
145 150 155 160	
tat tac tgt ggt gtg gga gca gac aga gcc tat ggc agg gac atc gtg	528
Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Ala Asp Arg Ala Tyr Gly Arg Asp Ile Val	
165 170 175	
gag gcc cat tac cgg gcc tgc ttg tat gct gga gtc aag att gcg ggg	576
Glu Ala His Tyr Arg Ala Cys Leu Tyr Ala Gly Val Lys Ile Ala Gly	
180 185 190	
act aat gcc gag gtc atg cct gcc cag tgg gaa ttt cag att gga cct	624
Thr Asn Ala Glu Val Met Pro Ala Gln Trp Glu Phe Gln Ile Gly Pro	
195 200 205	
tgt gaa gga atc agc atg gga gat cat ctc tgg gtg gcc cgt ttc atc	672
Cys Glu Gly Ile Ser Met Gly Asp His Leu Trp Val Ala Arg Phe Ile	
210 215 220	
ttg cat cgt gtg tgt gaa gac ttt gga gtg ata gca acc ttt gat cct	720
Leu His Arg Val Cys Glu Asp Phe Gly Val Ile Ala Thr Phe Asp Pro	
225 230 235 240	
aag ccc att cct ggg aac tgg aat ggt gca ggc tgc cat acc aac ttc	768
Lys Pro Ile Pro Gly Asn Trp Asn Gly Ala Gly Cys His Thr Asn Phe	
245 250 255	
agc acc aag gcc atg cgg gag gag aat ggt ctg aag tac atc gag gag	816
Ser Thr Lys Ala Met Arg Glu Glu Asn Gly Leu Lys Tyr Ile Glu Glu	
260 265 270	
gcc att gag aaa cta agc aag cgg cac cag tac cac atc cgt gcc tat	864
Ala Ile Glu Lys Leu Ser Lys Arg His Gln Tyr His Ile Arg Ala Tyr	
275 280 285	
gat ccc aag gga ggc ctg gac aat gcc cga cgt cta act gga ttc cat	912
Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His	
290 295 300	
gaa acc tcc aac atc aac gac ttt tct gct ggt gta gcc aat cgt agc	960
Glu Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asn Arg Ser	
305 310 315 320	
gcc agc ata cgc att ccc cgg act gtt ggc cag gag aag aag ggt tac	1008
Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr	
325 330 335	
ttt gaa gat cgt cgc ccc tct gcc aac tgc gac ccc ttt tcg gtg aca	1056
Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Phe Ser Val Thr	
340 345 350	
gaa gcc ctc atc cgc acg tgt ctt ctc aat gaa acc ggc gat gag ccc	1104
Glu Ala Leu Ile Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro	
355 360 365	
ttc cag tac aaa aat taa	1122
Phe Gln Tyr Lys Asn	
370	

ES 2 538 794 T3

<210> 18
 <211> 373
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 18
 Met Thr Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Val
 1 5 10 15
 Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
 20 25 30
 Ile Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
 35 40 45
 Ser Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Asp Gly
 50 55 60
 Ser Ser Thr Leu Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu Val
 65 70 75 80
 Pro Ala Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu
 85 90 95
 Val Leu Cys Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Arg Pro Ala Glu Thr Asn
 100 105 110
 Leu Arg His Thr Cys Lys Arg Ile Met Asp Met Val Ser Asn Gln His
 115 120 125
 Pro Trp Phe Gly Met Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Met Gly Thr Asp Gly
 130 135 140

ES 2 538 794 T3

His Pro Phe Gly Trp Pro Ser Asn Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Pro
145 150 155 160

Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Ala Asp Arg Ala Tyr Gly Arg Asp Ile Val
165 170 175

Glu Ala His Tyr Arg Ala Cys Leu Tyr Ala Gly Val Lys Ile Ala Gly
180 185 190

Thr Asn Ala Glu Val Met Pro Ala Gln Trp Glu Phe Gln Ile Gly Pro
195 200 205

Cys Glu Gly Ile Ser Met Gly Asp His Leu Trp Val Ala Arg Phe Ile
210 215 220

Leu His Arg Val Cys Glu Asp Phe Gly Val Ile Ala Thr Phe Asp Pro
225 230 235 240

Lys Pro Ile Pro Gly Asn Trp Asn Gly Ala Gly Cys His Thr Asn Phe
245 250 255

Ser Thr Lys Ala Met Arg Glu Glu Asn Gly Leu Lys Tyr Ile Glu Glu
260 265 270

Ala Ile Glu Lys Leu Ser Lys Arg His Gln Tyr His Ile Arg Ala Tyr
275 280 285

Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His
290 295 300

Glu Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asn Arg Ser
305 310 315 320

Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr
325 330 335

Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Phe Ser Val Thr
340 345 350

Glu Ala Leu Ile Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro
355 360 365

Phe Gln Tyr Lys Asn
370

<210> 19
<211> 170
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 538 794 T3

<400> 19

Ala Asp Arg Glu Arg Ser Ile His Asp Phe Cys Leu Val Ser Lys Val
1 5 10 15

Val Gly Arg Cys Arg Ala Ser Met Pro Arg Trp Trp Tyr Asn Val Thr
20 25 30

Asp Gly Ser Cys Gln Leu Phe Val Tyr Gly Gly Cys Asp Gly Asn Ser
35 40 45

Asn Asn Tyr Leu Thr Lys Glu Glu Cys Leu Lys Lys Cys Ala Thr Val
50 55 60

Thr Glu Asn Ala Thr Gly Asp Leu Ala Thr Ser Arg Asn Ala Ala Asp
65 70 75 80

Ser Ser Val Pro Ser Ala Pro Arg Arg Gln Asp Ser Glu Asp His Ser
85 90 95

Ser Asp Met Phe Asn Tyr Glu Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala Val Thr
100 105 110

Gly Pro Cys Arg Ala Ser Phe Pro Arg Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg
115 120 125

Asn Ser Cys Asn Asn Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Lys Asn
130 135 140

Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Ala Cys Met Leu Arg Cys Phe Arg Gln Gln
145 150 155 160

Glu Asn Pro Pro Leu Pro Leu Gly Ser Lys
165 170

<210> 20

5 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> oligonucleótido sintético

<400> 20

aggaaccgc atggccaaag 20

<210> 21

15 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> oligonucleótido sintético

<400> 21

gaaaggcccc taatctacct cctca 25

25

<210> 22
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> péptido sintético
 <220>
 10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> N-benzoilo
 <220>
 15 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es Arg-pNA
 <400> 22
 Pro Phe Xaa
 20 1

REIVINDICACIONES

1. Una célula hospedadora CHO de mamífero para mejorar la expresión de una proteína bikunina recombinante, teniendo dicha célula CHO de mamífero material genético que codifica para la expresión de dicha proteína bikunina recombinante y estando transformada con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona Erp57.
2. Una célula hospedadora BHK de mamífero para mejorar la expresión de una proteína del Factor VIII recombinante, teniendo dicha célula BHK de mamífero material genético que codifica para la expresión de dicho Factor VIII recombinante y estando transformada con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona Erp57 y al menos un vector de expresión que comprende calreticulina.
3. La célula hospedadora de mamífero según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la proteína recombinante es secretada.
4. La célula hospedadora de mamífero según la reivindicación 3, en la que el material genético que codifica para la expresión de dicha proteína recombinante está integrado en el ADN de la célula hospedadora.
5. La célula hospedadora de mamífero según la reivindicación 4, transformada adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.
6. Un método para producir una célula hospedadora CHO de mamífero según la reivindicación 1, en donde el método comprende:
proporcionar una célula CHO de mamífero que tiene material genético que codifica para la expresión de una proteína bikunina recombinante; y
transformar la célula CHO de mamífero con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona Erp57.
7. Un método para producir una célula hospedadora BHK de mamífero según la reivindicación 2, en donde el método comprende:
proporcionar una célula BHK de mamífero que tiene material genético que codifica para la expresión de una proteína del Factor VIII recombinante; y
transformar la célula de mamífero con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona Erp57 y al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica la proteína chaperona calreticulina.
8. El método según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que el producto proteico recombinante es secretado.
9. El método según la reivindicación 8, en el que el material genético que codifica para la expresión de dicho producto proteico recombinante está integrado en el ADN de la célula hospedadora.
10. El método según una la reivindicación 6 o la reivindicación 7, transformado adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.
11. Un método para producir un producto proteico recombinante secretado que comprende las etapas de:
cultivar una célula hospedadora de mamífero según la reivindicación 1 o la reivindicación 2; y
recuperar a partir del medio de cultivo la proteína recombinante producida y secretada de este modo.
12. El método según la reivindicación 11, en el que el material genético que codifica para la expresión de dicha proteína recombinante está integrado en el ADN de la célula hospedadora.
13. El método según la reivindicación 11, en el que dicha célula hospedadora de mamífero se transforma adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.
14. Un método para mejorar el rendimiento de proteína bikunina recombinante, en el que el material genético que codifica para la expresión de dicha proteína recombinante se ha introducido previamente en la línea celular para formar la primera línea celular, comprendiendo dicho método las etapas de:
insertar al menos un vector de expresión de proteína chaperona que comprende ADN que codifica la proteína chaperona Erp57 en dicha primera línea celular para formar de este modo una línea celular modificada; y
seleccionar a partir de dicha línea celular modificada al menos una segunda línea celular que muestra un mayor rendimiento de la proteína recombinante.

15. Un método para mejorar el rendimiento de proteína del Factor VIII recombinante, en donde el material genético que codifica para la expresión de dicha proteína recombinante se ha introducido previamente en una línea celular BHK para formar una primera línea celular, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5 insertar al menos un vector de expresión de la proteína chaperona que comprende ADN que codifica la proteína chaperona Erp57 y ADN que codifica la proteína chaperona CRT en dicha primera línea celular de modo que se forma una línea celular modificada; y
- seleccionar a partir de dicha línea celular modificada al menos una segunda línea celular que muestra un mayor rendimiento de la proteína recombinante.
- 10 16. El método según la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en el que el material genético que codifica para la expresión de dicha proteína recombinante está integrado en el ADN de la primera línea celular.
17. El método según la reivindicación 16, en el que la segunda línea celular se transfecta adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.
- 15 18. El método según la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en el que se produce al menos una segunda línea celular a partir de dicha primera línea celular mediante la selección de una porción de dicha primera línea celular que muestra la integración del vector de expresión de la proteína chaperona en el ADN del hospedador.

CNX: cebador 5': ATGAATTCCGGGAGGCTAGAGATCATGG
 cebador 3': ATTCTAGATGCAGGGGAGGAGGGAGAAG
CRT: cebador 5': ATGAATTC^{CCG}CCATGCTGCTATCCGTG
 cebador 3': ATTCTAGACTGGAGGCAGGCCTCTCTAC
Erp57: cebador 5': ATGAATTCCTCCGCAGTCCCAGCCGAGC
 cebador 3': ATTCTAGACTCTCGGCCCTGAGAGGTAA

FIG. 1

M E G K W L

1 GAATTCCGGG AGGCTAGAGA TCATGGAAGG GAAGTGGTTG
 L C M L L V L G T A I V E A .

41 CTGTGTATGT TACTGGTGCT TGGAAGTGGT ATTGTTGAGG
 . H D G H D D D V I D I E D .

81 CTCATGATGG ACATGATGAT GATGTGATTG ATATTGAGGA
 . D L D D V I E E V E D S K

121 TGACCTTGAC GATGTCATTG AAGAGGTAGA AGACTCAAAA
 P D T T A P P S S P K V T Y .

161 CCAGATACCA CTGCTCCTCC TTCATCTCCC AAGGTTACTT
 . K A P V P T G E V Y F A D .

201 ACAAAGCTCC AGTTCCAACA GGGGAAGTAT ATTTTGCTGA
 . S F D R G T L S G W I L S

241 TTCTTTTGAC AGAGGAACTC TGTCAGGGTG GATTTTATCC
 K A K K D D T D D E I A K Y .

281 AAAGCCAAGA AAGACGATAC CGATGATGAA ATTGCCAAAT
 . D G K W E V E E M K E S K .

321 ATGATGGAAA GTGGGAGGTA GAGGAAATGA AGGAGTCAAA
 . L P G D K G L V L M S R A

361 GCTTCCAGGT GATAAAGGAC TTGTGTTGAT GTCTCGGGCC
 K H H A I S A K L N K P F L .

401 AAGCATCATG CCATCTCTGC TAAACTGAAC AAGCCCTTCC
 . F D T K P L I V Q Y E V N .

441 TGTTTGACAC CAAGCCTCTC ATTGTTTCAGT ATGAGGTTAA
 . F Q N G I E C G G A Y V K

481 TTTCCAAAAT GGAATAGAAT GTGGTGGTGC CTATGTGAAA
 L L S K T P E L N L D Q F H .

521 CTGCTTTCTA AAACACCAGA ACTCAACCTG GATCAGTTCC
 . D K T P Y T I M F G P D K .

561 ATGACAAGAC CCCTTATACG ATTATGTTTG GTCCAGATAA
 . C G E D Y K L H F I F R H

601 ATGTGGAGAG GACTATAAAC TGCACTTCAT CTTCCGACAC
 K N P K T G I Y E E K H A K .

641 AAAAACCCCA AAACGGGTAT CTATGAAGAA AAACATGCTA
 . R P D A D L K T Y F T D K .

681 AGAGGCCAGA TGCAGATCTG AAGACCTATT TTACTGATAA
 . K T H L Y T L I L N P D N

FIG. 2A

```

721 GAAAACACAT CTTTACACAC TAATCTTGAA TCCAGATAAT
    S F E I L V D Q S V V N S G .
761 AGTTTTGAAA TACTGGTTGA CCAATCTGTG GTGAATAGTG
    . N L L N D M T P P V N P S .
801 GAAATCTGCT CAATGACATG ACTCCTCCTG TAAATCCTTC
    . R E I E D P E D R K P E D
841 ACGTGAAATT GAGGACCCAG AAGACCGGAA GCCCGAGGAT
    W D E R P K I P D P E A V K .
881 TGGGATGAAA GACCAAAAAT CCCAGATCCA GAAGCTGTCA
    . P D D W D E D A P A K I P .
921 AGCCAGATGA CTGGGATGAA GATGCCCTG CTAAGATTCC
    . D E E A T K P E G W L D D
961 AGATGAAGAG GCCACAAAAC CCGAAGGCTG GTTAGATGAT
    E P E Y V P D P D A E K P E .
1001 GAGCCTGAGT ACGTACCTGA TCCAGACGCA GAGAAACCTG
    . D W D E D M D G E W E A P .
1041 AGGATTGGGA TGAAGACATG GATGGAGAAT GGGAGGCTCC
    . Q I A N P R C E S A P G C
1081 TCAGATTGCC AACCTAGAT GTGAGTCAGC TCCTGGATGT
    G V W Q R P V I D N P N Y K .
1121 GGTGTCTGGC AGCGACCTGT GATTGACAAC CCCAATTATA
    . G K W K P P M I D N P S Y .
1161 AAGGCAAATG GAAGCCTCCT ATGATTGACA ATCCCAGTTA
    . Q G I W K P R K I P N P D
1201 CCAGGGAATC TGGAAACCCA GGAAAATACC AAATCCAGAT
    F F E D L E P F R M T P F S .
1241 TTCTTTGAAG ATCTGGAACC TTTCAGAATG ACTCCTTTTA
    . A I G L E L W S M T S D I .
1281 GTGCTATTGG TTTGGAGCTG TGGTCCATGA CCTCTGACAT
    . F F D N F I I C A D R R I
1321 TTTTTTTGAC AACTTTATCA TTTGTGCTGA TCGAAGAATA
    V D D W A N D G W G L K K A .
1361 GTTGATGATT GGGCCAATGA TGGATGGGGC CTGAAGAAAG
    . A D G A A E P G V V G Q M .
1401 CTGCTGATGG GGCTGCTGAG CCAGGCGTTG TGGGGCAGAT
    . I E A A E E R P W L W V V
1441 GATCGAGGCA GCTGAAGAGC GCCCGTGGCT GTGGGTAGTC
    Y I L T V A L P V F L V I L .
1481 TATATTCTAA CTGTAGCCCT TCCTGTGTTC CTGGTTATCC
    . F C C S G K K Q T S G M E .

```

FIG. 2A (Continuación)

```

1521 TCTTCTGCTG TTCTGGAAAG AAACAGACCA GTGGTATGGA
    · Y K K T D A P Q P D V K E
1561 GTATAAGAAA ACTGATGCAC CTCAACCGGA TGTGAAGGAA
    E E E E K E E E K D K G D E ·
1601 GAGGAAGAAG AGAAGGAAGA GGAAAAGGAC AAGGGAGATG
    · E E E G E E K L E E K Q K ·
1641 AGGAGGAGGA AGGAGAAGAG AAACCTTGAAG AGAAACAGAA
    · S D A E E D G G T V S Q E
1681 AAGTGATGCT GAAGAAGATG GTGGCACTGT CAGTCAAGAG
    E E D R K P K A E E D E I L ·
1721 GAGGAAGACA GAAAACCTAA AGCAGAGGAG GATGAAATTT
    · N R S P R N R K P R R E * ·
1761 TGAACAGATC ACCAAGAAAC AGAAAGCCAC GAAGAGAGTG
    · *
1801 AAACAATCTT AAGAGCTTGA TCTGTGATTT CTTCTCCCTC
1841 CTCCCCTGCA TCTAGA

```

FIG. 2A (Continuación)

M L L S V P L L L G .

1 GAATTCCCGC CATGCTGCTA TCCGTGCCGC TGCTGCTCGG
 · L L G L A V A E P A V Y F

41 CCTCCTCGGC CTGGCCGTCG CCGAGCCTGC CGTCTACTTC
 K E Q F L D G D G W T S R W .

81 AAGGAGCAGT TTCTGGACGG AGACGGGTGG ACTTCCCGCT
 · I E S K H K S D F G K F V .

121 GGATCGAATC CAAACACAAG TCAGATTTTG GCAAATTCGT
 · L S S G K F Y G D E E K D

161 TCTCAGTTCC GGCAAGTTCT ACGGTGACGA GGAGAAAGAT
 K G L Q T S Q D A R F Y A L .

201 AAAGGTTTGC AGACAAGCCA GGATGCACGC TTTTATGCTC
 · S A S F E P F S N K G Q T .

241 TGTCGGCCAG TTTCGAGCCT TTCAGCAACA AAGGCCAGAC
 · L V V Q F T V K H E Q N I

281 GCTGGTGGTG CAGTTCACGG TGAAACATGA GCAGAACATC
 D C G G G Y V K L F P N S L .

321 GACTGTGGGG GCGGCTATGT GAAGCTGTTT CCTAATAGTT
 · D Q T D M H G D S E Y N I .

361 TGGACCAGAC AGACATGCAC GGAGACTCAG AATACAACAT
 · M F G P D I C G P G T K K .

401 CATGTTTGGT CCCGACATCT GTGGCCCTGG CACCAAGAAG
 V H V I F N Y K G K N V L I .

441 GTTCATGTCA TCTTCAACTA CAAGGGCAAG AACGTGCTGA
 · N K D I R C K D D E F T H .

481 TCAACAAGGA CATCCGTTGC AAGGATGATG AGTTTACACA
 · L Y T L I V R P D N T Y E

521 CCTGTACACA CTGATTGTGC GGCCAGACAA CACCTATGAG
 V K I D N S Q V E S G S L E .

561 GTGAAGATTG ACAACAGCCA GGTGGAGTCC GGCTCCTTGG
 · D D W D F L P P K K I K D .

601 AAGACGATTG GGACTTCCTG CCACCCAAGA AGATAAAGGA
 · P D A S K P E D W D E R A

641 TCCTGATGCT TCAAAACCGG AAGACTGGGA TGAGCGGGCC
 K I D D P T D S K P E D W D .

681 AAGATCGATG ATCCCACAGA CTCCAAGCCT GAGGACTGGG
 · K P E H I P D P D A K K P .

721 ACAAGCCCGA GCATATCCCT GACCCTGATG CTAAGAAGCC
 · E D W D E E M D G E W E P

FIG. 2B

```

761 CGAGGACTGG GATGAAGAGA TGGACGGAGA GTGGGAACCC
    P V I Q N P E Y K G E W K P .
801 CCAGTGATTC AGAACCCCTGA GTACAAGGGT GAGTGGAAGC
    . R Q I D N P D Y K G T W I .
841 CCCGGCAGAT CGACAACCCA GATTACAAGG GCACTTGGAT
    . H P E I D N P E Y S P D P
881 CCACCCAGAA ATTGACAACC CCGAGTATTC TCCCGATCCC
    S I Y A Y D N F G V L G L D .
921 AGTATCTATG CCTATGATAA CTTTGGCGTG CTGGGCCTGG
    . L W Q V K S G T I F D N F .
961 ACCTCTGGCA GGTCAAGTCT GGCACCATCT TTGACAACTT
    . L I T N D E A Y A E E F G
1001 CCTCATCACC AACGATGAGG CATACGCTGA GGAGTTTGGC
    N E T W G V T K A A E K Q M .
1041 AACGAGACGT GGGGCGTAAC AAAGGCAGCA GAGAAACAAA
    . K D K Q D E E Q R L K E E .
1081 TGAAGGACAA ACAGGACGAG GAGCAGAGGC TTAAGGAGGA
    . E E D K K R K E E E E A E
1121 GGAAGAAGAC AAGAAACGCA AAGAGGAGGA GGAGGCAGAG
    D K E D D E D K D E D E E D .
1161 GACAAGGAGG ATGATGAGGA CAAAGATGAG GATGAGGAGG
    . E E D K E E D E E E D V P .
1201 ATGAGGAGGA CAAGGAGGAA GATGAGGAGG AAGATGTCCC
    . G Q A K D E L *
1241 CGGCCAGGCC AAGGACGAGC TGTAGAGAGG CCTGCCTCCA
1281 GTCTAGA

```

FIG. 2B(Continuación)

```

1      GAATTCCTCC GCAGTCCCAG CCGAGCCGCG ACCCTTCCGG
                                     M R L R R L .
41 CCGTCCCCAC CCCACCTCGC CGCCATGCGC CTCCGCCGCC
   . A L F P G V A L L L A A A .
81 TAGCGCTGTT CCCGGGTGTG GCGCTGCTTC TTGCCGCGGC
   . R L A A A S D V L E L T D
121 CCGCCTCGCC GCTGCCTCCG ACGTGCTAGA ACTCACGGAC
   D N F E S R I S D T G S A G .
161 GACAACTTCG AGAGTCGCAT CTCCGACACG GGCTCTGCGG
   . L M L V E F F A P W C G H .
201 GCCTCATGCT CGTCGAGTTC TTCGCTCCCT GGTGTGGACA
   . C K R L A P E Y E A A A T
241 CTGCAAGAGA CTTGCACCTG AGTATGAAGC TGCAGCTACC
   R L K G I V P L A K V D C T .
281 AGATTAAAAG GAATAGTCCC ATTAGCAAAG GTTGATTGCA
   . A N T N T C N K Y G V S G .
321 CTGCCAACAC TAACACCTGT AATAAATATG GAGTCAGTGG
   . Y P T L K I F R D G E E A
361 ATATCCAACC CTGAAGATAT TTAGAGATGG TGAAGAAGCA
   G A Y D G P R T A D G I V S .
401 GGTGCTTATG ATGGACCTAG GACTGCTGAT GGAATTGTCA .
   . H L K K Q A G P A S V P L .
441 GCCACTTGAA GAAGCAGGCA GGACCAGCTT CAGTGCCTCT
   . R T E E E F K K F I S D K
481 CAGGACTGAG GAAGAATTTA AGAAATTCAT TAGTGATAAA
   D A S I V G F F D D S F S E .
521 GATGCCTCTA TAGTAGGTTT TTTCGATGAT TCATTCAAGT
   . A H S E F L K A A S N L R .
561 AGGCTCACTC CGAGTTCCTA AAAGCAGCCA GCAACTTGAG
   . D N Y R F A H T N V E S L
601 GGATAACTAC CGATTGTCAC ATACGAATGT TGAGTCTCTG
   V N E Y D D N G E G I I L F .
641 GTGAACGAGT ATGATGATAA TGGAGAGGGT ATCATCTTAT
   . R P S H L T N K F E D K T .
681 TTCGTCCTTC ACATCTCACT AACAAGTTTG AGGACAAGAC
   . V A Y T E Q K M T S G K I
721 TGTGGCATAT ACAGAGCAAA AAATGACCAG TGGCAAAATT
   K K F I Q E N I F G I C P H .
761 AAAAAGTTTA TCCAGGAAAA CATTTTGGT ATCTGCCCTC
   . M T E D N K D L I Q G K D .

```

FIG. 2C

```

801 ACATGACAGA AGACAATAAA GATTTGATAC AGGGCAAGGA
    · L L I   A Y Y D   V D Y   E K N
841 CTTACTTATT GCTTACTATG ATGTGGACTA TGAAAAGAAC
    · A K G S   N Y W   R N R   V M M V ·
881 GCTAAAGGTT CCAACTACTG GAGAAACAGG GTAATGATGG
    · A K K   F L D   A G H K   L N F ·
921 TGGCAAAGAA ATTCCTGGAT GCTGGGCACA AACTCAACTT
    · A V A   S R K T   F S H   E L S
961 TGCTGTAGCT AGCCGCAAAA CCTTTAGCCA TGAACTTTCT
    · D F G L   E S T   A G E   I P V V ·
1001 GATTTTGGCT TGGAGAGCAC TGCTGGAGAG ATTCCTGTTG
    · A I R   T A K   G E K F   V M Q ·
1041 TTGCTATCAG AACTGCTAAA GGAGAGAAGT TTGTCATGCA
    · E E F   S R D G   K A L   E R F
1081 GGAGGAGTTC TCGCGTGATG GGAAGGCTCT GGAGAGGTTC
    · L Q D Y   F D G   N L K   R Y L K ·
1121 CTGCAGGATT ACTTTGATGG CAATCTGAAG AGATACCTGA
    · S E P   I P E   S N D G   P V K ·
1161 AGTCTGAACC TATCCCAGAG AGCAATGATG GGCCTGTGAA
    · V V V   A E N F   D E I   V N N
1201 GGTAGTGGTA GCAGAGAATT TTGATGAAAT AGTGAATAAT
    · E N K D   V L I   E F Y   A P W C ·
1241 GAAAATAAAG ATGTGCTGAT TGAATTTTAT GCCCCTTGGT
    · G H C   K N L   E P K Y   K E L ·
1281 GTGGTCATTG TAAGAACCTG GAGCCCAAGT ATAAAGAACT
    · G E K   L S K D   P N I   V I A
1321 TGGCGAGAAG CTCAGCAAAG ACCCAAATAT CGTCATAGCC
    · K M D A   T A N   D V P   S P Y E ·
1361 AAGATGGATG CCACAGCCAA TGATGTGCCT TCTCCATATG
    · V R G   F P T   I Y F S   P A N ·
1401 AAGTCAGAGG TTTTCCTACC ATATACTTCT CTCCAGCCAA
    · K K L   N P K K   Y E G   G R E
1441 CAAGAAGCTA AATCCAAAGA AATATGAAGG TGGCCGTGAA
    · L S D F   I S Y   L Q R   E A T N ·
1481 TTAAGTGATT TTATTAGCTA TCTACAAAGA GAAGCTACAA
    · P P V   I Q E   E K P K   K K K ·

```

FIG. 2C (Continuación)

```

1521 ACCCCCCTGT AATTCAAGAA GAAAAACCCA AGAAGAAGAA
      · K A Q E D L *
1561 GAAGGCACAG GAGGATCTCT AAAGCAGTAG CCAAACACCA
1601 CTTTGTAATA GGACTCTTCC ATCAGAGATG GGAAAACCAT
1641 TGGGGAGGAC TAGGACCCAT ATGGGAATTA TTACCTCTCA
1681 GGGCCGAGAG TCTAGA

```

FIG. 2C (Continuación)

```

      M A K A A A I G I D L G T T Y S C
1  ATGGCCAAAG CCGCGGCGAT CGGCATCGAC CTGGGCACCA CCTACTCCTG
   · V G V F Q H G K V E I I A N D Q G
51 CGTGGGGGTG TTCCAACACG GCAAGGTGGA GATCATCGCC AACGACCAGG
   · N R T T P S Y V A F T D T E R L
101 GCAACCGCAC CACCCCAGC TACGTGGCCT TCACGGACAC CGAGCGGCTC
   I G D A A K N Q V A L N P Q N T V ·
151 ATCGGGGATG CGGCCAAGAA CCAGGTGGCG CTGAACCCGC AGAACACCGT
   · F D A K R L I G R K F G D P V V Q
201 GTTTGACGCG AAGCGGCTGA TCGGCCGCAA GTTCGGCGAC CCGGTGGTGC
   · S D M K H W P F Q V I N D G D K
251 AGTCGGACAT GAAGCACTGG CCTTTCCAGG TGATCAACGA CGGAGACAAG
   P K V Q V S Y K G E T K A F Y P E ·
301 CCCAAGGTGC AGGTGAGCTA CAAGGGGGAG ACCAAGGCAT TCTACCCCGA
   · E I S S M V L T K M K E I A E A Y
351 GGAGATCTCG TCCATGGTGC TGACCAAGAT GAAGGAGATC GCCGAGGCGT
   · L G Y P V T N A V I T V P A Y F
401 ACCTGGGCTA CCCGGTGACC AACGCGGTGA TCACCGTGCC GGCCTACTTC
   N D S Q R Q A T K D A G V I A G L ·
451 AACGACTCGC AGCGCCAGGC CACCAAGGAT GCGGGTGTGA TCGCGGGGCT
   · N V L R I I N E P T A A A I A Y G
501 CAACGTGCTG CGGATCATCA ACGAGCCAC GGCCGCCGCC ATCGCCTACG
   · L D R T G K G E R N V L I F D L
551 GCCTGGACAG AACGGGCAAG GGGGAGCGCA ACGTGCTCAT CTTTGACCTG
   G G G T F D V S I L T I D D G I F ·
601 GGCGGGGGCA CCTTCGACGT GTCCATCCTG ACGATCGACG ACGGCATCTT
   · E V K A T A G D T H L G G E D F D
651 CGAGGTGAAG GCCACGGCCG GGGACACCCA CCTGGGTGGG GAGGACTTTG
   · N R L V N H F V E E F K R K H K
701 ACAACAGGCT GGTGAACCAC TTCGTGGAGG AGTTCAAGAG AAAACACAAG
   K D I S Q N K R A V R R L R T A C ·
751 AAGGACATCA GCCAGAACAA GCGAGCCGTG AGGCGGCTGC GCACCGCCTG
   · E R A K R T L S S S T Q A S L E I
801 CGAGAGGGCC AAGAGGACCC TGTCGTCCAG CACCCAGGCC AGCCTGGAGA
   · D S L F E G I D F Y T S I T R A
851 TCGACTCCCT GTTTGAGGGC ATCGACTTCT ACACGTCCAT CACCAGGGCG
   R F E E L C S D L F R S T L E P V ·
901 AGGTTCGAGG AGCTGTGCTC CGACCTGTTC CGAAGCACCC TGGAGCCCCG
   · E K A L R D A K L D K A Q I H D L
951 GGAGAAGGCT CTGCGCGACG CCAAGCTGGA CAAGGCCAG ATTACGACC
   · V L V G G S T R I P K V Q K L L
1001 TGGTCCTGGT CGGGGGCTCC ACCCGCATCC CCAAGGTGCA GAAGCTGCTG
   Q D F F N G R D L N K S I N P D E ·
1051 CAGGACTTCT TCAACGGGCG CGACCTGAAC AAGAGCATCA ACCCCGACGA
   · A V A Y G A A V Q A A I L M G D K
1101 GGCTGTGGCC TACGGGGCGG CGGTGCAGGC GGCCATCCTG ATGGGGGACA
   · S E N V Q D L L L L D V A P L S
1151 AGTCCGAGAA CGTGCAGGAC CTGCTGCTGC TGGACGTGGC TCCCCTGTCTG

```

FIG. 2D

```

      L G L E T A G G V M T A L I K R N .
1201 CTGGGGCTGG AGACGGCCGG AGGCGTGATG ACTGCCCTGA TCAAGCGCAA
      . S T I P T K Q T Q I F T T Y S D N .
1251 CTCCACCATC CCCACCAAGC AGACGCAGAT CTTACCACC TACTCCGACA
      . Q P G V L I Q V Y E G E R A M T
1301 ACCAACCCGG GGTGCTGATC CAGGTGTACG AGGGCGAGAG GGCCATGACG
      K D N N L L G R F E L S G I P P A .
1351 AAAGACAACA ATCTGTTGGG GCGCTTCGAG CTGAGCGGCA TCCCTCCGGC
      . P R G V P Q I E V T F D I D A N G .
1401 CCCCAGGGGC GTGCCCCAGA TCGAGGTGAC CTTTCGACATC GATGCCAACG
      . I L N V T A T D K S T G K A N K
1451 GCATCCTGAA CGTCACGGCC ACGGACAAGA GCACCGCAA GGCCAACAAG
      I T I T N D K G R L S K E E I E R .
1501 ATCACCATCA CCAACGACAA GGGCCGCCTG AGCAAGGAGG AGATCGAGCG
      . M V Q E A E K Y K A E D E V Q R E .
1551 CATGGTGCAG GAGGCGGAGA AGTACAAAGC GGAGGACGAG GTGCAGCGCG
      . R V S A K N A L E S Y A F N M K
1601 AGAGGGTGTC AGCCAAGAAC GCCCTGGAGT CCTACGCCTT CAACATGAAG
      S A V E D E G L K G K I S E A D K .
1651 AGCCCGGTGG AGGATGAGGG GCTCAAGGGC AAGATCAGCG AGGCCGACAA
      . K K V L D K C Q E V I S W L D A N .
1701 GAAGAAGGTG CTGGACAAGT GTCAAGAGGT CATCTCGTGG CTGGACGCCA
      . T L A E K D E F E H K R K E L E
1751 ACACCTTGGC CGAGAAGGAC GAGTTTGAGC ACAAGAGGAA GGAGCTGGAG
      Q V C N P I I S G L Y Q G A G G P .
1801 CAGGTGTGTA ACCCATCAT CAGCGGACTG TACCAGGGTG CCGGTGGTCC
      . G P G G F G A Q G P K G G S G S G .
1851 CGGGCCTGGG GGCTTCGGGG CTCAGGGTCC CAAGGGAGGG TCTGGGTCAG
      . P T I E E V D *
1901 GCCCCACCAT TGAGGAGGTA GATTAG

```

FIG. 2D (Continuación)

M G K D Y Y Q T L G L A R G A S D .
 1 ATGGGTAAAG ACTACTACCA GACGTTGGGC CTGGCCCGCG GCGCGTCGGA
 · E E I K R A Y R R Q A L R Y H P D ·
 51 CGAGGAGATC AAGCGGGCCT ACCGCCGCCA GGCGCTGCGC TACCACCCGG
 · K N K E P G A E E K F K E I A E
 101 ACAAGAACAA GGAGCCCGGC GCCGAGGAGA AGTTCAAGGA GATCGCTGAG
 A Y D V L S D P R K R E I F D R Y ·
 151 GCCTACGACG TGCTCAGCGA CCCGCGCAAG CGCGAGATCT TCGACCGCTA
 · G E E G L K G S G P S G G S G G G ·
 201 CGGGGAGGAA GGCTTAAAGG GGAGTGGCCC CAGTGGCGGT AGCGGCGGTG
 · A N G T S F S Y T F H G D P H A
 251 GTGCCAATGG TACCTCTTTC AGCTACACAT TCCATGGAGA CCCTCATGCC
 M F A E F F G G R N P F D T F F G ·
 301 ATGTTTGCTG AGTTCTTCGG TGGCAGAAAT CCCTTTGACA CCTTTTTTTGG
 · Q R N G E E G M D I D D P F S G F ·
 351 GCAGCGGAAC GGGGAGGAAG GCATGGACAT TGATGACCCA TTCTCTGGCT
 · P M G M G G F T N V N F G R S R
 401 TCCCTATGGG CATGGGTGGC TTCACCAACG TGAACTTTGG CCGCTCCCGC
 S A Q E P A R K K Q D P P V T H D ·
 451 TCTGCCCAAG AGCCCGCCCG AAAGAAGCAA GATCCCCCAG TCACCCACGA
 · L R V S L E E I Y S G C T K K M K ·
 501 CCTTCGAGTC TCCCTTGAAG AGATCTACAG CGGCTGTACC AAGAAGATGA
 · I S H K R L N P D G K S I R N E
 551 AAATCTCCCA CAAGCGGCTA AACCCCGACG GAAAGAGCAT TCGAAACGAA
 D K I L T I E V K K G W K E G T K ·
 601 GACAAAATAT TGACCATCGA AGTGAAGAAG GGGTGGAAAG AAGGAACCAA
 · I T F P K E G D Q T S N N I P A D ·
 651 AATCACTTTC CCAAGGAAG GAGACCAGAC CTCCAACAAC ATTCCAGCTG
 · I V F V L K D K P H N I F K R D
 701 ATATCGTCTT TGTTTTAAAG GACAAGCCCC ACAATATCTT TAAGAGAGAT

FIG. 2E

```

      G S D V I Y P A R I S L R E A L C .
751 GGCTCTGATG TCATTTATCC TGCCAGGATC AGCCTCCGGG AGGCTCTGTG
      . G C T V N V P T L D G R T I P V V .
801 TGGCTGCACA GTGAACGTCC CCACTCTGGA CGGCAGGACG ATACCCGTCG
      . F K D V I R P G M R R K V P G E
851 TATTCAAAGA TGTTATCAGG CCTGGCATGC GGCGAAAAGT TCCTGGAGAA
      G L P L P K T P E K R G D L I I E .
901 GGCCTCCCCC TCCCCAAAAC ACCCGAGAAA CGTGGGGACC TCATTATTGA
      . F E V I F P E R I P Q T S R T V L .
951 GTTTGAAGTG ATCTTCCCCG AAAGGATTCC CCAGACATCA AGAACCGTAC
      . E Q V L P I *
1001      TTGAGCAGGT TCTTCCAATA TAG

```

FIG. 2E (Continuación)

M T T S A S S H L N K G I K Q V Y .
 1 ATGACCACCT CAGCAAGTTC CCACTTAAAT AAAGGCATCA AGCAGGTGTA
 . M S L P Q G E K V Q A M Y I W I D .
 51 CATGTCCCTG CCTCAGGGTG AGAAAGTCCA GGCCATGTAT ATCTGGATCG
 . G T G E G L R C K T R T L D S E
 101 ATGGTACTGG AGAAGGACTG CGCTGCAAGA CCCGGACCCT GGACAGTGAG
 P K C V E E L P E W N F D G S S T .
 151 CCCAAGTGTG TGGAAGAGTT GCCTGAGTGG AATTTTCGATG GCTCCAGTAC
 . L Q S E G S N S D M Y L V P A A M .
 201 TTTACAGTCT GAGGGTTCCA ACAGTGACAT GTATCTCGTG CCTGCTGCCA
 . F R D P F R K D P N K L V L C E
 251 TGTTCGGGA CCCCTTCCGT AAGGACCCTA ACAAGCTGGT GTTATGTGAA
 V F K Y N R R P A E T N L R H T C .
 301 GTTTTCAAGT ACAATCGAAG GCCTGCAGAG ACCAATTGTA GGCACACCTG.
 . K R I M D M V S N Q H P W F G M E .
 351 TAAACGGATA ATGGACATGG TGAGCAACCA GCACCCCTGG TTTGGCATGG
 . Q E Y T L M G T D G H P F G W P
 401 AGCAGGAGTA TACCCTCATG GGGACAGATG GGCACCCCTT TGGTTGGCCT
 S N G F P G P Q G P Y Y C G V G A .
 451 TCCAACGGCT TCCCAGGGCC CCAGGGTCCA TATTACTGTG GTGTGGGAGC
 . D R A Y G R D I V E A H Y R A C L .
 501 AGACAGAGCC TATGGCAGGG ACATCGTGGA GGCCCATAC CGGGCCTGCT
 . Y A G V K I A G T N A E V M P A
 551 TGTATGCTGG AGTCAAGATT GCGGGGACTA ATGCCGAGGT CATGCCTGCC
 Q W E F Q I G P C E G I S M G D H .
 601 CAGTGGGAAT TTCAGATTGG ACCTTGTGAA GGAATCAGCA TGGGAGATCA
 . L W V A R F I L H R V C E D F G V .
 651 TCTCTGGGTG GCCCGTTTCA TCTTGCATCG TGTGTGTGAA GACTTTGGAG
 . I A T F D P K P I P G N W N G A
 701 TGATAGCAAC CTTTGATCCT AAGCCCATTC CTGGGAAGTG GAATGGTGCA

FIG. 2F

G C H T N F S T K A M R E E N G L .
 751 GGCTGCCATA CCAACTTCAG CACCAAGGCC ATGCGGGAGG AGAATGGTCT
 . K Y I E E A I E K L S K R H Q Y H .
 801 GAAGTACATC GAGGAGGCCA TTGAGAAACT AAGCAAGCGG CACCAGTACC
 . I R A Y D P K G G L D N A R R L
 851 ACATCCGTGC CTATGATCCC AAGGGAGGCC TGGACAATGC CCGACGTCTA
 T G F H E T S N I N D F S A G V A .
 901 ACTGGATTCC ATGAAACCTC CAACATCAAC GACTTTTCTG CTGGTGTAGC
 . N R S A S I R I P R T V G Q E K K .
 951 CAATCGTAGC GCCAGCATAC GCATTCCCCG GACTGTTGGC CAGGAGAAGA
 . G Y F E D R R P S A N C D P F S
 1001 AGGGTTACTT TGAAGATCGT CGCCCCTCTG CCAACTGCGA CCCCTTTTCG
 V T E A L I R T C L L N E T G D E .
 1051 GTGACAGAAG CCCTCATCCG CACGTGTCTT CTCAATGAAA CCGGCGATGA
 . P F Q Y K N *
 1101 GCCCTTCCAG TACAAAAATT AA

FIG. 2F (Continuación)

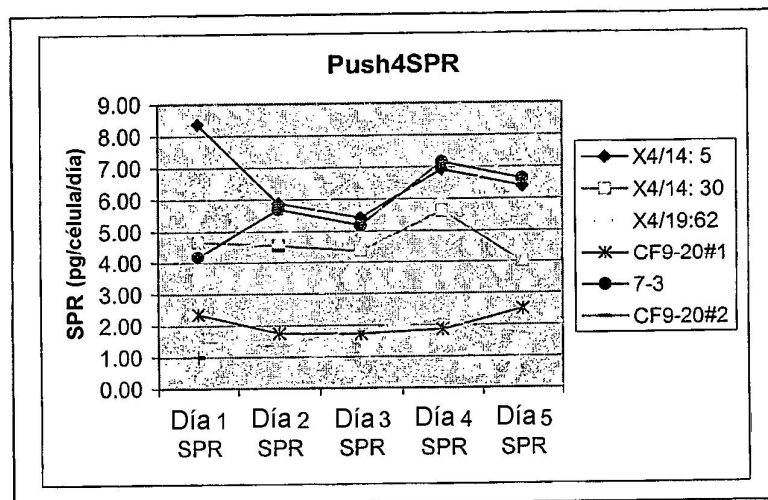


FIG. 3

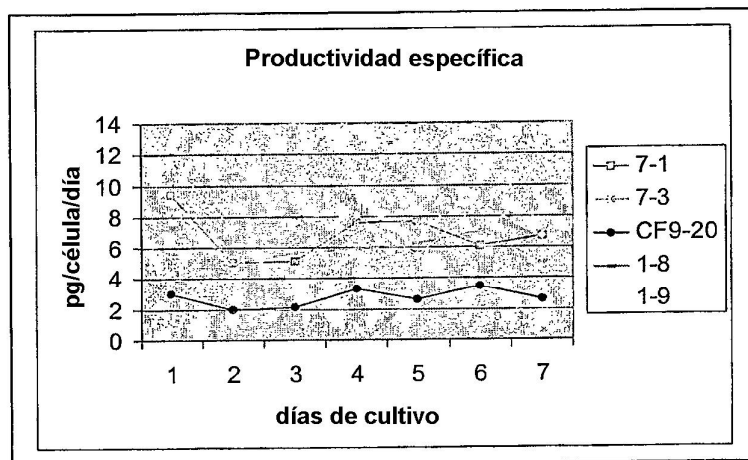


FIG. 4

ADRERSIHDF	CLVSKVVGRC	RASMPRWWYN	30
VTDGSCQLFV	YGGCDGNSNN	YLTKEECLKK	60
CATVTENATG	DLATSRNAAD	SSVPSAPRRQ	90
DSEDHSSDMF	NYEEYCTANA	VTGPCRASFP	120
RWYFDVERNS	CNNFIYGGCR	GNKNSYRSEE	150
ACMLRCFRQQ	ENPPLPLGSK		170

FIG. 5