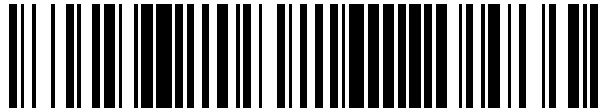


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 027**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2007 E 07725230 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2027273**

54 Título: **Células productoras de polipéptido**

30 Prioridad:

17.05.2006 EP 06010146

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

03.06.2016

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE, 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**ENDL, JOSEF;
KOPETZKI, ERHARD;
PLOETTNER, OLIVER;
SCHWARZ, URSULA y
TIEFENTHALER, GEORG**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 573 027 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células productoras de polipéptido

5 La presente invención se refiere al campo de la producción de polipéptidos. Describe un ácido nucleico que comprende un ácido nucleico alternativamente procesable, células que comprenden dicho ácido nucleico, un método de aislamiento de células que expresan un polipéptido heterólogo, que utiliza un ácido nucleico que comprende un primer ácido nucleico codificante de un polipéptido heterólogo, un segundo ácido nucleico que comprende un ácido nucleico alternativamente procesable, y un tercer ácido nucleico codificante de por lo menos un fragmento de un dominio transmembrana o un péptido de señal para un anclaje GPI, y además un método para la producción de polipéptidos heterólogos.

Antecedentes de la invención

15 Los sistemas de expresión para la producción de polipéptidos recombinantes son bien conocidos del estado de la técnica y se describen en, por ejemplo, Marino M.H., Biopharm. 2:18-33, 1989; Goeddel D.V. et al., Methods Enzymol. 185:3-7, 1990; Wurm F. y Bernard A., Curr. Opin. Biotechnol. 10:156-160, 1999. Para la producción de polipéptidos y proteínas utilizados en aplicaciones farmacéuticas, preferentemente se utilizan células huésped de mamífero, tales como células CHO, células BHK, células NS0, células Sp2/0, células COS, células HEK, células PER.C6@ y similares. El ácido nucleico codificante del polipéptido preferentemente se introduce en la célula huésped comprendida en un ácido nucleico, tal como, por ejemplo, un vector de expresión. Los elementos esenciales de un vector de expresión son una unidad de propagación plasmídica procariótica, por ejemplo *Escherichia coli* que comprende un origen de replicación y un marcador de selección, un marcador de selección eucariótico y uno o más casetes de expresión para la expresión del gen o genes estructurales de interés, comprendiendo cada uno un promotor, un gen estructural y un terminador de transcripción, incluyendo una señal de poliadenilación. Para la expresión transitoria en células de mamífero puede incluirse un origen de replicación de mamífero, tal como el Ori de SV40 o el OriP del VEB. Como promotor puede seleccionarse un promotor constitutivo o inducible. Para la transcripción optimizada puede incluirse una secuencia de Kozak en la región 5' no traducida. Para el procesamiento del ARNm, en particular pueden incluirse señales de terminación de transcripción y de procesamiento pre-ARNm y de procesamiento de ARNm, según la organización del gen estructural (organización exón-intrón), así como una señal de poliadenilación.

La expresión de un gen se lleva a cabo en forma de expresión transitoria o permanente. El polipéptido o polipéptidos de interés pueden ser un polipéptido secretado, que contiene una extensión N-terminal (también conocida como la secuencia de señal), que resulta necesaria para el transporte/secreción del polipéptido a través de la célula y hacia el medio extracelular, o puede ser un polipéptido citosólico.

Para la producción a gran escala de un polipéptido, debe establecerse una línea celular de alta producción. Tras la transfección de una línea celular huésped, tal como células CHO, células NS0, células Sp2/0, células BHK, células COS, células PER.C6@ o células HEK, en general se obtiene una pluralidad de clones con diferentes características debido a, por ejemplo, las grandes diferencias entre los polipéptidos expresados a partir de plásmidos transitoriamente transfectados o de plásmidos establemente integrados. Para los fines de selección, el ácido nucleico introducido en las células presenta adicionalmente un marcador seleccionable, por ejemplo un gen que confiere resistencia frente a una sustancia de otro modo letal.

Tras la transfección y mediante el crecimiento en un medio de selección apropiado, debe aislarse un clon de producción elevada. Resulta laborioso y en consecuencia caro. Se han desarrollado varios métodos para resolver este problema.

50 Uno de estos métodos es la amplificación génica. En ella, las células deficientes en enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) se transfectan con un vector/plásmido que contiene un primer casete de expresión para la expresión de la proteína DHFR y un segundo casete de expresión para la expresión de un polipéptido heterólogo de interés. Mediante la utilización de un medio de cultivo empobrecido en glicina, hipoxantina y timidina, se establecen condiciones de crecimiento selectivas. Para la amplificación se añade un inhibidor de DHFR, el metotrexato (MTX) (Kaufman R.J. et al., J. Mol. Biol. 159:601-621, 1982; patente US nº 4.656.134).

Alternativamente pueden fusionarse moléculas informadoras, tales como la cloranfenicol-acetil-transferasa, la luciferasa, la proteína fluorescente verde o la beta-galactosidasa, con el polipéptido heterólogo para el que se desea una línea celular de alta producción y utilizarse como marcador de selección indirecto. La selección tiene lugar en presencia de un sustrato exógeno o cofactor añadido.

Un método adicional para la identificación de un clon de alta producción es la transcripción ligada de un gen marcador seleccionable y un gen estructural codificante de un polipéptido heterólogo mediante un sitio interno de entrada ribosómica (SIER). Con este diseño, la expresión del polipéptido heterólogo puede correlacionarse con la expresión del marcador seleccionable.

Las inmunoglobulinas humanas son producidas por linfocitos especializados, las células B. Estas células no sólo secretan inmunoglobulinas (Ig_s), sino que también presentan inmunoglobulinas sobre sus membranas celulares externas en forma de inmunoglobulinas unidas a la membrana plasmática (Ig_m). Estas Ig_m desempeñan un papel importante en el inicio de una respuesta inmunológica. Las inmunoglobulinas unidas a membrana plasmática presentadas presentan la función de receptores celulares de su antígeno correspondiente.

Desde 1980 se han publicado artículos referentes al origen de las formas secretada y unida a membrana plasmática de las inmunoglobulinas. Early et al. (Early, P., et al., Cell 20:313-319, 1980) han informado de que en ratones dos especies de ARNm que codifican la cadena pesada de las inmunoglobulinas se originan en el mismo transcrito primario de un único gen de inmunoglobulina μ . La formación de las formas secretadas (Ig_s) y unidas a membrana plasmática (Ig_m) resultan del procesamiento alternativo del pre-ARNm de cadena pesada. Para la isoforma Ig_s todos los exones codificantes de los dominios de la inmunoglobulina y el intrón posterior al exón codificante del dominio C-terminal se encuentran conservados en el ARNm y la señal de poliadenilación situada después del codón de parada en el intrón se utiliza para el corte y poliadenilación del transcrito primario. Para la isoforma Ig_m un sitio 5' donante alternativo después del exón codificante del dominio C-terminal de la forma secretada (es decir, CH3 o CH4, respectivamente) une la región constante con los exones posteriores M1 y M2 codificantes de un dominio transmembranal. En este caso, la secuencia codificante de los aminoácidos terminales y el codón de parada de la forma secretada, así como la señal de poliadenilación intrónica contigua para la forma Ig_s son eliminados por el procesamiento conjuntamente con el intrón.

Por ejemplo, la proporción entre el ARNm codificante de la forma cadena pesada de inmunoglobulina secretada y el ARNm codificante de la forma cadena pesada de inmunoglobulina unida a membrana plasmática es de entre 10:1 y 100:1. Esta proporción se establece principalmente durante el procesamiento pre-ARNm. Los mecanismos de control traduccional y post-traduccional contribuyen sólo una parte menor (ver, por ejemplo, Xiang S.D. et al., Immun. Cell Biol. 79:472-481, 2001).

La inmunoglobulina unida a la membrana plasmática de la célula presenta la misma secuencia de aminoácidos y estructura secundaria que su análogo secretado. La diferencia es una extensión C-terminal de la cadena pesada de Ig_s que comprende un dominio transmembranal. Este dominio transmembranal presenta en general una longitud de entre aprox. 40 y aprox. 75 residuos aminoácidos. Para las inmunoglobulinas murina y humana, el dominio transmembranal puede subdividirse en tres regiones estructurales diferentes: una región extracelular N-terminal de entre 13 y 67 residuos aminoácidos, un tramo transmembranal conservado central de 25 residuos aminoácidos y una región citoplasmática C-terminal de entre 3 y 28 residuos aminoácidos (Major J.G. et al., Mol. Immunol. 33:179-187, 1996).

Los vectores de expresión que comprenden un gen seleccionable amplificable, un gen proteína fluorescente y un gen codificante de un producto deseado de manera que se optimice el ligamiento transcripcional y traduccional se informan en el documento nº WO 01/04306. En el documento nº WO 01/38557 se informa de un método para cribar células múltiplemente transformadas/transfectadas con el fin de identificar células que expresan por lo menos dos péptidos o proteínas de interés. Estos dos péptidos/proteínas se encuentran unidos mediante un SIER (sitio interno de entrada ribosómica) a un gen de marcador fluorescente.

Los animales y células transgénicos que comprenden un transgén marcador de obtención de imágenes se informan en la solicitud de patente US nº 2003/0033616. En la solicitud de patente US nº 2005/0032127 se informa de un método para la selección no invasiva de células vivas individuales bajo condiciones suaves a partir de mezclas de células o cultivos celulares con respecto a un rendimiento de producción específico mediante métodos de detección de fluorescencia-microscópicos. Un método para identificar y aislar células que producen proteínas secretadas se informa en la solicitud de patente US nº 2002/0168702.

Un vector de expresión que consiste de un gen codificante de una proteína de interés que se encuentra funcionalmente ligado a un promotor de hámster, un gen que codifica para una proteína fluorescente y preferentemente un gen amplificable de marcador de selección se informa en la solicitud de patente US nº 2004/0148647.

Descripción resumida de la invención

En la presente memoria se informa de un ácido nucleico que comprende, en dirección 5' a 3',

- a) un primer ácido nucleico codificante de un polipéptido heterólogo sin codón de parada traduccional en el mismo marco de lectura,
- b) un segundo ácido nucleico desde un sitio 5' donante de procesamiento y terminado en un sitio 3' aceptor de procesamiento que comprende un codón de parada traduccional en el mismo marco de lectura y una señal de poliadenilación, y
- c) un tercer ácido nucleico codificante de:

i) por lo menos un fragmento de un dominio transmembranal, o ii) un péptido de señal para un anclaje GPI.

En la presente memoria se informa de un ácido nucleico que comprende, en dirección 5' a 3',

- 5 - el intensificador y promotor tempranos inmediatos procedentes del citomegalovirus humano (CMV_h),
- una región 5' no traducida sintética que incluye una secuencia de consenso de Kozak,
- una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina que incluye el intrón de secuencia de señal,
- un ADNc de cadena pesada variable de un anticuerpo con especificidad contra una proteína,
10 - un intrón 2 híbrido de cadena pesada de ratón/humano que incluía el intensificador de Ig μ de ratón (región interruptor JH3-JH4) unido con el gen IGHG1 humano que incluía los exones de CH1 a CH3 con todos los intrones intermedios y la parte 5' contigua del intrón 6, que incluía el sitio de poliadenilación para la forma secretada de la inmunoglobulina,
- la parte 3' del intrón 6 y el exón M1 del gen humano IGHG3, y
15 - el exón M2 y la región 3' no traducida que contenía el sitio de poliadenilación para la forma unida a membrana de la inmunoglobulina del gen humano IGHG4.

20 Son aspectos adicionales informados en la presente memoria un vector adecuado para células eucarióticas que comprenden el ácido nucleico de la invención y una célula eucariótica que comprende por lo menos un ácido nucleico según la invención.

En la presente memoria se informa de un método para la producción de un polipéptido codificado por un ácido nucleico según la invención, en el que:

- 25 a) se proporciona una célula eucariótica,
b) se transfecta dicha célula eucariótica con un ácido nucleico según la invención,
c) se cultiva dicha célula transfectada bajo condiciones adecuadas para la expresión de dicho ácido nucleico,
d) recuperar dicho polipéptido a partir del medio de cultivo o del citoplasma de dicha célula.

30 Descripción detallada de la invención

Se describen métodos y técnicas útiles para llevar a cabo la presente invención en, por ejemplo, Ausubel F.M. (ed.), Current Protocols in Molecular Biology, volúmenes I a III, 1997; Glover N.D. y Hames B.D., ed., ADN Cloning: A Practical Approach, volúmenes I y II, 1985, Oxford University Press; Freshney, R.I. (ed.), Animal Cell Culture - a practical approach, IRL Press Limited, 1986; Watson J.D. et al., Recombinant ADN, segunda edición, CHSL Press, 1992; Winnacker E.L., From Genes to Clones, N.Y., VCH Publishers, 1987; Celis J., ed., Cell Biology, segunda edición, Academic Press, 1998; Freshney R.I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, segunda edición, Alan R. Liss, Inc., N.Y., 1987.

40 La utilización de tecnología de ADN recombinante permite la producción de numerosos derivados de un polipéptido. Dichos derivados pueden, por ejemplo, modificarse en una posición aminoácida individual o en varias posiciones aminoácidas, mediante sustitución, alteración, intercambio, delección o inserción. La modificación o derivatización puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante mutagénesis sitio-dirigida. El experto en la materia podrá llevar a cabo fácilmente dichas modificaciones (ver, por ejemplo, Sambrook J. et al., Molecular Cloning: A laboratory manual, 45 1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA; Hames B.D. y Higgins S.G., Nucleic acid hybridization - a practical approach, 1985, IRL Press, Oxford, Inglaterra).

Dentro del alcance de la presente invención algunas de las expresiones utilizadas se definen de la manera siguiente:

50 Un "ácido nucleico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula polinucleótida, por ejemplo a tipos de ADN y/o ARN. Esta molécula polinucleótida puede ser una molécula polinucleótida natural o una molécula polinucleótida sintética o una combinación de una o más moléculas polinucleótidas naturales o fragmentos de las mismas con una o más moléculas polinucleótidas sintéticas. También se encuentran comprendidas en dicha definición las moléculas polinucleótidas naturales en las que se han modificado, por ejemplo mediante mutagénesis, 55 delecionados o añadidos uno o más nucleótidos. El ácido nucleico puede encontrarse aislado o encontrarse integrado en otro ácido nucleico, por ejemplo en un vector de expresión o en el cromosoma de una célula huésped eucariótica. De manera similar, un ácido nucleico se caracteriza porque su secuencia de ácidos nucleicos consiste de nucleótidos individuales. Es conocido de la técnica la deducción de una secuencia de aminoácidos del ácido nucleico codificante correspondiente y de manera similar la derivación de un ácido nucleico correspondiente a partir de la secuencia de aminoácidos codificada. De esta manera, una secuencia de aminoácidos se caracteriza de 60 manera similar mediante su ácido nucleico. De manera similar, un ácido nucleico se caracteriza por una secuencia de aminoácidos correspondiente.

El término "plásmido" o "vector" que se utiliza intercambiamente en la presente solicitud incluye, por ejemplo, 65 plásmidos de lanzadera y de expresión, así como plásmidos de transfección. Típicamente, el plásmido comprende además un origen de replicación (por ejemplo los orígenes de replicación ColE1 y oriP) y un marcador seleccionable

(por ejemplo un gen de resistencia a la ampicilina o a la tetraciclina) para la replicación y selección, respectivamente, del plásmido en bacterias.

5 Un "casete de expresión" se refiere a un constructo que contiene los elementos reguladores necesarios para la expresión de por lo menos el gen estructural contenido en una célula. Opcionalmente se encuentran contenidos elementos adicionales que permiten la secreción del polipéptido o proteína expresado.

10 Un "gen" se refiere a un segmento, por ejemplo en un cromosoma o en un plásmido, que resulta necesario para la expresión de un polipéptido o proteína. Aparte de la región codificante, el gen comprende otros elementos funcionales, incluyendo un promotor, uno o más intrones y/o exones, y uno o más terminadores.

La expresión "gen estructural" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a la región codificante de un gen, es decir los exones, sin una secuencia de señal, aunque con intrones intermedios.

15 Un "marcador seleccionable" se refiere a un gen que permite que las células portadoras del gen sean específicamente seleccionadas o descartadas, en presencia o en ausencia de un agente de selección correspondiente. Un marcador seleccionable positivo útil es un gen de resistencia a antibiótico. Este marcador seleccionable permite que la célula huésped transformada con el gen sea positivamente seleccionada en presencia del antibiótico correspondiente; una célula huésped no transformada no sería capaz de crecer o sobrevivir bajo las
20 condiciones de cultivo selectivo, es decir, en presencia del agente de selección, en un medio selectivo. Los marcadores seleccionables pueden ser positivos, negativos o bifuncionales. Los marcadores seleccionables positivos permiten la selección de las células portadoras del marcador, mientras que los marcadores seleccionables negativos permiten eliminar selectivamente las células portadoras del marcador. Típicamente, un marcador seleccionable conferirá resistencia a un fármaco o compensará un defecto metabólico o catabólico en la célula huésped. Entre los marcadores seleccionables útiles con células eucarióticas se incluyen, por ejemplo, los genes
25 para la aminoglucósido fosfotransferasa (AFT), tales como la higromicina fosfotransferasa (hyg), la neomicina y la G418 AFT, la dihidrofolato reductasa (DHFT), la timidina quinasa (tk), la glutamina sintetasa (GS), la asparagina sintetasa, la triptófano sintetasa (agente selectivo: indol), la histidinol deshidrogenasa (agente selectivo: histidinol D) y los genes codificantes de resistencia a la puromicina, a la bleomicina, a la felomicina, al cloranfenicol, a la zeocina y al ácido micofenólico. Se describen genes marcadores adicionales en los documentos nº WO 92/08796 y nº WO
30 94/28143.

La expresión "elementos reguladores", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a secuencias de nucleótidos presentes en cis y/o trans, necesarias para la transcripción y/o traducción de un gen que comprende el
35 gen estructural de interés. Los elementos reguladores de la transcripción normalmente comprende un promotor situado antes de la secuencia génica que debe expresarse, sitios de inicio y terminación de la transcripción, y una secuencia de señal de poliadenilación. La expresión "sitio de inicio de la transcripción" se refiere al nucleótido en el gen correspondiente al primer ácido nucleico que debe incorporarse en el transcrito primario, es decir, el pre-ARNm; el sitio de inicio transcripcional puede solaparse con la secuencia del promotor. La expresión "sitio de terminación de
40 la transcripción" se refiere a una secuencia de nucleótidos normalmente presente en el extremo 3' de un gen de interés que debe transcribirse, que provoca que la ARN polimerasa termine la transcripción. La secuencia de señal de poliadenilación, o señal de adición de poliA, proporciona la señal para el corte en un sitio específico en el extremo 3' de un ARNm eucariótico y la adición post-transcripcional de una secuencia de aproximadamente 100 a 200 nucleótidos adenina (cola poliA) al extremo 3' cortado en el núcleo. La secuencia de señal de poliadenilación puede
45 incluir la secuencia de consenso AATAAA situada aproximadamente 10 a 30 nucleótidos antes del sitio de corte.

Entre los elementos reguladores de la traducción se incluyen un codón de inicio de traducción (AUG) y un codón de parada (TAA, TAG o TGA). En algunos constructos puede incluirse un sitio interno de entrada ribosómica (SIER).

50 Un "promotor" se refiere a una secuencia polinucleótida que controla la transcripción de una secuencia génica o de ácidos nucleicos con la que se encuentra operablemente ligada. Un promotor incluye señales para la unión de ARN polimerasa y de inicio de transcripción. El promotor utilizado será funcional en el tipo celular de la célula huésped en la que se contempla la expresión de la secuencia seleccionada/operablemente ligada. Se conoce de la técnica un gran número de promotores, incluyendo promotores constitutivos, inducibles y reprimibles de una diversidad de
55 diferentes orígenes (y que se encuentran identificados en bases de datos tales como GenBank) y se encuentran disponibles como polinucleótidos clonados o dentro de los mismos (de, por ejemplo, repositorios tales como la ATCC, así como otras fuentes comerciales o individuales). Un "promotor" comprende una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción de un gen estructural. Típicamente un promotor se encuentra situado en la región 5' no codificante o no traducida de un gen, próximo al sitio de inicio transcripcional de un gen estructural. Los elementos de secuencia dentro de los promotores que funcionan en el inicio de la transcripción con frecuencia se caracterizan
60 por secuencias de nucleótidos de consenso. Entre estos elementos promotores se incluyen sitios de unión de ARN polimerasa, secuencias TATA, secuencias CAAT, elementos específicos de la diferenciación (EED, McGehee R.E. Jr. et al., Mol. Endocrinol. 7:551-60, 1993), elementos de respuesta de AMP cíclico (ERC), elementos de respuesta del suero (ERS, Treisman R., Seminars in Cancer Biol. 1:47-58, 1990), elementos de respuesta de glucocorticoide (ERG) y sitios de unión para otros factores de transcripción, tales como ERC/FTA (O'Reilly M.A. et al., J. Biol. Chem. 267:19938-43, 1992), AP2 (Ye J. et al., J. Biol. Chem. 269:25728-34, 1994), SP1, proteína de unión al elemento de
65

respuesta a AMPc (UERC); Loeken M.R., Gene Expr. 3:253-64, 1993) y factores octámeros (ver, en general, Watson et al., editores, Molecular Biology of the Gene, 4a ed., The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1987, y Lemaigre, F.P. and Rousseau, G.G., Biochem. J. 303:1-14, 1994). En el caso de que un promotor sea un promotor inducible, la tasa de transcripción se incrementa en respuesta a un agente inductor. En contraste, la tasa de transcripción no se encuentra regulada por un agente inductor en el caso de que el promotor sea un promotor constitutivo. Los promotores reprimibles también son conocidos. Por ejemplo, el promotor c-fos resulta específicamente activado al unirse la hormona de crecimiento a su receptor sobre la superficie celular. La expresión regulada por tetraciclina (Tet) puede conseguirse con promotores híbridos artificiales que consisten, por ejemplo, de un promotor del CMV seguido de dos sitios operadores Tet. El represor Tet se une a los dos sitios operadores Tet y bloquea la transcripción. Al añadir el inductor tetraciclina, se libera el represor Tet de los sitios operadores Tet y se produce la transcripción (Gossen M. y Bujard H., PNAS 89:5547-5551, 1992). Para otros promotores inducibles, incluyendo la metalotioneína y los promotores de choque térmico, ver, por ejemplo, Sambrook et al. (*supra*) y Gossen et al., Curr. Opin. Biotech. 5:516-520, 1994. Entre los promotores eucarióticos que han sido identificados como promotores fuertes para la expresión de nivel elevado se encuentran el promotor temprano de SV40, el promotor tardío mayor adenovírico, el promotor de la metalotioneína I de ratón, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, el factor 1 alfa de hámster chino (CHEF-1, ver, por ejemplo, la patente US nº 5.888.809), FE-1 humano y el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV IE).

El "promotor" puede ser constitutivo o inducible. Un intensificador (es decir, un elemento de ADN de acción en cis que actúa como promotor incrementando la transcripción) puede resultar necesario para funcionar conjuntamente con el promotor incrementando el nivel de expresión obtenido con el promotor solo, y puede incluirse como elemento regulador de la transcripción. Con frecuencia, el segmento polinucleótido que contiene el promotor también incluye secuencias de intensificador (por ejemplo de CMV o de SV40).

La expresión "operablemente ligado" se refiere a la yuxtaposición de dos o más componentes, en la que los componentes indicados de esta manera se encuentran en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Por ejemplo, un promotor y/o un intensificador se encuentran operablemente ligados a una secuencia codificante en el caso de que actúen en cis controlando o modulando la transcripción de la secuencia codificante ligada. Generalmente, aunque no necesariamente, las secuencias de ADN que se "ligan operablemente" son contiguas y, en caso necesario para unir dos regiones codificantes de proteína, tales como un líder secretorio y un polipéptido, o un polipéptido y un dominio transmembranal, o un polipéptido y un péptido de señal para un anclaje GPI, o un polipéptido y un codón de parada traduccional, contiguos y en el mismo marco de lectura. Sin embargo, aunque un promotor operablemente ligado generalmente se encuentra localizado cadena arriba de la secuencia codificante, no es necesariamente contigua a la misma. Los intensificadores no son necesariamente contiguos. Un intensificador se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que el intensificador incremente la transcripción de la secuencia codificante. Los intensificadores operablemente ligados pueden encontrarse situados cadena arriba, dentro o cadena abajo de las secuencias codificantes y a distancia considerable del promotor. Un sitio de poliadenilación se encuentra operablemente ligada a una secuencia codificante en el caso de que se encuentre situada en el extremo de cadena abajo de la secuencia codificante de manera que la transcripción se produzca a través de la secuencia codificante y entrando en la secuencia de poliadenilación. El ligamiento se lleva a cabo mediante métodos recombinantes conocidos de la técnica, por ejemplo utilizando metodología de PCR y/o mediante ligación en sitios de restricción convenientes. En el caso de que no existan sitios de restricción convenientes, se utilizan adaptadores o conectores oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional.

La expresión "producción de pre-ARNm" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un procedimiento de transcripción del ADN en su pre-ARNm complementario. El ADN eucariótico está compuesto de secuencias codificantes y no codificantes, que se denominan exones (codificantes) e intrones (no codificantes). Durante el proceso de la transcripción del ADN en su pre-ARNm complementario, se mantiene la organización genómica de exones e intrones.

La expresión "procesamiento de pre-ARNm" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un procedimiento de modificación post-traduccional. En esta etapa, los intrones del pre-ARNm se extraen, es decir, se eliminan del pre-ARNm, se añade una caperuza al extremo 5' del ARNm procesado y se lleva a cabo la 3'-poliadenilación. En esta etapa se obtiene el ARNm nuclear final, es decir, maduro.

La expresión "dominio transmembranal" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a un polipéptido o proteína que se encuentra codificado al nivel del ADN por como mínimo un exón y que comprende una región extracelular, una región transmembranal y una región intracelular. Un dominio transmembranal generalmente comprende tres regiones estructurales diferentes: una región extracelular N-terminal, un tramo transmembranal conservado central y una región citoplasmática C-terminal. En una realización, el dominio transmembranal comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, una región extracelular y una región transmembranal. El dominio transmembranal puede comprender adicionalmente una región intracelular o citoplasmática.

La expresión “un fragmento de un dominio transmembranal” tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a la parte de un dominio transmembranal que abarca toda la membrana celular, es decir, que se encuentra situada dentro de la membrana celular, es decir, el tramo transmembranal.

5 La expresión “ácido nucleico alternativamente procesado” se refiere a un ácido nucleico que se inicia con un sitio 5' donante de procesamiento y terminado en un sitio 3' aceptor de procesamiento. Este ácido nucleico contiene un codón de parada traduccional y una señal de poliadenilación. Este ácido nucleico alternativamente procesable comprende una región no codificante que no resulta constitutivamente extraída del pre-ARNm correspondiente, tal como, por ejemplo, el intrón posterior al exón codificante de un dominio C_H3 o C_H4 de cadena pesada de
10 inmunoglobulina. El “suceso de procesamiento alternativo” que tiene lugar en el sitio 5' donante de procesamiento del ácido nucleico alternativamente procesable es un suceso de decisión de si el ácido nucleico alternativamente procesable se extrae del pre-ARNm o si se mantiene y se encuentra comprendido, por lo menos parcialmente, en el ARNm maduro (procesado).

15 La expresión “procesamiento alternativo” y equivalentes gramaticales de la misma tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a un proceso en las células eucarióticas en que a partir de un único pre-ARNm debido al diferente procesamiento de uno o más intrones, pueden obtenerse diferentes ARNm maduros y, por consiguiente, pueden expresarse diferentes isoformas de un polipéptido. En una realización de la invención puede procesarse alternativamente un único intrón, es decir sólo uno, del pre-ARNm producido. En otra realización, el segundo ácido nucleico puede procesarse alternativamente. En una realización adicional, el segundo ácido nucleico comprende un intrón alternativamente procesado. El diferente procesamiento es una decisión “sí/no”, es decir, en el proceso de procesamiento alternativo, el intrón que debe procesarse, es decir el “ácido nucleico alternativamente procesable”, resulta por lo menos parcialmente retenido o extraído. Lo anterior no debe entenderse como un mecanismo de punto de ramificación que resulta en diferentes exones posteriores. De hecho es un mecanismo en el que un ácido nucleico alternativamente procesable se extrae o se mantiene por lo menos parcialmente en el ARNm maduro. Con este mecanismo, el ácido nucleico alternativamente procesable y, de esta manera, el codón de parada traduccional comprendido en el mismo marco de lectura, resultan retenidos o eliminados.

20 El procesamiento alternativo es un mecanismo regulador importante en las células eucarióticas. Con el procesamiento alternativo, pueden obtenerse diferentes combinaciones de exones en un ARNm maduro a partir del mismo pre-ARNm, dando lugar a una pluralidad de diferentes proteínas codificadas por el mismo ADN.

25 El término “expresión” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a procedimientos de transcripción y/o traducción que se producen dentro de una célula. El nivel de transcripción de un producto deseado en una célula puede determinarse a partir de la cantidad de ARNm correspondiente que se encuentra presente en la célula. Por ejemplo, el ARNm transcrito a partir de una secuencia seleccionada puede cuantificarse mediante PCR o mediante hibridación northern (ver Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Los polipéptidos pueden cuantificarse mediante diversos métodos, por ejemplo mediante ELISA, mediante ensayo de la actividad biológica del polipéptido o mediante la utilización de ensayos que son independientes de dicha actividad, tales como la transferencia western, la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, RMN o radioinmunoensayo, por ejemplo, mediante la utilización de anticuerpos que reconocen y se unen al polipéptido (ver Sambrook et al., *supra*, 1989).

35 Una “célula huésped” se refiere a una célula en la que se introduce un ácido nucleico heterólogo codificante de un polipéptido o proteína. Entre las células huésped se incluyen tanto las células procaríóticas, las cuales son utilizadas para la propagación de plásmidos, como las células eucarióticas, las cuales son utilizadas para la expresión del ácido nucleico heterólogo. Preferentemente, las células eucarióticas son células de mamífero. Preferentemente las células de mamífero son células CHO, células BHK, células NS0, células Sp2/0, células COS, células HEK o células PER.C6®.

40 Un “polipéptido” es un polímero que consiste de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, producidos natural o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 residuos aminoácidos pueden denominarse “péptidos”, mientras que los polipéptidos que consisten de más de 100 residuos aminoácidos o que consisten de dos o más cadenas polipeptídicas pueden denominarse “proteínas”.

45 Una “proteína” es una macromolécula que comprende por lo menos una cadena polipeptídica de una longitud de 100 aminoácidos o más o que comprende dos o más cadenas polipeptídicas.

50 Los polipéptidos y proteínas pueden comprender además componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidrato, iones metálicos, lípidos, ésteres de ácido carboxílico o combinaciones de los mismos. La célula pueden añadir sustituyentes no peptídicos, en la cual se produce el polipéptido o proteína, y pueden variar según el tipo de célula. Los polipéptidos y proteínas se definen en la presente memoria en términos de sus estructuras del esqueleto de aminoácidos; algunas adiciones, tales como grupos carbohidratos, no se especifican generalmente, aunque sin embargo pueden encontrarse presentes.

65

La expresión “ADN heterólogo” o “ácido nucleico heterólogo” se refiere a una molécula de ADN o un ácido nucleico, o a una población de moléculas de ADN o a una población de ácidos nucleicos, que no existe naturalmente dentro de una célula huésped dada. Las moléculas de ADN heterólogas respecto a una célula huésped particular pueden contener ADN derivado de la especie de célula huésped (es decir, del ADN endógeno) con la condición de que el ADN del huésped se combine con el ADN no del huésped (es decir, ADN exógeno). Por ejemplo, una molécula de ADN que contiene un segmento de ADN no del huésped codificante de un polipéptido operablemente ligado a un segmento de ADN del huésped que comprende un promotor se considera que es una molécula de ADN heterólogo. A la inversa, el ADN heterólogo puede comprender un gen estructural endógeno operablemente ligado a un promotor exógeno.

Un péptido o polipéptido codificado por un ácido nucleico no del huésped, es decir, heterólogo, es un péptido o polipéptido “heterólogo”.

La expresión “polipéptido biológicamente activo” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula orgánica, por ejemplo una macromolécula biológica tal como un péptido, proteína, glucoproteína, nucleoproteína, mucoproteína, lipoproteína, polipéptido o proteína sintético, que provoca un efecto biológico al administrarlo en o a sistemas biológicos artificiales, tales como bioensayos, utilizando líneas celulares y virus, o in vivo en un animal, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, aves y mamíferos, incluyendo seres humanos. Dicho efecto biológico puede ser, aunque sin limitación, inhibición o activación enzimática, unión a un receptor o a un ligando, en el sitio de unión o contiguo al mismo, inducción de señal o modulación de señal. Dicho polipéptido biológicamente activo se selecciona de entre el grupo de polipéptidos que comprende inmunoglobulinas, fragmentos de inmunoglobulina, conjugados de inmunoglobulina y péptidos antifusogénicos.

Las moléculas biológicamente activas son, aunque sin limitarse a ellas, por ejemplo, hormonas, citoquinas, interleuquinas, inmunoglobulinas, agentes antifusogénicos, factores de crecimiento, ligandos de receptores, agonistas o antagonistas, agentes citotóxicos, agentes antiviricos, agentes de obtención de imágenes, inhibidores enzimáticos, activadores enzimáticos o moduladores de la actividad enzimática tales como sustancias alostéricas, y conjugados de los mismos.

El término “aminoácido” tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a un grupo de carboxi- α -aminoácidos, que directamente o como precursor pueden encontrarse codificados por ácidos nucleicos, comprendiendo alanina (código de tres letras: Ala, código de una letra: A), arginina (Arg, R), asparagina (Asn, N), ácido aspártico (Asp, D), cisteína (Cys, C), glutamina (Gln, Q), ácido glutámico (Glu, E), glicina (Gly, G), histidina (His, H), isoleucina (Ile, I), leucina (Leu, L), lisina (Lys, K), metionina (Met, M), fenilalanina (Phe, F), prolina (Pro, P), serina (Ser, S), treonina (Thr, T), triptófano (Trp, W), tirosina (Tyr, Y) y valina (Val, V).

Un “vector de clonación” es un ácido nucleico, tal como un plásmido, cósmido, fagémido o cromosoma artificial bacteriano (CAB) que presenta la capacidad de replicarse autónomamente en una célula huésped. Los vectores de clonación típicamente contienen uno o un número pequeño de sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción que permiten la inserción de un ácido nucleico de una manera determinada sin pérdida de una función biológica esencial del vector, así como secuencias de nucleótidos codificantes de un marcador seleccionable, que resulta adecuado para la utilización en la identificación y selección de células transformadas con el vector de clonación. Entre los marcadores seleccionables típicamente se incluyen genes que proporcionan resistencia a la tetraciclina, a la neomicina, a G418 o a la ampicilina.

Un “vector de expresión” es un ácido nucleico codificante de un polipéptido o proteína heterólogo que debe expresarse en una célula huésped. Típicamente, un vector de expresión comprende una unidad de propagación plasmídica procariótica, por ejemplo *E. coli* que comprende un origen de replicación y un marcador de selección procariótico, un marcador de selección eucariótico y uno o más casetes de expresión para la expresión de un ácido nucleico de interés, comprendiendo cada uno un promotor, un ácido nucleico y un terminador de transcripción, incluyendo una señal de poliadenilación. La expresión génica habitualmente se sitúa bajo el control de un promotor y este gen estructura se dice que se encuentra “operablemente ligado” al promotor. De manera similar, un elemento regulador y un promotor nuclear se encuentran operablemente ligados en el caso de que el elemento regulador module la actividad del promotor mínimo.

Una “unidad de transcripción policistrónica” es una unidad de transcripción en la que más de un gen estructural se encuentra bajo el control del mismo promotor.

Un “polipéptido aislado” o una “proteína aislada” es un polipéptido o proteína que se encuentra esencialmente libre de componentes celulares contaminantes, tales como carbohidratos, lípidos u otras impurezas proteicas no unidas covalentemente, así como impurezas no proteicas asociadas al polipéptido o proteína en la naturaleza. Típicamente, una preparación de polipéptido/proteína aislado contiene el polipéptido/proteína en una forma altamente purificada, es decir, por lo menos aproximadamente 80% puro, por lo menos aproximadamente 90% puro, por lo menos aproximadamente 95% puro, más de 95% puro o más de 99% puro. Una manera de demostrar que una preparación particular contiene un polipéptido o proteína aislado es a partir de la aparición de una única banda tras la electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico (SDS)-poliacrilamida de la preparación y tinción de azul brillante de

Coomassie del gel. Sin embargo, el término "aislado" no excluye la presencia del mismo polipéptido o proteína en formas físicas alternativas, tales como dímeros o formas alternativamente glucosiladas o derivatizadas.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consiste de uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Dicha definición incluye variantes tales como formas mutadas, es decir, formas con sustituciones, deleciones e inserciones de uno o más aminoácidos, formas truncadas, así como formas fusionadas. Entre los genes de inmunoglobulina reconocidos se incluyen los diferentes genes de región constante, así como la multitud de genes de región variable de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden existir en una diversidad de formatos, incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)₂, así como cadenas sencillas (scFv) (por ejemplo Huston J.S. et al., PNAS USA 85:5879-5883, 1988; Bird R.E. et al., Science 242:423-426, 1988; y, en general, Hood et al., Immunology, Benjamin N.Y., 2ª edición, 1984, y Hunkapiller T. y Hood, L., Nature 323:15-16, 1986).

15 Cada una de las cadenas polipeptídicas pesada y ligera de una inmunoglobulina, en caso de encontrarse presentes, pueden comprender una región constante (generalmente la parte carboxilo-terminal). La región constante de la cadena pesada media en la unión del anticuerpo i) a células que portan un receptor de Fc, tal como células fagocíticas, o ii) a células que portan el receptor de Fc neonatal (FcRn), también conocido como receptor Brambell. También media en la unión a algunos factores, incluyendo factores del sistema clásico del complemento, tal como el componente C1q. Además, tras el dominio constante C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, puede encontrarse un dominio transmembranal, es decir, el dominio C_{H3} o C_{H4}. Este dominio transmembranal permite la formación de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulina o polipéptidos de fusión de inmunoglobulina unidos a la membrana plasmática.

25 Cada una de las cadenas polipeptídicas pesada y ligera de una inmunoglobulina, en caso de encontrarse presentes, pueden comprender un dominio variable (generalmente la parte amino-terminal). El dominio variable de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina comprende diferentes segmentos, es decir, cuatro regiones marco (FR) y tres regiones hipervariables (RDC).

30 La expresión "por lo menos un fragmento de" se refiere a una fracción de un ácido nucleico completo o de un polipéptido completo, es decir, por lo menos 20%, por lo menos 40%, por lo menos 60%, o por lo menos 80% del ácido nucleico, polipéptido o dominio completo. Por ejemplo, la expresión "un ácido nucleico codificante de por lo menos un fragmento de un dominio de inmunoglobulina C_{H3} o C_{H4}" se refiere a una fracción de un ácido nucleico codificante del dominio de inmunoglobulina C_{H3} o C_{H4} completo, es decir, por lo menos 20%, por lo menos 40%, por lo menos 60% o por lo menos 80% del ácido nucleico codificante del dominio de inmunoglobulina C_{H3} o C_{H4} completo. En una realización, un fragmento de una cadena pesada de inmunoglobulina es un fragmento C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina.

40 La expresión "un codón de parada traduccional en el mismo marco de lectura" se refiere a un codón de parada traduccional (TAA, TAG o TGA) al que sigue una región codificante de un ácido nucleico sin un desplazamiento de marco del marco de lectura con respecto a la región codificante precedente del ácido nucleico, es decir, que termina la región codificante durante la traducción. Un codón de parada traduccional en el marco de lectura se encuentra operablemente ligado a la región codificante precedente de un ácido nucleico.

45 La expresión "sin un codón de parada traduccional en el marco de lectura" se refiere a la ausencia de un codón de parada traduccional (TAA, TAG o TGA) en el ácido nucleico designado y/o la presencia de un codón de parada traduccional, que puede encontrarse dentro o en el extremo de una región codificante de un ácido nucleico, pero que se debe a uno o dos desplazamientos de par de bases no reconocidos durante la traducción del ARNm procesado (es decir, fuera de marco, no ligado operablemente) y de esta manera no termina la región codificante durante el proceso de traducción.

50 La expresión "terminador de transcripción" tal como se utiliza en la presente solicitud es una secuencia de ADN de 50 a 750 pares de bases de longitud que proporciona a la ARN polimerasa la señal para la terminación de la síntesis de ARNm. Son recomendables terminadores muy eficientes (fuertes) en el extremo 3' de un casete de expresión para evitar que la ARN polimerasa siga leyendo, particularmente al utilizar promotores fuertes. Los terminadores de transcripción ineficientes pueden conducir a la formación de un ARNm de tipo operón que puede ser el motivo de una expresión génica no deseada, por ejemplo codificada en un plásmido.

60 Las expresiones "no eliminado constitutivamente durante el procesamiento del pre-ARNm" y "no extraído constitutivamente del pre-ARNm (correspondiente)" tal como se utilizan en la presente solicitud se refieren a un procedimiento de corte y empalme que no tiene lugar necesariamente durante el procesamiento del pre-ARNm, es decir, el ácido nucleico de un intrón específico sólo se elimina en ocasiones durante el procesamiento del pre-ARNm. Como resultado, se obtienen dos ARNm maduros diferentes, uno con por lo menos una parte del intrón y uno sin el intrón.

65 La expresión "anclaje GPI" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a una modificación post-traduccional unida a un extremo C-terminal de un polipéptido o proteína. Un "anclaje GPI" presenta una estructura nuclear que

comprende por lo menos un residuo fosfato de etanolamina, un trimanósido, un residuo glucosamina y un fosfolípido inositol. A pesar de esta estructura nuclear, un anclaje GPI normalmente presenta una cierta microheterogeneidad y por lo tanto una proteína que presente un anclaje GPI normalmente es una mezcla de proteínas con anclajes GPI homólogas de la misma estructura nuclear que presenta diferentes modificaciones de cadena lateral.

La expresión "péptido de señal para un anclaje GPI" se refiere a una secuencia de aminoácidos C-terminal de un polipéptido o proteína que consiste de un aminoácido al que se une el anclaje GPI, un péptido espaciador opcional y un péptido hidrofóbico. Prácticamente la totalidad de dicho péptido de señal, es decir, el péptido espaciador opcional y el péptido hidrofóbico, es eliminada post-traduccionalmente por el enzima GPI-transaminasa y se forma un enlace entre el grupo amino del fosfato de etanolamina nuclear del anclaje GPI y el aminoácido al que se encuentra unido el anclaje GPI.

Tras la transfección con un ácido nucleico heterólogo, deben seleccionarse las células que expresan un polipéptido heterólogo codificado por el ácido nucleico heterólogo. Para la selección se utiliza un marcador. El marcador indica células en una población que han sido transformadas con éxito y que facilitan la selección y aislamiento de dichas células. Pueden utilizarse diferentes marcadores, tales como, por ejemplo, marcadores seleccionables, o marcajes detectables como la proteína fluorescente verde (PFV).

La selección de células puede llevarse a cabo en una única etapa o en múltiples etapas. En un procedimiento de única/múltiples etapas, la primera selección puede llevarse a cabo basándose, por ejemplo, en un nivel umbral de un marcador seleccionable, tal como un marcaje detectable. Por ejemplo, para la selección mediante citometría de flujo (por ejemplo mediante FACS – separación celular activada por fluorescencia), se fija un nivel umbral de fluorescencia y se seleccionan las células con una fluorescencia superior a dicho nivel umbral. Alternativamente pueden recogerse células con el 1% a 15% máximo (es decir, el 15% de las células con el marcaje detectable más intenso) o el 1% a 10% máximo o el 1% a 5% máximo, o el 5% a 10% máximo o el 5% a 6% máximo de intensidad de fluorescencia de la población de muestra. Un método alternativo para la selección de células es la unión inmunológica, por ejemplo a perlas magnéticas recubiertas con proteína A o inmunoglobulinas específicas. El panel de células seleccionado puede considerarse la población básica para una etapa de selección adicional, por ejemplo mediante la siembra, cultivo y análisis de ELISA (ensayo de inmunosorción ligada a enzima) de células individuales, o mediante clonación de dilución limitada o mediante expansión por cultivo bajo condiciones de cultivo selectivas en medio selectivo durante varios días y una selección mediante FACS adicional, o mediante una selección adicional mediante FACS con un nivel umbral superior, que puede basarse, por ejemplo, en las intensidades de fluorescencia detectadas en una selección de FACS precedente, o mediante un método de inmunoprecipitación (ver también, por ejemplo, el documento nº WO 2005/020924). La selección de una célula según la invención puede llevarse a cabo mediante un método seleccionado de entre el grupo de citometría de flujo, ELISA, inmunoprecipitación, cromatografía de columna de inmunoafinidad, separación mediante inmunoafinidad con perlas magnéticas, métodos de aislamiento basados en microscopía, o unión inmunológica. En una realización, la selección de una célula puede llevarse a cabo mediante un método seleccionado de entre el grupo de citometría de flujo, ELISA, inmunoprecipitación, cromatografía de columna de inmunoafinidad, separación mediante inmunoafinidad con perlas magnéticas, métodos de aislamiento basados en microscopía, o unión inmunológica, seguido de un método seleccionado de entre el grupo de siembra y cultivo de células individuales, dilución limitada, o expansión mediante cultivo, seguido de un método seleccionado de entre el grupo de FACS, inmunoprecipitación, cromatografía de columna de inmunoafinidad, separación mediante inmunoafinidad con perlas magnéticas, métodos de aislamiento basados en microscopía, o ELISA.

Debido a que la eficacia de los métodos y vectores de transfección conocidos de la técnica es muy alta y, de esta manera, se obtiene una pluralidad de células transfectadas, resultan preferentes los marcadores que permitan también la correlación del rendimiento de expresión de una célula transfectada con la "intensidad" detectada del marcador. Por lo tanto, resulta funcional asociar la expresión del polipéptido heterólogo de interés con la expresión del marcador.

La presente invención utiliza metodología de procesamiento, es decir procesamiento alternativo, para expresar un polipéptido heterólogo y un marcador del mismo ácido nucleico, es decir, del mismo casete de expresión, de manera que, por ejemplo, no se utiliza ningún SIER. El marcador es una forma unida a la membrana plasmática del polipéptido heterólogo expresado. El marcador seleccionable comprende como parte N-terminal el polipéptido heterólogo y como parte C-terminal por lo menos un fragmento de un dominio transmembranal o un anclaje GPI. De esta manera, el polipéptido heterólogo producido y la parte extracelular del marcador seleccionable, es decir, la parte del marcador seleccionable que se detecta, son idénticos.

Durante la transcripción del ADN se obtiene una copia del ADN, el denominado pre-ARN mensajero (pre-ARNm). Este pre-ARNm presenta la misma organización que el ADN molde, es decir, presenta una organización genómica de intrón-exón. Sólo los exones contienen la información de la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado.

De esta manera, deben eliminarse los intrones del pre-ARNm antes de la traducción. Este procedimiento se denomina procesamiento del ARN.

- Un “ácido nucleico procesable” se caracteriza por como mínimo un sitio 5’ donador de procesamiento, un sitio 3’ aceptor de procesamiento y un sitio denominado de ramificación, que normalmente se encuentra situado 20 a 50 bases antes del sitio aceptor. Esta organización afecta al reconocimiento y extracción del ácido nucleico del sitio 5’ donante de procesamiento al sitio 3’ aceptor de procesamiento del pre-ARNm durante el procesamiento del ARN.
- 5 Durante la etapa de procesamiento, se genera el ARNm maduro a partir del que se traduce un polipéptido o proteína. En una realización, por lo menos un ácido nucleico, preferentemente el segundo ácido nucleico, es un ácido nucleico procesable que contiene elementos reguladores adicionales, tales como un codón de parada en el marco de lectura y una señal de poliadenilación.
- 10 Sin embargo, el procedimiento de procesamiento no es exclusivo. Por ejemplo, resulta posible que un intrón no resulte eliminado del pre-ARNm durante el procesamiento del pre-ARNm y, de esta manera, se encuentre por lo menos parcialmente incluido en el ARNm maduro. En caso de encontrarse presente un codón de parada en el marco de lectura en este intrón “opcionalmente” incluido, se para la traducción en este codón de parada y se produce una variante del polipéptido codificado.
- 15 El reconocimiento y extracción de un intrón con frecuencia se encuentran regulados por elementos de acción en cis adicionales en el pre-ARNm. Debido a su función y posición, estos elementos se denominan intensificador de procesamiento exónico (IPE), silenciador de procesamiento exónico (SPE), intensificador de procesamiento intrónico (IPI) o silenciador de procesamiento intrónico (SPI), respectivamente (Black D.L., Annu. Rev. Biochem. 72:291-336, 2003).
- 20 El ADN genómico de la mayoría de genes eucarióticos presenta una organización de intrón-exón. Por ejemplo, dentro del exón codificante del dominio C-terminal de la forma secretada de una cadena pesada de inmunoglobulina (es decir, C_H3 o C_H4, respectivamente) se encuentra un sitio 5’ donante de procesamiento.
- 25 En el caso de que dicho sitio donante de procesamiento no resulte eficaz en el procesamiento del pre-ARNm de la cadena pesada, el intrón que sigue a dicho exón, que contiene un codón de parada y una señal de poliadenilación, resulta por lo menos parcialmente retenido en el ARNm maduro. A continuación se traduce el ARNm en una cadena pesada de inmunoglobulina que finaliza con un dominio C_H3 o C_H4 y representa una inmunoglobulina soluble. Ésta es la ruta de procesamiento principal para los genes de cadena pesada de inmunoglobulina en las células secretoras de inmunoglobulina.
- 30 En el caso de que el sitio donante de procesamiento resulte eficaz en el procesamiento del pre-ARNm de cadena pesada de inmunoglobulina, el intrón consecutivo, y de esta manera el codón de parada, resultan eliminados. Por lo tanto, la traducción no se para después del dominio C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina. Además, la traducción continúa con los exones siguientes procesados que codifican un dominio transmembranal. Esta ruta de procesamiento menor para los genes de cadena pesada de inmunoglobulina resulta en una forma de inmunoglobulina unida a la membrana plasmática presentada sobre la superficie celular de una célula productora de inmunoglobulinas.
- 35 Este procedimiento se denomina “procesamiento alternativo” y el ácido nucleico (es decir, el intrón) opcionalmente eliminado en este procedimiento se denomina “ácido nucleico alternativamente procesable”.
- 40 En el caso de que un ácido nucleico codificante de un polipéptido o proteína heterólogo se una a un ácido nucleico codificante de por lo menos un fragmento de un dominio transmembranal o a un ácido nucleico codificante de un péptido de señal para un anclaje GPI mediante un ácido nucleico alternativamente procesable, es decir, un ácido nucleico alternativamente procesable se encuentra situado entre dichos dos ácidos nucleicos, de manera que estos tres ácidos nucleicos se encuentran operablemente ligados, se expresan dos variantes del polipéptido o proteína heterólogo: una variante soluble, es decir, una variante que sólo comprende el polipéptido o proteína, y una variante unida a la membrana plasmática, es decir, una variante que comprende tanto el polipéptido o proteína como el dominio transmembranal o el anclaje GPI.
- 45 En una realización, el ácido nucleico transfectado se encuentra comprendido en un casete de expresión. En una realización, el primer ácido nucleico no presenta un codón de parada traduccional dentro del marco en el extremo 3’.
- 50 En otra realización, el primer, segundo y tercer ácidos nucleicos se encuentran operablemente ligados. En una realización, el tercer ácido nucleico codifica por lo menos un fragmento de un dominio transmembranal. En otra realización, el fragmento de un dominio transmembranal es una región transmembranal. En una realización, el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico se selecciona de entre el grupo que comprende cadenas pesadas de inmunoglobulina, cadenas ligeras de inmunoglobulina, polipéptidos biológicamente activos, fragmentos de las mismos y polipéptidos de fusión de los mismos. En una realización, el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico se selecciona de entre el grupo que comprende cadenas pesadas de inmunoglobulina, cadenas ligeras de inmunoglobulina, fragmentos de las mismas y fusiones de las mismas. En una realización, el tercer ácido nucleico codifica por lo menos un fragmento de un dominio transmembranal de inmunoglobulina.
- 60 En mayor detalle, en la presente memoria se informa de un método para seleccionar una célula eucariótica que expresa una cadena pesada de inmunoglobulina, en el que el método comprende:
- 65

- a) transfectar una célula eucariótica con un ácido nucleico que comprende, en dirección 5' a 3',
- i) un primer ácido nucleico codificante de una cadena pesada de inmunoglobulina sin codón de parada traduccional en el marco de lectura,
 - ii) un segundo ácido nucleico que se inicia con un sitio donador de procesamiento y que termina en un sitio aceptor de procesamiento que comprende un codón de parada traduccional en el mismo marco de lectura y una señal de poliadenilación,
 - iii) un tercer ácido nucleico codificante de:
 - iiia) por lo menos un fragmento de un dominio transmembranal, o
 - iiib) un péptido de señal para un anclaje GPI,

b) cultivar dicha célula transfectada bajo condiciones adecuadas a la producción de pre-ARNm de dicho ácido nucleico, procesar dicho pre-ARNm y traducir dicho ARNm procesado en una cadena pesada de inmunoglobulina, en la que dicha célula transfectada produce cadena pesada de inmunoglobulina soluble y cadena pesada de inmunoglobulina unida a membrana plasmática mediante procesamiento alternativo de dicho pre-ARNm, y

c) seleccionar una célula con cadena pesada de inmunoglobulina unida a membrana plasmática que será la célula expresante de una cadena pesada de inmunoglobulina.

El método puede servir para seleccionar una célula eucariótica que expresa una inmunoglobulina, en la que el método comprende:

a) transfectar una célula eucariótica con un ácido nucleico que comprende un primer casete de expresión para una cadena ligera de inmunoglobulina y un segundo casete de expresión que comprende, en dirección 5' a 3':

- i) un primer ácido nucleico codificante de una cadena pesada de inmunoglobulina sin codón de parada traduccional en el marco de lectura,
- ii) un segundo ácido nucleico que se inicia con un sitio donador de procesamiento y que termina en un sitio aceptor de procesamiento que comprende un codón de parada traduccional en el mismo marco de lectura y una señal de poliadenilación,
- iii) un tercer ácido nucleico codificante de:
 - iiia) por lo menos un fragmento de un dominio transmembranal, o
 - iiib) un péptido de señal para un anclaje GPI,

b) cultivar dicha célula transfectada bajo condiciones adecuadas a la producción de pre-ARNm a partir de dicho ácido nucleico, procesar dicho pre-ARNm y traducir dicho ARNm procesado en una cadena pesada de inmunoglobulina, en la que dicha célula transfectada produce inmunoglobulina soluble e inmunoglobulina unida a membrana plasmática mediante procesamiento alternativo de dicho pre-ARNm, y

c) seleccionar una célula con inmunoglobulina unida a membrana plasmática que será la célula expresante de una inmunoglobulina.

El método puede servir para seleccionar una célula eucariótica que expresa una inmunoglobulina, en la que el método comprende:

a) transfectar una célula eucariótica con dos ácidos nucleicos simultánea o secuencialmente, en la que un ácido nucleico comprende un casete de expresión para una cadena ligera de inmunoglobulina y el otro ácido nucleico comprende un casete de expresión que comprende, en dirección 5' a 3':

- i) un primer ácido nucleico codificante de una cadena pesada de inmunoglobulina sin codón de parada traduccional en el marco de lectura,
- ii) un segundo ácido nucleico que se inicia con un sitio donador de procesamiento y que termina en un sitio aceptor de procesamiento que comprende un codón de parada traduccional en el mismo marco de lectura y una señal de poliadenilación,
- iii) un tercer ácido nucleico codificante de:
 - iiia) por lo menos un fragmento de un dominio transmembranal, o
 - iiib) un péptido de señal para un anclaje GPI,

b) cultivar dicha célula transfectada bajo condiciones adecuadas a la producción de pre-ARNm a partir de dicho ácido nucleico, procesar dicho pre-ARNm y traducir dicho ARNm procesado en una cadena pesada de inmunoglobulina, en la que dicha célula transfectada produce inmunoglobulina soluble e inmunoglobulina unida a membrana plasmática mediante procesamiento alternativo de dicho pre-ARNm, y

c) seleccionar una célula con inmunoglobulina unida a membrana plasmática que será la célula expresante de una inmunoglobulina.

En una realización, el dominio transmembranal codificado por el tercer ácido nucleico es un dominio transmembranal de inmunoglobulina. En una realización de la invención, el segundo ácido nucleico comprende únicamente un sitio 5'

donante de procesamiento y únicamente un sitio 3' aceptor de procesamiento. En otra realización de la presente invención, el segundo ácido nucleico es un intrón de cadena pesada de inmunoglobulina de origen natural, que sigue al exón codificante de un dominio C_H3 o C_H4 de cadena pesada de inmunoglobulina, en el que, en dicho intrón, se delecionan por lo menos 50 nucleótidos consecutivos.

5 Por ejemplo, para la expresión recombinante de cadenas pesadas de inmunoglobulina en células eucarióticas, se utiliza un ácido nucleico con organización genómica de intrón-exón o que sólo contiene las regiones codificantes, es decir ADNc. En ambos casos el ácido nucleico finaliza con el codón de parada después del exón codificante del dominio C-terminal de la cadena pesada de inmunoglobulina. A continuación, en la organización genómica los intrones y exones, que comprenden un ácido nucleico alternativamente procesable y un dominio transmembranal, se omiten. Por lo tanto, con dicho ácido nucleico únicamente se obtiene una cadena pesada de inmunoglobulina soluble.

15 En el caso de que para la expresión recombinante de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas se conserve por lo menos parcialmente la organización genómica del gen de cadena pesada de inmunoglobulina, es decir, en el caso de que el intrón después del exón codificante del codón C-terminal (es decir, el ácido nucleico alternativamente procesable) y el exón o exones siguientes codificantes de un dominio transmembranal se conserven, resulta posible el procesamiento alternativo. En el suceso de procesamiento alternativo, los codones 3'-terminales y el codón de parada del exón codificante del dominio CH₃ o CH₄, respectivamente, resultan eliminados al igual que la secuencia intrónica, y en su lugar se genera un ARNm maduro diferente en el que la región codificante, es decir, el marco de lectura, se alarga en su extremo 3' con el exón o exones adicionalmente mantenidos. Este ARNm se traduce en una cadena pesada de inmunoglobulina extendida C-terminalmente que contiene un dominio transmembranal adicional, o un fragmento de la misma, codificado por el exón o exones 3' adicionales. Esta cadena pesada de inmunoglobulina alargada se incorpora durante el ensamblaje de las inmunoglobulinas, resultando en inmunoglobulinas unidas a la membrana plasmática. Ahora se ha encontrado inesperadamente que con dicho ácido nucleico según la invención pueden seleccionarse las células transfectadas productoras de un polipéptido heterólogo. Esta metodología es generalmente aplicable y no se encuentra restringida a las inmunoglobulinas. Para la puesta en práctica de esta metodología, el ácido nucleico para la expresión recombinante de un polipéptido heterólogo sin un codón de parada en el marco de lectura debe ligarse operablemente y encontrarse en el mismo marco de lectura de un ácido nucleico alternativamente procesable derivado de una inmunoglobulina que comprende un codón de parada traduccional en el mismo marco de lectura y un sitio de poliadenilación. El tercer ácido nucleico siguiente es variable también y puede seleccionarse de entre cualquier ácido nucleico codificante de un dominio transmembranal o fragmento del mismo, así como de cualquier ácido nucleico codificante de un péptido de señal para un anclaje GPI. Dichos elementos, es decir, el ácido nucleico codificante del polipéptido, el ácido nucleico alternativamente procesable, y el ácido nucleico codificante del dominio transmembranal o el péptido de señal para un anclaje GPI, pueden seleccionarse y combinarse a partir de diferentes genes, así como de diferentes organismos. El único requisito previo es que los tres ácidos nucleicos se combinen de manera que el codón de parada traduccional en el ácido nucleico alternativamente procesable se encuentren en el mismo marco de lectura del ácido nucleico codificante del polipéptido, es decir, pueden ser reconocidos por el ribosoma y terminarse la traducción.

40 En términos generales, con el procesamiento alternativo opcionalmente se elimina o puede eliminarse del pre-ARNm una fracción del extremo C-terminal de la forma soluble del polipéptido heterólogo como parte de un intrón. Dicha fracción comprende opcionalmente los codones 3'-terminales, la región 3' no traducida, el codón de parada y la señal de poliadenilación de la forma secretada. Por lo tanto, el ácido nucleico que se inicia con un sitio 5' donante de procesamiento y terminado con un sitio 3' aceptor de procesamiento que se elimina opcionalmente se solapa/puede solaparse con el extremo C-terminal de la variante no alternativamente procesada.

50 Por lo tanto, mediante la utilización de un ácido nucleico según la invención con una organización genómica por lo menos parcialmente conservada de un gen de cadena pesada de inmunoglobulina, pueden obtenerse dos variantes de un polipéptido heterólogo, una variante soluble corta y una variante unida a membrana plasmática larga.

55 En una realización en la que el primer ácido nucleico codifica una cadena pesada de inmunoglobulina, el primer ácido nucleico comprende todos los exones y todos excepto un intrón del gen de cadena pesada de inmunoglobulina de organización genómica. En una realización el tercer ácido nucleico codifica un fragmento de un dominio transmembranal, en el que el fragmento del dominio transmembranal se encuentra codificado por un único exón. En otra realización, el dominio transmembranal es un dominio transmembranal de inmunoglobulina codificado por una fusión M1-M2-exón, es decir, por un único exón sin el intrón intermedio en la organización genómica. En una realización, el dominio transmembranal de inmunoglobulina se encuentra codificado por un ADNc.

60 Mediante la introducción de un ácido nucleico con una organización genómica global por lo menos parcialmente conservada de un gen de cadena pesada de inmunoglobulina en una célula huésped, se obtiene una célula que expresa por una parte polipéptido heterólogo soluble y, por otra parte, polipéptido heterólogo unido a la membrana plasmática. Por ejemplo, para obtener las dos variantes de inmunoglobulina, es decir, para permitir el procesamiento alternativo, no resulta necesario mantener la organización genómica completa del gen de cadena pesada de inmunoglobulina, es decir, todos los intrones y exones. Sólo se requiere mantener el sitio de procesamiento alternativo en una forma funcional. Un "sitio de procesamiento funcional" es una secuencia de ácidos nucleicos que

comprende un sitio 5' donante de procesamiento y un sitio 3' aceptor de procesamiento, permitiendo de esta manera la extracción de la secuencia de ácidos nucleicos intermedia del pre-ARNm. El reconocimiento y extracción de un intrón con frecuencia se encuentran regulados por elementos de acción en cis adicionales en el pre-ARNm. Debido a su función y posición, estos elementos se denominan intensificador de procesamiento exónico (IPE), silenciador de procesamiento exónico (SPE), intensificador de procesamiento intrónico (IPI) o silenciador de procesamiento intrónico (SPI), respectivamente (Black D.L., Annu. Rev. Biochem. 72:291-336, 2003, que se incorpora en la presente memoria como referencia).

Para la selección de las células transfectadas que expresan un polipéptido heterólogo, pueden utilizarse diferentes métodos, tales como, aunque sin limitación, métodos espectroscópicos, por ejemplo, fluorescencia, ELISA y variantes de la misma, mediante el ensayo para la actividad biológica, o mediante la utilización de ensayos que son independientes de dicha actividad, tales como la transferencia western, la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, o el radioinmunoensayo, utilizando anticuerpos que reconocen y se unen al polipéptido heterólogo. Debido a que el polipéptido heterólogo unido a la membrana plasmática presenta la misma secuencia de aminoácidos y estructura secundaria que el polipéptido heterólogo soluble excepto por su extremo C-terminal, puede determinarse con, por ejemplo, los mismos anticuerpos que la variante soluble.

La variante unida a la membrana plasmática de un polipéptido se encuentra firmemente conectada a la célula que la expresa. Por lo tanto, la variante unida a la membrana plasmática puede utilizarse como marcador para aislar las células que han sido transfectadas con éxito con un ácido nucleico para la expresión de un polipéptido o proteína heterólogo, por ejemplo una inmunoglobulina. En una realización, el polipéptido es una inmunoglobulina. En una realización, la inmunoglobulina se selecciona de entre el grupo de IgG, IgE e IgA.

La proporción molecular de la variante soluble del polipéptido heterólogo a la variante unida a la membrana plasmática del polipéptido heterólogo es de entre más de 50:50 y menos de 100:0, preferentemente de entre más de 75:25 y menos de 100:0. Por ejemplo, en el caso de que se transfecte una célula eucariótica con un ácido nucleico según la invención codificante de una inmunoglobulina, pueden seleccionarse células transfectadas con éxito a partir de la apariencia de la inmunoglobulina unida a la membrana plasmática.

Un ácido nucleico tal como se informa en la presente memoria es un ácido nucleico que contiene, en dirección 5' a 3', una región codificante de un polipéptido heterólogo, un ácido nucleico alternativamente procesable y una región codificante de un dominio transmembranal o un fragmento de la misma. En mayor detalle, en la presente memoria se informa de un ácido nucleico que comprende:

- a) un primer ácido nucleico codificante de un polipéptido heterólogo sin codón de parada traduccional en el mismo marco de lectura,
- b) un segundo ácido nucleico desde un sitio 5' donante de procesamiento y terminado en un sitio 3' aceptor de procesamiento que comprende un codón de parada traduccional en el mismo marco de lectura y una señal de poliadenilación, y
- c) un tercer ácido nucleico codificante de por lo menos un fragmento de un dominio transmembranal.

En otras realizaciones: i) el sitio 5' de procesamiento del intrón alternativamente procesado se encuentra situado en 5' respecto al codón de parada normal del ácido nucleico codificante del polipéptido heterólogo, ii) el segundo ácido nucleico es un ácido nucleico alternativamente procesable, e iii) el sitio 5' de procesamiento se utiliza únicamente en ocasiones y no constitutivamente, resultando en una proporción molecular de polipéptido heterólogo normalmente procesado, es decir, polipéptido soluble, a polipéptido alternativamente procesado, es decir, polipéptido unido a la membrana plasmática, de entre más de 50:50 y menos de 100:0. En una realización, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico se encuentran operablemente ligados, es decir, el codón de parada traduccional del segundo ácido nucleico se encuentran en el marco de lectura del primer ácido nucleico codificante de un polipéptido o un fragmento del mismo.

El ácido nucleico que puede eliminarse mediante procesamiento alternativo sigue al ácido nucleico codificante de por lo menos un fragmento de un polipéptido y precede al ácido nucleico codificante de por lo menos un fragmento de un dominio transmembranal. En una realización, el polipéptido heterólogo es un polipéptido de fusión que comprende N-terminalmente un polipéptido de interés y C-terminalmente por lo menos un fragmento de un dominio C_H3 o C_H4 de cadena pesada de inmunoglobulina o una variante del mismo. En una realización, el ácido nucleico comprende un cuarto ácido nucleico entre el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico y/o el segundo ácido nucleico y el tercer ácido nucleico. Es decir, el cuarto ácido nucleico se encuentra situado, por ejemplo, después del segundo ácido nucleico (es decir, después del sitio 3' aceptor de procesamiento) y antes del extremo 5' del tercer ácido nucleico.

Con un ácido nucleico alternativamente procesable situado entre el ácido nucleico codificante de un polipéptido heterólogo y el ácido nucleico codificante de un dominio transmembranal, pueden expresarse dos variantes del polipéptido heterólogo: un polipéptido heterólogo sin dominio transmembranal y un polipéptido heterólogo con dominio transmembranal. El polipéptido heterólogo puede seleccionarse, aunque sin limitación, por ejemplo de entre hormonas, citoquinas, factores de crecimiento, ligandos de receptores, agonistas o antagonistas, agentes

citotóxicos, agentes antivíricos, agentes de obtención de imágenes, inhibidores enzimáticos, activadores enzimáticos o moduladores de la actividad enzimática tales como sustancias alostéricas, inmunoglobulinas o fusiones o fragmentos de los mismos. En una realización, el polipéptido es una inmunoglobulina, un polipéptido cadena pesada de inmunoglobulina o una fusión de inmunoglobulinas.

5 La invención puede ponerse en práctica con cualquier polipéptido, cualquier dominio transmembranal, con la condición de que de esta manera se incluya un ácido nucleico alternativamente procesable. En mayor detalle, el fragmento de ácido nucleico que se inicia con el sitio 5' donador de procesamiento y terminado con el sitio 3' aceptor de procesamiento debe seleccionarse correctamente. El polipéptido anterior y el dominio transmembranal a continuación pueden seleccionarse libremente.

En la presente memoria se informa además de un ácido nucleico que comprende:

- 15 a) un primer sitio de clonación múltiple,
 b) un ácido nucleico procesable que se inicia con un sitio 5' donador de procesamiento y que termina con un sitio 3' aceptor de procesamiento, en el que:
 i) el ácido nucleico procesable comprende un codón de parada y una señal de poliadenilación, y
 ii) el ácido nucleico procesable no resulta constitutivamente eliminado durante el procesamiento del pre-ARNm,
 20 c) un segundo sitio de clonación múltiple.

El presente método puede ponerse en práctica, por ejemplo, aunque sin limitación, con el segundo ácido nucleico, es decir, el ácido nucleico alternativamente procesable derivado del grupo de ácidos nucleicos codificantes del receptor de C3b/C4b (receptor del complemento de tipo 1) (Hourcade D. et al., J. Exp. Med. 168:1255-1270, 1988), RFCE humano, de pollo y de rata (Callaghan T. et al., Oncogene 8:2939-2948, 1993; Reiter J.L. y Maihle N.J., Nuc
 25 Acids Res. 24:4050-4056, 1996; Petch L. et al., Mol. Cell Biol. 10:2973-2982, 1990), cadena pesada de inmunoglobulina (Ig) α , ϵ , γ y μ (Zhang K. et al., J. Exp. Med. 176:233-243, 1992; Rogers J.E. et al., Cell 20:303-312, 1980; Milcarek C. y Hall B., Mol. Cell Biol. 5:2514-2520, 1985; Kobrin B.J. et al., Mol. Cell Biol. 6:1687-1697, 1986; Cushley W. et al., Nature 298:77, 1982; Alt F.W. et al., Cell 20:293-301, 1980; Peterson M.L., Gene Exp. 2:319-327, 1992), receptor de PLA₂ humano (Ancian P. et al., J. Biol. Chem. 270:8963-8970, 1995), Cek5 de pollo (Connor R.J. y Pasquale E.B., Oncogene 11:2429-2438, 1995), RFCF humano (Johnson D.E. et al., Mol. Cell Biol. 11 (1991) 4627-4634).

El segundo ácido nucleico puede ser un intrón de una inmunoglobulina situada entre el exón codificante del dominio C_{H3}/C_{H4} y el exón codificante de por lo menos un fragmento del dominio transmembranal. El segundo ácido nucleico
 35 puede derivarse del grupo de ácidos nucleicos codificantes de la cadena pesada de la inmunoglobulina (Ig) α (alfa) humana (h), cadena pesada de Ig δ (delta)_h, cadena pesada de Ig ϵ (epsilon)_h, Ig γ 1, γ 2, γ 3 y γ 4 (gamma) humanas, cadena pesada de Ig μ (miu), cadena pesada de Ig de tipo α (alfa) murina, cadena pesada de Ig de tipo δ (delta) murina, cadena pesada de Ig de tipo ϵ (epsilon) murino, cadena pesada de Ig de tipo γ 1 (gamma1) murino, cadena pesada de Ig de tipo γ 2A (gamma2A) murino, cadena pesada de Ig de tipo γ 2B (gamma2B) murino, cadena pesada de Ig de tipo γ 3 (gamma3) murino y cadena pesada de Ig de tipo μ (miu) murino.

El segundo ácido nucleico puede seleccionarse de entre el grupo de ácidos nucleicos codificantes de cadena pesada γ 1 de inmunoglobulina humana, cadena pesada γ 2 de inmunoglobulina humana, cadena pesada γ 3 de
 45 inmunoglobulina humana, cadena pesada γ 4 de inmunoglobulina humana, cadena pesada ϵ de inmunoglobulina humana (1) y cadena pesada ϵ de inmunoglobulina humana (2). El segundo ácido nucleico puede derivarse/seleccionarse de entre el grupo de ácidos nucleicos codificantes de la cadena pesada de la inmunoglobulina δ humana, la cadena pesada de la inmunoglobulina γ 1 humana, la cadena pesada de la inmunoglobulina γ 2 humana, la cadena pesada de la inmunoglobulina μ humana, la cadena pesada de tipo α murina, la cadena pesada de tipo γ 1 murina, la cadena pesada de tipo γ 2B murina, la cadena pesada de tipo γ 3 murina y la
 50 cadena pesada de tipo μ murina.

El presente método puede ponerse en práctica, por ejemplo, aunque sin limitación, con el tercer ácido nucleico, en el caso de un ácido nucleico codificante de por lo menos un fragmento de un dominio transmembranal, seleccionado de entre el grupo de ácidos nucleicos codificantes del receptor de C3b/C4b (receptor del complemento de tipo 1) (Hourcade D. et al., J. Exp. Med. 168:1255-1270, 1988), RFCE humano, de pollo y de rata (Callaghan T. et al., Oncogene 8:2939-2948, 1993; Reiter J.L. y Maihle N.J., Nuc
 55 Acids Res. 24:4050-4056, 1996; Petch L. et al., Mol. Cell Biol. 10:2973-2982, 1990), cadena pesada de inmunoglobulina (Ig) α , ϵ , γ y μ (Zhang K. et al., J. Exp. Med. 176:233-243, 1992; Rogers J.E. et al., Cell 20:303-312, 1980; Milcarek C. y Hall B., Mol. Cell Biol. 5:2514-2520, 1985; Kobrin B.J. et al., Mol. Cell Biol. 6:1687-1697, 1986; Cushley W. et al., Nature 298:77, 1982; Alt F.W. et al., Cell 20:293-301, 1980; Peterson M.L., Gene Exp. 2:319-327, 1992), receptor de PLA₂ humano (Ancian P. et al., J. Biol. Chem. 270:8963-8970, 1995), Cek5 de pollo (Connor R.J. y Pasquale E.B., Oncogene 11:2429-2438, 1995), RFCF humano (Johnson D.E. et al., Mol. Cell Biol. 11 (1991) 4627-4634). El tercer ácido nucleico puede seleccionarse de entre el grupo de ácidos nucleicos codificantes de la cadena pesada de la inmunoglobulina (Ig) α (alfa) humana (h), cadena pesada de Ig δ (delta)_h, cadena pesada de Ig ϵ (epsilon)_h, Ig γ 1, γ 2, γ 3 y γ 4 (gamma) humanas, cadena pesada de Ig μ (miu), cadena pesada de Ig de tipo α (alfa) murina, cadena pesada de Ig de tipo δ (delta) murina, cadena pesada de Ig de tipo ϵ (epsilon) murino, cadena pesada de Ig de tipo γ 1 (gamma1) murino,
 65

cadena pesada de Ig de tipo γ 2A (gamma2A) murino, cadena pesada de Ig de tipo γ 2B (gamma2B) murino, cadena pesada de Ig de tipo γ 3 (gamma3) murino y cadena pesada de Ig de tipo μ (miu) murino. El tercer ácido nucleico puede seleccionarse de entre el grupo de ácidos nucleicos codificantes de cadena pesada γ 1 de inmunoglobulina humana, cadena pesada γ 2 de inmunoglobulina humana, cadena pesada γ 3 de inmunoglobulina humana, cadena pesada γ 4 de inmunoglobulina humana, cadena pesada ϵ de inmunoglobulina humana (1) y cadena pesada ϵ de inmunoglobulina humana (2). El tercer ácido nucleico puede seleccionarse de entre el grupo de ácidos nucleicos codificantes de la cadena pesada de la inmunoglobulina δ humana, la cadena pesada de la inmunoglobulina γ 1 humana, la cadena pesada de la inmunoglobulina γ 2 humana, la cadena pesada de la inmunoglobulina μ humana, la cadena pesada de tipo α murina, la cadena pesada de tipo γ 1 murina, la cadena pesada de tipo γ 2B murina, la cadena pesada de tipo γ 3 murina y la cadena pesada de tipo μ murina.

Además del grupo de ácidos nucleicos codificantes de por lo menos un fragmento de un dominio transmembranal, el tercer ácido nucleico puede seleccionarse de entre el grupo de ácidos nucleicos codificantes de un péptido de señal para un anclaje GPI. El grupo de ácidos nucleicos codificantes de un péptido de señal para un anclaje GPI comprende el grupo de ácidos nucleicos codificantes de un péptido de señal para un anclaje GPI derivado de diesterasa alcalina humana, acetilcolina esterasa, fosfatasa alcalina (intestinal, hepática y placentaria), antígeno CAMPATH-1, antígeno carcinoembrionario, CD55, CD59, CD90, contactina-1, antígeno E48, receptores A y B de folato, proteína p137 anclada en GPI, antígeno-3 asociado a la función linfocitaria, proteína de interacción con mDIA, 5'-nucleotidasa, factor activador del plasminógeno uroquinasa, del antígeno LY-6C murino, antígeno LY-6, 5'-nucleotidasa, antígeno OX45, antígeno-2 de células madre, molécula-1 de adhesión celular vascular, antígeno 2 de linfocitos Qa (Qa2); de la trehalasa de conejo, de la proteína brevicana de rata, CD90, proteína glipicano, proteoglicano heparín-sulfato, antígeno MRC OX-45, 5'-nucleotidasa, glucoproteína mayor membranar de gránulos secretorios pancreáticos, proteína RT6.2 de superficie de las células T; de la proteína PHR1 de reparación del ADN de levadura, proteína-1 de superficie anclada con glucosfolípido; de la proteína precursora del amiloide porcino, dipeptidasa; de las diversas proteínas de superficie variantes de *Trypanosoma brucei*, proteína repetitiva ácida policíclica; de la proteína YNat 1.1 de superficie variante de *Trypanosoma congolense*; de la melanotransferrina de pollo, molécula de adhesión celular neutra; de la acetilcolina esterasa de *Torpedo marmorata*; de la proteína priónica de hámster; de la 5'-nucleotidasa bovina; de la proteína Gp64 membranar del mohu mucilaginoso, antígeno específico de pre-espora y de Sgp1 y Sgp2 de calamar.

En la Tabla 1 se proporcionan ejemplos de las secuencias de ácidos nucleicos del segundo ácido nucleico. En la Tabla 2 se proporcionan ejemplos de secuencias del tercer ácido nucleico y de secuencias de aminoácidos correspondientes al tercer ácido nucleico. En la Tabla 3 se listan ejemplos de secuencias de ácidos nucleicos del cuarto ácido nucleico opcional y de las secuencias de aminoácidos correspondientes al cuarto ácido nucleico opcional.

La Tabla 1 lista el sitio 5' donador de procesamiento, el segundo ácido nucleico (alternativamente procesable) y el sitio 3' aceptor de procesamiento. Debido a que la secuencia del segundo ácido nucleico generalmente excede de 1 kb, las secuencias listadas en la Tabla 1 se acortan y muestran aproximadamente los primeros y últimos 100 nucleótidos del segundo ácido nucleico separados por un número referido al tamaño total del segundo ácido nucleico completo. La secuencia completa del segundo ácido nucleico se encuentra contenida en la SEC ID n° proporcionada en el listado de secuencias. El codón de parada se encuentra subrayado.

El sitio donante de procesamiento se proporciona en un formato que comprende la secuencia de consenso precedente del sitio donante de procesamiento y los primeros seis nucleótidos del segundo ácido nucleico separados por una línea vertical (ver también, por ejemplo, Zhang M.Q., Human Mol. Gen. 7:919-932, 1998). De manera similar se proporciona el sitio aceptor de procesamiento listando los últimos 6 nucleótidos del segundo ácido nucleico y la secuencia de consenso del sitio aceptor de procesamiento siguiente, los cuales se separan mediante una línea vertical. Los nucleótidos directamente después (sitio 5' donador de procesamiento) y directamente antes (sitio 3' aceptor de procesamiento) de la línea vertical son el primer y el último nucleótidos del segundo ácido nucleico (procesable). El codón de parada en el segundo ácido nucleico se encuentra subrayado en la Tabla 1.

El segundo ácido nucleico puede unirse directamente al ácido nucleico codificante del polipéptido heterólogo, es decir, el primer ácido nucleico, o con una secuencia de ácidos nucleicos intermedia pequeña (9 a 21 bases) opcional. En una realización, el (quinto) ácido nucleico intermedio opcional se deriva del ácido nucleico que precede al segundo ácido nucleico en el genoma del que se obtiene dicho segundo ácido nucleico.

En la Tabla 2 se listan ejemplos de secuencias del tercer ácido nucleico codificantes de fragmentos de dominios transmembranales y secuencias de aminoácidos de péptidos de señal para los anclajes GPI. Esta secuencia puede encontrarse directamente después o con una secuencia intermedia opcional, es decir, un cuarto ácido nucleico, el sitio 3' aceptor de procesamiento. En la Tabla 3 se listan ejemplos de secuencias del cuarto ácido nucleico y de secuencias de aminoácidos correspondientes al cuarto ácido nucleico.

El ácido nucleico comprende un cuarto ácido nucleico entre dicho segundo ácido nucleico y dicho tercer ácido nucleico. El ácido nucleico puede comprender un quinto ácido nucleico entre dicho primer ácido nucleico y dicho segundo ácido nucleico. Dicho tercer ácido nucleico puede obtenerse de i) el mismo gen u organismo, o de ii) un gen

u organismo diferente ya que dicho segundo ácido nucleico, es decir, dicho tercer ácido nucleico, no se encuentra necesariamente organizado con dicho segundo ácido nucleico en un genoma.

Las secuencias se derivan de genomas o bases de datos disponibles públicamente (por ejemplo el proyecto genoma humano, <http://www.gdb.org/>; bases de datos del genoma del ratón, <http://www.informatics.jax.org/>; SwissProt (<http://www.expasy.org/sprot/>). En caso de no haber anotaciones accesibles, las secuencias se han predicho o se han completado con el software ALOM (ver, por ejemplo, Klein P. et al., Biochim. Biophys. Acta 787:221-226, 1984). En caso de dominios transmembranales completos, la secuencia entre paréntesis se predice con ALOM además de la secuencia de SwissProt proporcionada.

El segundo ácido nucleico puede seleccionarse de entre el grupo de ácidos nucleicos que comprende SEC ID nº 001, 002, 003, 004, 005, 006, 007, 008, 009, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 169, 170, 171, 172, 173. El segundo ácido nucleico del ácido nucleico tal como se informa en la presente memoria puede seleccionarse de entre el grupo de secuencias de ácidos nucleicos de SEC ID nº 001 a SEC ID nº 009. El segundo ácido nucleico puede seleccionarse de entre el grupo de ácidos nucleicos que comprende SEC ID nº 002, 003, 156, 157, 170 y 171. El tercer ácido nucleico del ácido nucleico tal como se informa en la presente memoria puede seleccionarse de entre o es un fragmento de un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo de secuencias de ácidos nucleicos de SEC ID nº 010 a SEC ID nº 018 y de secuencias de ácidos nucleicos codificantes de las secuencias de aminoácidos de SEC ID nº 019 a SEC ID nº 069. El tercer ácido nucleico del ácido nucleico tal como se informa en la presente memoria puede seleccionarse de entre o es un fragmento de un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo de secuencias de ácidos nucleicos de SEC ID nº 010, 011, 012, 013, 014, 015, 016, 017, 018, 160, 161, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 174, 175, 176, y de secuencia de ácidos nucleicos codificantes de las secuencias de aminoácidos de SEC ID nº 019 a SEC ID nº 069 y 162. El tercer ácido nucleico del ácido nucleico tal como se informa en la presente memoria puede seleccionarse de entre o es un fragmento de un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo de secuencias de ácidos nucleicos de SEC ID nº 011, 012, 165, 166, 175 y de secuencias de ácidos nucleicos codificantes de las secuencias de aminoácidos de SEC ID nº 019 a SEC ID nº 036. El tercer ácido nucleico del ácido nucleico tal como se informa en la presente memoria puede seleccionarse de entre o es un fragmento de un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo de secuencias de ácidos nucleicos de SEC ID nº 011, 012, 165, 166 y 175. El cuarto ácido nucleico del ácido nucleico tal como se informa en la presente memoria puede seleccionarse de entre o comprende un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo de secuencias de ácidos nucleicos de SEC ID nº 070 a SEC ID nº 078 y de secuencias de ácidos nucleicos codificantes de las secuencias de aminoácidos de SEC ID nº 079 a SEC ID nº 129.

Tabla 1: Ejemplos de segundos ácidos nucleicos.

proteína	sitio 5' donante de procesamiento	segundo ácido nucleico (ácido nucleico procesable)	sitio 3' donante de procesamiento
cadena pesada δ de inmunoglobulina humana	GCT GTGAGT	GTGAGTCACCCCAGGCCAGGGTTGGGACGGGGACTCTGAAGGGGGCCATAAGGAGCTGGAA ACTAGGCAGGGGTGGCACTGGGCAGGGGCGGG ... (2.77 kb total) ... GACTCGCCGTCAATTCAGCTCCACGGCTGTGCGGGGTGGGTGGAGGGGTAGCCTGGCCCTCATG GGAGCTTCTCACTAGCCCTGTCTCTCCCCAG (SEC ID nº 001)	CCCCAG A
cadena pesada γ 1 de inmunoglobulina humana	CGG GTAAAT	GTAATGAGTGCCACGGCCGGCAAGCCCGGCTCCCCAGGCTCTCGGGTTCGGCGAGGATGCTTGG ACGTACCCCGTGTACATACTTCCAGGCACCC ... (1.3 kb total) ... CCCGCCCGGGCCCTACATCCTGGGTCTGCCACAGAGGGAATCACCCCAGAGGCCCAAGCCAGGG GACACAGCACTGACCAACCCCTTCTCTCCAG (SEC ID nº 002)	GTCCAG A
cadena pesada γ 2 de inmunoglobulina humana	CGG GTAAAT	GTAATGAGTGCCACGGCCGGCAAGCCCGGCTCCCCAGGCTCTCGGGTTCGGCGAGGATGCTTGG ACGTACCCCGTGTACATACTTCCAGGCACCC ... (1.3 kb total) ... CCCGCCCGGGCCCTACATCCTGGGTCTGCCACAGAGGGAATCACCCCAGAGGCCCGAGCCAGCA GACACAGTATTGACCAACCACTTCTCTCCAG (SEC ID nº 003)	GTCCAG A
cadena pesada μ de inmunoglobulina humana	CCG GTAAAC	GTAACCCACCCCTGTACAACGTGTCCTGGTTCATGTCCGACACAGCTGGCACCTGCTACTGACCCCTGG GGCCTGCCACAGGCTCGGGGGCGCTGGCC ... (1.9 kb total) ... GCCTAGGGCCAAAGGGTGGGCTAGAGGATGGGCCCCGGGGGGCTTTGCTGGTGCCACCCAGCC GACCTATTCCCGGTGCTGTCTCTCTCCAG (SEC ID nº 004)	CTGCAG A
cadena pesada de tipo α de Ig murina	CGG GTAAAC	GTAACCCACCAATGTCAGCGTGTCTGTGATCATGTGACAGGGAGATGGCATCTGCTACTGAGCCACC FGCTGTCCCTACTCTGAAATAAATCTGT ... (2.43 kb total) ... CCACTGTCCCAAGCCCAAGGAGGCATAGAAGCAGAAAACCTTAAGTCTGAGCCCCATCCCCATGGG TTGGATCTAGAAGGTCACTATGTCTTACAG (SEC ID nº 005)	TTACAG A

cadena pesada de tipo ε (2) de Ig murina	TTG GTAACA	GTAACACCTCCCTCCATCCCTCCTAGGCCCTCCATGTAGCTGTGGTGGGGAAGTGGATGACAGACATCC GCTCACTGTGTAAACACCAGGAAGCTACCCCAATAAACACTCAGTGCCTGATTAGAGCCCTGGGT ...(1.7kb total) ... ACTGGCTGGTCCACCCCATCCAGAGCTAGACCTCCAGGACCTATGTATTGAAG (SEC ID nº 173)	TTGAAG A
cadena pesada de tipo γ1 de Ig murina	CTG GTAAAT	GTAATGATCCAGTGTCTTTGGAGCCCTCTGGTCTCAGGACTCTGACACCTACCTCCAGCCCTCCCT GTGTAAATAAAGCACCCAGCACTGCCTTGG ... (1.4 kb total) ... CTGCAGCTTTCTCCTGGCCCTCCATACAGCCCTCCTGCCACACAGGGAATGGCCCTAGCCCCACCTTATTG GGACAAACACTGACCCGCTCTCTGTCCAG (SEC ID nº 006)	GTCCAG G
cadena pesada de tipo γ2B de Ig murina	CGG GTAAAT	GTAATGAGCTCAGCACCCACAAAGCTCTCAGGTCTAAGAGACACTGGCACCCATATCCATGCATCCC TGTATAAATAAAGCATCCAGCAAAGCCTGG ... (1.36 kb total) ... AGATCTCTCCTCTGACTTCATGCAGACATGTCTGCCTCAGAGGGAATCTGCCAGCATCAACCATGTGG GGACAAACACTGACTGTCTCTCTGTTCAG (SEC ID nº 007)	GTTCAG G
cadena pesada de tipo γ3 de Ig murina	CTG GTAAAT	GTAATGAGAACACAGCCTAGCCATCTCCTGGGTCTTACAAGACACTGATACCAGCCCTAACCGGTGAA CCTATAAATAAAGCACCCAGAGATGGGACC ... (total 1.47 kb) ... CTGCAGCTTTCTCCTGGCCCTCCATGCAGCCCTCCTGCCACACAGGGAATGGCCCTAGCTCTACCTTGTGG GGACAAACACTGACTTTCTCTGTTCAG (SEC ID nº 008)	GTTCAG A
cadena pesada de tipo μ de Ig murina	CTG GTAAAC	GTAACCCACACTGTACAATGTCTCCTGATCATGTCTGACACAGCCGGCACCTGCTATGTACCATGCTA GGCTCAACCAGGCAGCCCTGGGTGTCCA ... (total 1.86 kb) ... GTCAATACTGGCTAAAGATTCTCCAGAACATCAGGGCACCCCAACCTTATGCAAAATGCTCAGTCAACCC AAGACTTGGCTTGACCCCTCCTCTGTGTCCCTTCATAG (SEC ID nº 009)	TCATAG A
receptor 1 de factor de crecimiento fibroblástico humano	AAG GTACAC	GTACACACTGTAACCTTCTCCTCTCGATGTCTGCTGCTGGCCAGGGGCAC.GGGGGGAGCATGCATTTCCAG GCTTGGGGAGACACAGAGGCAGAGAGCTGGAAGAATGGGCTCCTGCCTGGTGGCCACATCCTGCC CCAGCTTGGAGGGCTGAATCCTCTCAGCTCAGA ... (2kb total) ... CATGGACGGGGCCCTCCAAGCCTGCTAACACCCTGTTCGCACTGACTCAG (SEC ID nº 151)	ACTCAG C
receptor de factor de crecimiento epitelial murino	TGG GTACGT	GTACGTTCAATGGCAGTGGATCTTAAAGACCTTTGGATCTAAGA CCAGAAGCCA TCTCTGACTCCCTCTCACC ...(2.7kb total) ... GTATGGAATG CCCATATTAC CTCTCTGTCTCTCATTECAG (SEC ID nº 152)	TTCCAG G
receptor 1 del complemento humano (C3b/C4b)	AGG GTGAGT	GGGTGAGTTGGCAGCAACATCTCTTGGTTAAGAGTTCAGCACAGCGATAGTACTTTCTAGCCACATC CAGCAAGGAAACTAGGCTATTGCCACCTGCTTTAAGAGGCTTGAAGACA ... (5.7kb total) ... TAGACTTCTCCTGCATGTAAATCCCTCTGGTTGCCACATATGCATGCTGTCAGGAAGTGTAGAGGTA GTACAGCAAAATTTATTTCCATTTTTGCTTTAG (SEC ID nº 153)	CTTTAG G
receptor de interleuquina 4 murina	ACC GTGAGT	GTAGATATCAGGGTGTAGGCTGTGAGGATCTCTACAGCCG ... (1.3kb total) ... GGGGGGCTCCCATTCATGACTGTTTTTCTCCTTTCAG (SEC ID nº 154)	TTGCAG A
cadena pesada α de inmunoglobulina humana	CGG GTAAAC	GTAACCCACCCATGTCAATGTGTCTGTTCATGGCGGAGGTGGACGGCACCTGCTACTGAGCCCGCC CCTGTCCCAACCCTGAATAAATCCATGCTCCCCAAGCAGCCCCACGCTT ... (2.6kb total) ... CCCAAGGAAGCATAGCCGCTGTTCAACAGAGTCTGGCCCTGGCAG (SEC ID nº 155)	TGGCAG G
cadena pesada ε (1) de inmunoglobulina humana	CCG GTAAAT	GTAATGACGTACTCCTGCCTCCCTCCCTCCAGGGCTCCATCCAGCTGTG ... (1.9kb total) ... CGTTGACTGACTGGGACCTGGGTGCCACCCCTCAG (SEC ID nº 156)	CCTCAG G
cadena pesada δ de inmunoglobulina humana	GTG GTAAGT	GTAAGTCACAACCTGGTAAGAGTGTCAAGCAAGGACAGCACTTGGTACCTATGATAGACAAATACCTCT GTTTGGGAAGAGGAGGTCTGCATTGTCTAGATAAGAGGAACACTGTGCTTATCTGTTTCAGTTAAAAAG CAGAACTACATAACAATCTCACCTTTCTACAACACTTAGATTTTTTCAGCCCTCTCCTCTA ... (6.35kb total) ... TTCTGTAGGTTGGAGACCTTCTCATGAGCACTAGTTCTTCCCTAG (SEC ID nº 172)	CCCTAG G
cadena pesada ε (2) de inmunoglobulina humana	CCG GTAAAT	GTAATGACGT ACTCCTGCCT CCCTCCCTCC CAGGGCTCCA TCCAGCTGTG ... (2.1kb total) ... GCCACTGTGG AGCCGGGAGG GCTGACTGGC CAGGTCCCC AG (SEC ID nº 170)	CCCCAG A
cadena pesada γ3 de inmunoglobulina humana	CGG GTAAAT	GTAATGAGTGGCAGGGCCGGCAAGCCCCGCTCCCGGGCTCTC ... (1.3 kb total) ... CCCCAGAGGCCGAGCCGAGGACAGCACTGACCAACCTCTTCTGTCCAG (SEC ID nº 157)	GTCCAG A

cadena pesada γ 4 de inmunoglobulina humana	TGG GTAAAT	GTAATGAGTGCCAGGGCCGCAAGCCCCGCTCCCGGGCTCTCGGGTTCGCGCGAGGATGCTTGG CGTACCCCGTGACATACTTC ...(1.3 kb total) CCCCAGAGGCCCAAGCCAGGGGGACACAGCACTGACCACCCCCTCTCTGCCAG (SEC ID n° 171)	GTCCAG A
cadena pesada de tipo ϵ (1) de Ig murina	TTG GTAACA	GTAACACCTCCCTCCATGCCCTCTAGGCCCTCCATGTAGCTGTGGTGGGAAAGGTGGAGACAGACATCCG CTCACTGTTGTAACACCAGGAAGCTACCCCAATAAACACTCAGTGCCTGATTAGAGCCCTGGGT ...(1.5kb total)... CCACTCTAGCTTCATCAGAACTGCATGAGACAAGTATGGGGTCTACCCCTCCCCACTGTCACTGGAGT CTGGGGAAGCTAACTGGCTGGTCCACCCCATCCAGAGCTAGACCTCAGGACCTATGTATTGAAG (SEC ID n° 158)	TTGAAG A
cadena pesada de tipo γ 2A de Ig murina	TGG GTAAAT	GTAATGAGCTCAGCACACAAATGCTCTGGTCCATATGGACACTGGCACCCATATCCATGCATCCCT TGTATAAATAAAGCACCCAGCAAAAGCCTGGGACCATGTAAAAGTGT ...(1.35kb total)... GAAGGCTCCAGGAAGGCTCTGTGTACCAAGTCAAGGCTGGAGCTCTCTCTCTACTCATGAAACATGTC TGCAATCACAGGGAATCTCTCCAGCAACCAACATGTTGGGACAAACACTGACTGTCTCTCTGTTTCAAG (SEC ID n° 159)	GTTCAG G
receptor 4 de interleuquina humana	ACT GTGAGT	GTGAGTATCAAGAGGCCAAGCAATGTAATCTCCACTCTCCATCTTCCCTG ...(3.1kb total)... GGAGCCCAAGGCTGTACCATGGGTGAOCTCAGCTCATGGCTTCCCTCCCACTCCAG (SEC ID n° 169)	TTCCAG C

Tabla 2: ejemplos de terceros ácidos nucleicos y aminoácidos correspondientes a terceros ácidos nucleicos.

fuelle	secuencia de nucleótidos o de aminoácidos	SEC ID n°
tramo de cadena pesada/transmembranal de inmunoglobulina δ humana	AGCCTGTGGACCACCCTGTCCACGTTTGT GGCCCTCTTCATCCTCACCCCTCCTCTACA GCGGCATTGTCACTTTTCATCAAGGTGAA G	010
tramo de cadena pesada/transmembranal de inmunoglobulina γ 1 humana	GGGCTGTGGACGACCATCACCATCTTCAT CACACTCTTCTGTAAAGCGTGTGCTACA GTGCCACCGTCCACCTTCTTC	011
tramo de cadena pesada/transmembranal de inmunoglobulina γ 2 humana	GGGCTGTGGACCACCATCACCATCTTCAT CACACTCTTCTGTAAAGCGTGTGCTACA GTGCCACCATCACCCTTCTTC	012
tramo de cadena pesada/transmembranal de inmunoglobulina μ humana	AACCTGTGGGCCACCGCCTCCACCTTCAT CGTCTCTTCTCCTGAGCCTCTTCTACA GTACCACCGTCCACCTTGTTCAG	013
tramo de cadena pesada de tipo α /transmembranal de Ig murina	ACTGTGACCTTCCCTCACCCCTCTTCTACT GAGCTTGTCTACAGCACAGCACTCACTG TTACA	014
tramo de cadena pesada de tipo γ /transmembranal de Ig murina	GGGCTCTGGACGACCATCACCATCTTCAT CAGCCTCTTCTGTCTCAGTGTGTGC(TAC AGCGCTGCTGTACACTCTTCAAGGTA	015
tramo de cadena pesada de tipo γ 2B/transmembranal de Ig murina	GGGCTCTGGACGACCATCACCATCTTCAT CAGCCTCTTCTGTCTCAGCGTGTGC(TAC AGCGCCTCTGTACACTCTTC)	016
tramo de cadena pesada de tipo γ 3/transmembranal de Ig murina	GGGCTCTGGACGACCATCACCATCTTCAT CAGCCTCTTCTGTCTCAGCGTGTGCTACA GCGCCTCTGTCCACCTCTTC	017
tramo de cadena pesada de tipo μ /transmembranal de Ig murina	(AACCTGTGGACCACTGCCTCCACC)TTCA TCGTCTCTTCTCCTGAGCCTCTTCTAC AGCACCACCGTCCACCTGTTTCAAGGTG)	018
acetilcolina esterasa/péptido de señal humano sin péptido conector de anclaje GPI opcional	GEAARRPGLPLPLLLLHQLLLLFLSHLRRL	019
fosfatasa alcalina (intestinal) humana/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	DAAHPVAASLPLLAGTLLLLGASAAP	020
fosfatasa alcalina (hepática) humana/péptido de señal de	SSAGSLAAGPLLVALALYPLSVLF	021

ES 2 573 027 T3

anclaje GPI sin péptido conector opcional		
fosfatasa alcalina (placentaria) humana/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	DAAHPGRSWPALLPLLAGTLLLLLETATAP	022
antígeno CAMPATH-1 humano/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	SASSNISGGIFLFFVANAIHLCFCS	023
antígeno carcinoembrionario humano/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	ASGTSPGLSAGATVGIMIGVLVGVALI	024
CD55 (factor acelerador de la degradación) humano/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	SGTTRLLSGHTCFTLTGLLGTLVTMGLLT	025
CD59 humano/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	NGGTSLSEKTVLLLVTPLAAAWSLHP	026
antígeno CD90 (Thy-1) humano/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	CEGISLLAQNTSWLLLLLSLSLLQATDFMSL	027
contactina-1 (CNTN1) humana/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	SGAPTLPSPSLLGLLLPAGILV	028
antígeno E48 humano/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	DLCNEKLHNAAPTRTALAHSALSGLALSLL AVILAPSL	029
receptor A de folato humano/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	SGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS	030
receptor B de folato humano/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	NAGEMLHGTGGLLLSLALMLQLWLLG	031
proteína p137 anclaje a GPI humana/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	ARGLMNGYRGPAMDSEEDMMV'TALHSLTL QTVVIHSLSSVLPGITLAIN	032
antígeno-3 asociado a la función linfocitaria humana/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	SSGHSRHRYPALIPIPLAVITTCIVLYMNVL	033
proteína de interacción con mDIA humano (PID)/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	SGASSLHRHFGLLLASLAPLVLCLSLL	034
5'-nucleotidasa humana/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	STGSHCHGSFSLIFLSLWAVIFVLYQ	035
factor activador del plasminógeno de tipo uroquinasa humano/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	GAAPQPGPAHLSLTITLLMTARLWGGTLLW T	036
antígeno LY-6C proteína de	NAAVPTGASTWTMAGVLLFSLSSVILQTLL	037

superficie celular murina/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional		
antígeno Ly-6 humano ThB/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	NERLVSAAPGHALLSSVTLGLATSLSLLTVM ALCL	038
5'-nucleotidasa murina/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	SAASHYQGSFPLVILSLSAVIFVLYQ	039
antígeno OX45 murino (BCM-1 o Blast-1)/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	SSGVCWTATWLVVTTLIHRILLT	040
antígeno 2 de células madre humanas/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	NFSAAGLGLRASIPLLGLGLLLSLLALLQLSP	041
molécula de adhesión a células vasculares murina/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	AKSFYFICYLCLYLAL	042
proteína brevicán de rata/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	GNSAEGSMPAFLLFLLLQLWDT	043
antígeno CD90 (Thy-1) de rata/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	CGGISLLVQNTSWLLLLLSLSFLQATDFISL	044
proteína glypican de rata/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	SAATRPEPHYFLLFLFTLVLAAARPRWR	045
antígeno OX-45 MRC de rata/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	SSGVHWIAAWLVVTLIIPSILLA	046
5'-nucleotidasa de rata/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	SAASHYQGSEPLIILSFVAVILVLYQ	047
glucoproteína GP2 mayor membranal de gránulos secretorios pancreáticos de rata/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	RNTGFLLAWPTFELPVFLAWLF	048
proteína RT6.2 de superficie de células T de rata/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	SSAGARESCVSLFLVLPVPSLLVQLLCLAEP	049
proteína de reparación de ADN de levadura PHR1/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	SSGVKATQQMSMVKLVSIITIVTAFVGGMS VVF	050
proteína 1 de superficie anclada por glucosfolípido de levadura/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	NAATNVKANLAQVVFTSIISLSIAAGVGFAL V	051

ES 2 573 027 T3

proteína precursora del amiloide porcino/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	ARAAPTTSLGSLMTVSALAILGWSV	052
dipeptidasa porcina/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	SAAPSLHLPPGSLLASLVPLLLLSLP	053
proteína IL Tat 1.1 de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i> /péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	SNSFVIHKAPLFLAFLLF	054
proteína MIT 117a de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i> /péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	DSSILVTKKFALTVVSAAFVALLF	055
proteína MIT 118a de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i> /péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	NGSFLTQKQFAFSVVSAAFVALLF	056
proteína MIT 221 de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i> /péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	SNSFVISKTPLWLAVLLF	057
proteína MITat 1,1000 BC de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i> /péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	DGSFLVNKKFALMVYDFVSLAF	058
proteína MITat 1.5b de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i> /péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	NGSFLTQKQFALMVSAAFVTLFF	059
proteína repetitiva ácida procíclica de <i>Trypanosoma brucei</i> /péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	GAATLKSVALPFAIAAAALVAAF	060
proteína TxTat 1 de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i> /péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	SNSFVINKAPLLLGFLF	061
proteína YNat 1.1 de superficie variante de <i>Trypanosoma congolense</i> /péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	SGSSHGTKAIRSILHVALLM	062
melanotransferrina de pollo/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	AGNKLIQQHLLVITFVPFIILGQLQGLG	063
molécula de adhesión a células neurales de pollo/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	ATLGSPSTSSSFVSLLLSAVTLLLC	064
acetilcolina esterasa de <i>Torpedo marmorata</i> /péptido de señal humano sin péptido	SSSGTSSSKGIIFYVLFSILYLIFY	065

conector de anclaje GPI opcional		
proteína priónica de hámster/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	SSAVLFSSPPVILLISFLIFLMVG	066
5'-nucleotidasa bovina/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	SAGSHCCGSFSLIFLSVLAVIIILYQ	067
proteína membranal Gp64 de moho mucilaginoso/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	SSATTIAFNAFVVFAIVLSVLLF	068
antígeno específico pre-espóra de moho mucilaginoso/péptido de señal de anclaje GPI sin péptido conector opcional	GSASTVVASLSLIIFSMILSLC	069
receptor 1 de factor de crecimiento fibroblástico humano	TGCCCCCTGTACCTGGAGATCATCATCTA TTGCACAGGGGCCTTCTCATCTCCTGCA TGGTGGGGTCCGGTCATCGTCTAC	160
receptor de factor de crecimiento epitelial murino	AAGATACCATCTATGGCACTGGGATTGT GGGTGGCCTCCTCTTCATAGTGGTGGTG GCCCTTGGGATTGGCCTATTCATGCGAA GACGT	161
receptor 1 del complemento humano (C3b/C4b)	THDALIVGTLSGTIFILLIIFLSWILK	162
receptor 4 de interleuquina humana	TTCGAGCAGCACCTCCTGCTGGGCGTCA GCGTTTCTCTGCATTGTCA TCCTGGCCGTCTGCCTGTTGTGCTATGTC AGCATCACCAA-GATTAAG	174
receptor de interleuquina 4 murina	CGCCTTCCACTGGGGGTCACCATCTCCTG CCTCTGCATCCCGTTGTTTTGCCTGTTCT GTTACTTCAGCATTACCAAGATT	163
tramo de cadena pesada/transmembranal de inmunoglobulina α humana	ACCATCACCTTCTCACCCCTCTTCTGCT GAGCCTGTTCTATAGCACAGCACTGACC GTGACC	164
tramo de cadena pesada/transmembranal de inmunoglobulina ε humana	TGGACGTGGACCGGCCTCTGCATCTTCG CCGCACTCTTCTGCTCAGCGTGAGCTAC AGCGCCGCCATCACGCTCCTCATGGTGC AG	165
tramo de cadena pesada/transmembranal de inmunoglobulina γ3 humana	GGGCTGTGGACGACCATCACCATCTTCAT CACACTCTTCTGTTAAGCGTGTGCTACA GTGCCACCGTCACCTTCTTC	166
tramo de cadena pesada/transmembranal de inmunoglobulina γ4 humana	GGGCTGTGGACGACCATCACCATCTTCAT CACACTCTTCTGCTAAGCGTGTGCTACA GTGCCACCGTCACCTTCTTC	175
tramo de cadena pesada de tipo ε/transmembranal de Ig murina	GAGCTGTGGACCAGTATTTGTGTCTTCAT CACCTGTTCTCTGCTCAGTGTGAGCTATG GGGCCACTGTCACCGTCTTC	167
tramo de cadena pesada de tipo δ/transmembranal de Ig murina	GGCCTGTGGCCACAATGTGCACCTTCGT GGCCCTCTTCTGCTCACACTGCTCTACA GTGGCTTCGTACCTTCATCAAGGTA	176

tramo de cadena pesada de tipo γ 2A/transmembranal de Ig murina	GGGCTCTGGACAACCATCACCATCTTCAT CAGCCTCTTCCTGCTCAGCGTGTGTTACA GCGCCTCTGTACACTCTTC	168
--	--	-----

Tabla 3: ejemplos de cuartos ácidos nucleicos y aminoácidos correspondientes a cuartos ácidos nucleicos.

fuelle	secuencia de nucleótidos o de aminoácidos	SEC ID n°
cadena pesada δ de inmunoglobulina humana	ACCTGGCCATGACCCCCCTG ATCCC	070
cadena pesada γ 1 de inmunoglobulina humana	AGCTGCAACTGGAGGAGAGC TGTGCGGAG	071
cadena pesada γ 2 de inmunoglobulina humana	AGCTGCAACTGGAGGAGAGC TGTGCGGAGGCGC	072
cadena pesada μ de inmunoglobulina humana	AGGGGGAGGTGAGCGCCGA CGAGGA	073
cadena pesada de tipo α de Ig murina	AACGTCAAGAGCCACTTTCC TATGTGCTACT	074
cadena pesada de tipo γ 1 de Ig murina	GGCTGCAACTGGACGAGACC TGTGCTGAGGCCAGGACGG GGAGCTGG	075
cadena pesada de tipo γ 2B de Ig murina	GGCTAGACCTGGATGATATC TGTGCTG	076
cadena pesada de tipo γ 3 de Ig murina	AGCTGGAAGTGAATGAGACC TGT	077
cadena pesada de tipo μ de Ig murina	AGGGGGAGGTGAATGCTGA GGAGGAAGGCTTTG	078
acetilcolina esterasa humana	GFTH	079
fosfatasa alcalina humana (intestinal)	ACTT	080
fosfatasa alcalina humana (hepática)	CAPA	081
fosfatasa alcalina humana (placentaria)	AGTT	082
antígeno CAMPATH-1 humana	TSSP	083
antígeno carcinoembrionario humano	ITVS	084
CD55 humano (factor acelerador de la degradación)	SGTT	085
CD59 humano	EQLE	086
antígeno CD90 (Thy-1) humano	KLVK	087
contactina-1 humana (CNTN1)	QVKI	088
antígeno E48 humano	CCQE	089
receptor A del folato humano	AAAM	090
receptor B del folato humano	AMHV	091
proteína p137 anclada por GPI humana	GSRG	092
antígeno 3 humano asociado a la función linfocitaria	TCIP	093
proteína de interacción con mDIA humana (PID)	YGYS	094
5'-nucleotidasa humana	RIKF	095
factor activador del plasminógeno de tipo uroquinasa humana	QYRS	096
proteína antigénica LY-6C de la superficie de las células murinas	EDLC	097
antígeno Ly-6 ThB murino	TDLC	098
5'-nucleotidasa murina	RIKF	099
antígeno OX45 murino (BCM-1 o Blast-1)	DLAR	100
antígeno 2 de células madre murinas	SSFC	101
molécula 1 de adhesión a células vasculares murinas	HLMF	102
proteína brevicán de rata/anclaje GPI	APSS	103
antígeno CD90 (Thy-1) de rata	KLVK	104
proteína glypican de rata	GQKT	105
antígeno OX-45 MRC de rata	TLAR	106
5'-nucleotidasa de rata	RIKF	107
glucoproteína mayor membranal GP2 de gránulos secretorios pancreáticos de rata	NGTP	108
proteína RT6.2 de superficie de las células T de rata	NCLY	109
proteína PHR1 de reparación del ADN de levadura	GSSS	110
proteína 1 de superficie anclada por glucosfolípido de levadura/anclaje GPI	SSKK	111

proteína precursora del amiloide porcino	EPLS	112
dipeptidasa porcina	NYGY	113
proteína IL Tat 1.1 de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i>	NTTG	114
proteína MIT 117a de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i>	NACK	115
proteína MIT 118a de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i>	EKCR	116
proteína MIT 221 de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i>	TTGS	117
proteína MITat 1.1000 BC de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i>	EKCC	118
proteína MITat 1.5b de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i>	EDCR	119
proteína repetitiva ácida procíclica de <i>Trypanosoma brucei</i>	EPEP	120
proteína TxTat 1 de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i>	NTTA	121
proteína YNat 1.1 de superficie variante de <i>Trypanosoma congolense</i>	SHLP	122
melanotransferrina de pollo	QCSG	123
molécula de adhesión a células neurales de pollo	TVIP	124
acetilcolina esterasa de <i>Torpedo marmorata</i>	DGEL	125
proteína priónica de hámster	DGRR	126
5'-nucleotidasa bovina	RIQF	127
proteína Gp64 membranal de moho mucilaginoso	NNVC	128
antígeno específico de pre-espora de moho mucilaginoso	STTT	129

En una realización, el polipéptido es una cadena pesada de inmunoglobulina y el dominio transmembranal es de una cadena pesada de inmunoglobulina. Para la expresión de una inmunoglobulina, el ácido nucleico de la presente invención se introduce conjuntamente con un ácido nucleico codificante de una cadena ligera de inmunoglobulina en una célula huésped eucariótica. Estos ácidos nucleicos pueden encontrarse situados en el mismo ácido nucleico o en ácidos nucleicos diferentes.

En la presente memoria se informa de un vector que comprende el ácido nucleico de la invención, además de una célula eucariótica que comprende el vector tal como se informa en la presente memoria.

La variante soluble del polipéptido heterólogo codificado por el ácido nucleico según la invención puede producirse mediante transfección de una célula eucariótica con el ácido nucleico de la invención, cultivo de la célula bajo condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido codificado por dicho ácido nucleico y recuperación del polipéptido a partir del citoplasma de las células o del medio de cultivo.

Para la preparación de una célula eucariótica tal como se informa en la presente memoria se proporciona un kit. El kit comprende un vector que contiene por lo menos dos sitios de clonación múltiple y un ácido nucleico procesable que se inicia con un sitio 5' donante de procesamiento y se termina con un sitio 3' aceptor de procesamiento, en el que: i) el ácido nucleico comprende un codón de parada traduccional y una señal de poliadenilación, e ii) el ácido nucleico no es eliminado constitutivamente durante el procesamiento del pre-ARNm.

La célula eucariótica puede ser una célula de mamífero. La célula de mamífero puede ser una célula seleccionada de entre el grupo que comprende células CHO, células NS0, células Sp2/0, células COS, células K652, células BHK, células PER.C6® y células HEK.

Los ejemplos, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a comprender la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

Figura 1: Tarjetas de plásmidos del vector pmlgG-A de expresión de slgG/mlgG (A), el vector pmlgGΔ-A de slgG/mlgG (B) y el vector plgG-A de expresión de slgG (C). Los elementos vectores ilustrados se describen en detalle en el texto.

Figura 2: Ilustración esquemática de las estructuras de exón-intrón de los casetes de expresión de cadena

gamma.

A: estructura de la región constante de la cadena gamma 1 en el vector de expresión pmlgG-A. El fragmento de ADN de aprox. 7,2 kb se muestra como una línea negra. Los exones están representados por cajas blancas con sus denominaciones indicadas en la parte superior. La posición del sitio de poliadenilación para la forma secretada [p(A)s] y para la forma unida a membrana [p(A)M] de la IgG se muestra mediante columnas negras. La numeración de los intrones y del 3' UTR se indican en la parte inferior del diagrama. Se muestran las posiciones relativas del sitio de restricción *Sph I* en el intrón 6 y del sitio *Sph I* mutado en el 3' UTR (entre paréntesis).

B: estructura de la región constante de cadena gamma 1-gamma 3- gamma 4 híbrida de aprox. 4,8 kb en el vector de expresión pmlgGΔ-A tal como se ilustra en A. Además, el diagrama indica las regiones derivadas de los tres loci génicos de región constante pesada gamma de inmunoglobulina (IGHG1, IGHG3 e IGHG4).

Figura 3: Correlación entre la secreción de IgG y la señal en superficie celular en clones que expresan mlgG. Seis clones independientes de células Sp2/0-Ag14 transfectadas con el plásmido pmlgG-A (izquierda), pmlgGΔ-A (parte intermedia) o plgG-A a modo de control (derecha) se cultivaron durante 48 horas bajo condiciones definidas. La mediana de intensidad de fluorescencia en la citometría de flujo como medida de la cantidad de IgG unido a la membrana plasmática se representa mediante columnas grises. La concentración de IgG secretada en los sobrenadantes de cultivo celular correspondientes se representa mediante rombos negros.

Figura 4: Gráfico de puntos de FL1/FSC típico para la separación de células en un citómetro de flujo FACS Vantage (BD). El canal R1 comprendía 5,7% de la población de células vivas ilustrada separada anteriormente con un gráfico de puntos de FSC/SSC. Las células que cayeron dentro de R1 se recogieron durante el procedimiento de separación.

Figura 5: Determinación de las tasas de producción específicas. Los clones 5B11, 9B3 y J5-H3 se cultivaron en matraces de agitación durante 92 horas.

A: división celular. En los puntos temporales indicados tras iniciar los cultivos bajo agitación, se realizó un recuento celular de cada clon con un contador celular CASY.

B: producción de IgG. En los puntos temporales indicados (tal como en A), se determinaron las concentraciones de IgG en los sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad de proteína A.

C: tasas de producción específicas. El gráfico de columnas muestra la tasa de producción específica media para cada clon calculada a partir de los recuentos celulares y las mediciones de IgG dentro de las primeras 69 horas (ver la Tabla 2 y el texto para más detalles). Las desviaciones estándares se indican mediante barras de error.

Figura 6: Microscopía de inmunofluorescencia. El clon 5B11 (imágenes 1 y 4), que expresa la slgG secretada y la mlgG unida a membrana; el clon J5-H3 (imágenes 2 y 5), que expresa únicamente la slgG secretada, o las células Sp2/0-Ag14 no transfectadas (imágenes 3 y 6) se marcaron para IgG sobre la superficie celular (imágenes 1 a 3) o IgG intracelular (imágenes 4 a 6) y se registraron las imágenes en un microscopio de fluorescencia Axiophot.

Figura 7: Análisis de ARNm mediante transferencia northern.

A: autorradiografía de una transferencia northern hibridada con sonda A (carriles 1 a 3) o sonda B (carriles 4 a 6) marcadas con [α -³²P]. En cada carril se separaron 10 mg de ARN total aislado a partir del clon 5B11 (carriles 1 y 4), del clon J5-H3 (carriles 2 y 5) o de células Sp2/0-Ag14 no transfectadas (carriles 3 y 6), mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturizante y se transfirieron a una membrana de nilón.

B: ilustración esquemática de las dos isoformas de ARNm codificantes de la cadena pesada de mlgG unida a membrana o slgG secretada. Los exones se representan mediante cajas. Las regiones complementarias a las sondas A y B se marcan mediante barras negras.

Figura 8: Análisis de inmunotransferencia de isoformas de cadena pesada de IgG. Los clones 5B11 (carriles 1 y 4), J5-H3 (carriles 2 y 5) o células Sp2/0-Ag14 no transfectadas (carriles 3 y 6) se extrajeron siguiendo el método de extracción con carbonato alcalino (ver el texto). Las inmunoglobulinas de las fracciones de membrana que contenían proteínas integrales de membrana (carriles 1 a 3) o de las fracciones de SN que predominantemente contenían el contenido soluble de las células (carriles 4 a 6) se purificaron mediante ensayo de interacción ("pull down") con proteína A y se separaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida desnaturizante. Tras la transferencia y el marcaje con un anticuerpo secundario acoplado con peroxidasa de rábano picante, las cadenas pesadas se visualizaron mediante una reacción de quimioluminiscencia. Se indican las cadenas pesadas de slgG secretadas (CP slgG) y las cadenas pesadas de IgG unida a membrana (CP mlgG). El panel inferior muestra un tiempo de exposición corto de una sección de la membrana de transferencia en el panel superior.

Figura 9: Análisis de ARNm mediante transferencia northern. Autorradiografía de las transferencias northern hibridadas con una sonda A (panel izquierdo) o sonda B (panel derecho) marcada con [α -³²P] tal como se muestra en la figura 7B. En cada carril se separaron 10 mg de ARN total aislado a partir de los clones 1A1, 1B6, 1C5 o 1D1 (carriles 1 a 4) y de los clones 1D6, 2D6, KO2 o KO6 (carriles 6 a 9) mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturizante y se transfirieron a una membrana de nilón. El clon "27" expresaba únicamente slgG y se añadió a modo de control (carriles 5 y 10). Se

Figura 10 indican los ARNm de cadena pesada de las isoformas mlgG y slgG.
Tarjeta de plásmidos del vector de expresión plgG-GPI-B de slgG/IgG-GPI.

Descripción de las tablas

- 5 Tabla 1 Ejemplos de segundos ácidos nucleicos.
- 5 Tabla 2 Ejemplos de terceros ácidos nucleicos y aminoácidos correspondientes a terceros ácidos nucleicos.
- Tabla 3 Ejemplos de cuartos ácidos nucleicos y aminoácidos correspondientes a cuartos ácidos nucleicos.
- Tabla 4 Cebador oligonucleótido para la clonación y la mutagénesis en la construcción del vector de expresión de slgG/mlgG 'pmlgG-A'
- 10 Tabla 5 RPS media determinada para cada clon seleccionado basándose en cuatro RPS diferentes calculadas en varios puntos temporales durante la etapa de crecimiento exponencial.
- 10 Tabla 6 La Tabla 4 muestra la distribución de los clones a diferentes niveles de concentración de IgG tres semanas después de depósitos de células individuales en placas de 96 pocillos y el análisis de los sobrenadantes de cultivo celular de 515 clones separados por mlgG y de 550 clones de control mediante ELISA.
- 15 Tabla 7 La Tabla 5 muestra la distribución de los clones a diferentes niveles de concentración de IgG en la segunda selección.
- Tabla 8 Recuento celular de cultivos de agitación los días 0, 1, 2, 3, 4 y 7 de cada clon determinado con un contador celular CASY* TT (Schärfe Systems).
- Tabla 9 Determinación mediante ELISA de la productividad de cultivos bajo agitación durante 10 días.

20 Descripción de las secuencias

- SEC ID nº 001 segundo ácido nucleico derivado de la cadena pesada δ de inmunoglobulina humana
- SEC ID nº 002 segundo ácido nucleico derivado de la cadena pesada γ 1 de inmunoglobulina humana
- SEC ID nº 003 segundo ácido nucleico derivado de la cadena pesada γ 2 de inmunoglobulina humana
- 25 SEC ID nº 004 segundo ácido nucleico derivado de la cadena pesada μ de inmunoglobulina humana
- SEC ID nº 005 segundo ácido nucleico derivado de la cadena pesada de tipo α de inmunoglobulina murina
- SEC ID nº 006 segundo ácido nucleico derivado de la cadena pesada de tipo γ 1 de inmunoglobulina murina
- SEC ID nº 007 segundo ácido nucleico derivado de la cadena pesada de tipo γ 2B de inmunoglobulina murina
- SEC ID nº 008 segundo ácido nucleico derivado de la cadena pesada de tipo γ 3 de inmunoglobulina murina
- 30 SEC ID nº 009 segundo ácido nucleico derivado de la cadena pesada de tipo μ de inmunoglobulina murina
- SEC ID nº 010 tercer ácido nucleico derivado de la cadena pesada δ de inmunoglobulina humana
- SEC ID nº 011 tercer ácido nucleico derivado de la cadena pesada γ 1 de inmunoglobulina humana
- SEC ID nº 012 tercer ácido nucleico derivado de la cadena pesada γ 2 de inmunoglobulina humana
- SEC ID nº 013 tercer ácido nucleico derivado de la cadena pesada μ de inmunoglobulina humana
- 35 SEC ID nº 014 tercer ácido nucleico derivado de la cadena pesada de tipo α de inmunoglobulina murina
- SEC ID nº 015 tercer ácido nucleico derivado de la cadena pesada de tipo γ 1 de inmunoglobulina murina
- SEC ID nº 016 tercer ácido nucleico derivado de la cadena pesada de tipo γ 2B de inmunoglobulina murina
- SEC ID nº 017 tercer ácido nucleico derivado de la cadena pesada de tipo γ 3 de inmunoglobulina murina
- SEC ID nº 018 tercer ácido nucleico derivado de la cadena pesada de tipo μ de inmunoglobulina murina
- 40 SEC ID nº 019 tercer ácido nucleico derivado de AchE humana
- SEC ID nº 020 tercer ácido nucleico derivado de la fosfatasa alcalina intestinal humana
- SEC ID nº 021 tercer ácido nucleico derivado de la fosfatasa alcalina hepática humana
- SEC ID nº 022 tercer ácido nucleico derivado de la fosfatasa alcalina placentaria humana
- SEC ID nº 023 tercer ácido nucleico derivado del antígeno CAMPATH-1 humano
- 45 SEC ID nº 024 tercer ácido nucleico derivado del antígeno carcinoembrionario humano
- SEC ID nº 025 tercer ácido nucleico derivado de CD55 humano
- SEC ID nº 026 tercer ácido nucleico derivado de CD59 humano
- SEC ID nº 027 tercer ácido nucleico derivado de CD90 humano
- SEC ID nº 028 tercer ácido nucleico derivado de contactina-1 humana
- 50 SEC ID nº 029 tercer ácido nucleico derivado del antígeno E48 humano
- SEC ID nº 030 tercer ácido nucleico derivado del receptor A de folato humano
- SEC ID nº 031 tercer ácido nucleico derivado del receptor B de folato humano
- SEC ID nº 032 tercer ácido nucleico derivado de la proteína p137 anclada por GPI humana
- SEC ID nº 033 tercer ácido nucleico derivado del antígeno 3 asociado a función linfocitaria humana
- 55 SEC ID nº 034 tercer ácido nucleico derivado de la proteína de interacción con mDIA humana
- SEC ID nº 035 tercer ácido nucleico derivado de la 5'-nucleotidasa humana
- SEC ID nº 036 tercer ácido nucleico derivado de factor activador del plasminógeno de tipo uroquinasa humano
- SEC ID nº 037 tercer ácido nucleico derivado del antígeno proteína LY-6C de superficie celular murina
- SEC ID nº 038 tercer ácido nucleico derivado del antígeno Ly-6 ThB murino
- 60 SEC ID nº 039 tercer ácido nucleico derivado de la 5'-nucleotidasa murina
- SEC ID nº 040 tercer ácido nucleico derivado del antígeno OX45 murino
- SEC ID nº 041 tercer ácido nucleico derivado del antígeno 2 de células madre murinas
- SEC ID nº 042 tercer ácido nucleico derivado de la molécula 1 de adhesión a células vasculares murinas
- SEC ID nº 043 tercer ácido nucleico derivado de brevicán de rata

	SEC ID nº 044	tercer ácido nucleico derivado del antígeno CD90 de rata
	SEC ID nº 045	tercer ácido nucleico derivado de glypican de rata
	SEC ID nº 046	tercer ácido nucleico derivado del antígeno MRC OX45 de rata
	SEC ID nº 047	tercer ácido nucleico derivado de la 5'-nucleotidasa de rata
5	SEC ID nº 048	tercer ácido nucleico derivado de la glucoproteína mayor membranal GP2 de gránulos secretorios pancreáticos de rata
	SEC ID nº 049	tercer ácido nucleico derivado de la proteína RT6.2 de superficie de las células T de rata
	SEC ID nº 050	tercer ácido nucleico derivado de la proteína PHR1 de reparación del ADN de levadura
	SEC ID nº 051	tercer ácido nucleico derivado de la proteína 1 de superficie anclada por glucofosfolípido de levadura
10	SEC ID nº 052	tercer ácido nucleico derivado de la proteína precursora del amiloide porcino
	SEC ID nº 053	tercer ácido nucleico derivado de la dipeptidasa porcina
	SEC ID nº 054	tercer ácido nucleico derivado de la proteína IL Tat 1.1 de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i>
15	SEC ID nº 055	tercer ácido nucleico derivado de la proteína MIT 117a de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i>
	SEC ID nº 056	tercer ácido nucleico derivado de la proteína MIT 118a de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i>
	SEC ID nº 057	tercer ácido nucleico derivado de la proteína MIT 221 de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i>
20	SEC ID nº 058	tercer ácido nucleico derivado de la proteína MITat 1,1000 BC de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i>
	SEC ID nº 059	tercer ácido nucleico derivado de la proteína MITat 1.5b de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i>
25	SEC ID nº 060	tercer ácido nucleico derivado de la proteína repetitiva ácida procíclica de <i>Trypanosoma brucei</i>
	SEC ID nº 061	tercer ácido nucleico derivado de la proteína TxTat 1 de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i>
	SEC ID nº 062	tercer ácido nucleico derivado de la proteína YNat1.1 de superficie variante de <i>Trypanosoma congolense</i>
	SEC ID nº 063	tercer ácido nucleico derivado de la melanotransferrina de pollo
30	SEC ID nº 064	tercer ácido nucleico derivado de la molécula de adhesión a células neurales de pollo
	SEC ID nº 065	tercer ácido nucleico derivado de AchE de <i>Torpedo marmorata</i>
	SEC ID nº 066	tercer ácido nucleico derivado de proteína priónica de hámster
	SEC ID nº 067	tercer ácido nucleico derivado de la 5'-nucleotidasa bovina
	SEC ID nº 068	tercer ácido nucleico derivado de la proteína membranal Gp64 de moho mucilaginoso
35	SEC ID nº 069	tercer ácido nucleico derivado del antígeno específico de pre-espora de moho mucilaginoso
	SEC ID nº 070	cuarto ácido nucleico derivado de la cadena pesada δ de inmunoglobulina humana
	SEC ID nº 071	cuarto ácido nucleico derivado de la cadena pesada γ 1 de inmunoglobulina humana
	SEC ID nº 072	cuarto ácido nucleico derivado de la cadena pesada γ 2 de inmunoglobulina humana
	SEC ID nº 073	cuarto ácido nucleico derivado de la cadena pesada μ de inmunoglobulina humana
40	SEC ID nº 074	cuarto ácido nucleico derivado de la cadena pesada de tipo α de inmunoglobulina murina
	SEC ID nº 075	cuarto ácido nucleico derivado de la cadena pesada de tipo γ 1 de inmunoglobulina murina
	SEC ID nº 076	cuarto ácido nucleico derivado de la cadena pesada de tipo γ 2B de inmunoglobulina murina
	SEC ID nº 077	cuarto ácido nucleico derivado de la cadena pesada de tipo γ 3 de inmunoglobulina murina
	SEC ID nº 078	cuarto ácido nucleico derivado de la cadena pesada de tipo μ de inmunoglobulina murina
45	SEC ID nº 079	cuarto ácido nucleico derivado de AchE humana
	SEC ID nº 080	cuarto ácido nucleico derivado de la fosfatasa alcalina intestinal humana
	SEC ID nº 081	cuarto ácido nucleico derivado de la fosfatasa alcalina hepática humana
	SEC ID nº 082	cuarto ácido nucleico derivado de la fosfatasa alcalina placentaria humana
	SEC ID nº 083	cuarto ácido nucleico derivado del antígeno CAMPATH-1 humano
50	SEC ID nº 084	cuarto ácido nucleico derivado del antígeno carcinoembrionario humano
	SEC ID nº 085	cuarto ácido nucleico derivado de CD55 humano
	SEC ID nº 086	cuarto ácido nucleico derivado de CD59 humano
	SEC ID nº 087	cuarto ácido nucleico derivado de CD90 humano
	SEC ID nº 088	cuarto ácido nucleico derivado de contactina-1 humana
55	SEC ID nº 089	cuarto ácido nucleico derivado del antígeno E48 humano
	SEC ID nº 090	cuarto ácido nucleico derivado del receptor A de folato humano
	SEC ID nº 091	cuarto ácido nucleico derivado del receptor B de folato humano
	SEC ID nº 092	cuarto ácido nucleico derivado de la proteína p137 anclada por GPI humana
	SEC ID nº 093	cuarto ácido nucleico derivado del antígeno 3 asociado a función linfocitaria humana
60	SEC ID nº 094	cuarto ácido nucleico derivado de la proteína de interacción con mDIA humana
	SEC ID nº 095	cuarto ácido nucleico derivado de la 5'-nucleotidasa humana
	SEC ID nº 096	cuarto ácido nucleico derivado de factor activador del plasminógeno de tipo uroquinasa humano
	SEC ID nº 097	cuarto ácido nucleico derivado del antígeno proteína LY-6C de superficie celular murina
	SEC ID nº 098	cuarto ácido nucleico derivado del antígeno Ly-6 ThB murino
65	SEC ID nº 099	cuarto ácido nucleico derivado de la 5'-nucleotidasa murina
	SEC ID nº 100	cuarto ácido nucleico derivado del antígeno OX45 murino

ES 2 573 027 T3

	SEC ID nº 101	cuarto ácido nucleico derivado del antígeno 2 de células madre murinas
	SEC ID nº 102	cuarto ácido nucleico derivado de la molécula 1 de adhesión a células vasculares murinas
	SEC ID nº 103	cuarto ácido nucleico derivado de brevicán de rata
	SEC ID nº 104	cuarto ácido nucleico derivado del antígeno CD90 de rata
5	SEC ID nº 105	cuarto ácido nucleico derivado de glypican de rata
	SEC ID nº 106	cuarto ácido nucleico derivado del antígeno MRC OX45 de rata
	SEC ID nº 107	cuarto ácido nucleico derivado de la 5'-nucleotidasa de rata
	SEC ID nº 108	cuarto ácido nucleico derivado de la glucoproteína mayor membranal GP2 de gránulos secretorios pancreáticos de rata
10	SEC ID nº 109	cuarto ácido nucleico derivado de la proteína RT6.2 de superficie de las células T de rata
	SEC ID nº 110	cuarto ácido nucleico derivado de la proteína PHR1 de reparación del ADN de levadura
	SEC ID nº 111	cuarto ácido nucleico derivado de la proteína 1 de superficie anclada por glucosfosfolípido de levadura
	SEC ID nº 112	cuarto ácido nucleico derivado de la proteína precursora del amiloide porcino
15	SEC ID nº 113	cuarto ácido nucleico derivado de la dipeptidasa porcina
	SEC ID nº 114	cuarto ácido nucleico derivado de la proteína IL Tat 1.1 de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i>
	SEC ID nº 115	cuarto ácido nucleico derivado de la proteína MIT 117a de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i>
20	SEC ID nº 116	cuarto ácido nucleico derivado de la proteína MIT 118a de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i>
	SEC ID nº 117	cuarto ácido nucleico derivado de la proteína MIT 221 de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i>
	SEC ID nº 118	cuarto ácido nucleico derivado de la proteína MITat 1,1000 BC de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i>
25	SEC ID nº 119	cuarto ácido nucleico derivado de la proteína MITat 1.5b de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i>
	SEC ID nº 120	cuarto ácido nucleico derivado de la proteína repetitiva ácida procíclica de <i>Trypanosoma brucei</i>
	SEC ID nº 121	cuarto ácido nucleico derivado de la proteína TxTat 1 de superficie variante de <i>Trypanosoma brucei</i>
30	SEC ID nº 122	cuarto ácido nucleico derivado de la proteína YNat1.1 de superficie variante de <i>Trypanosoma congolense</i>
	SEC ID nº 123	cuarto ácido nucleico derivado de la melanotransferrina de pollo
	SEC ID nº 124	cuarto ácido nucleico derivado de la molécula de adhesión a células neurales de pollo
35	SEC ID nº 125	cuarto ácido nucleico derivado de AchE de <i>Torpedo marmorata</i>
	SEC ID nº 126	cuarto ácido nucleico derivado de proteína priónica de hámster
	SEC ID nº 127	cuarto ácido nucleico derivado de la 5'-nucleotidasa bovina
	SEC ID nº 128	cuarto ácido nucleico derivado de la proteína membranal Gp64 de moho mucilaginoso
	SEC ID nº 129	cuarto ácido nucleico derivado del antígeno específico de pre-espora de moho mucilaginoso
40	SEC ID nº 130	gen gamma 1 de cadena constante pesada de inmunoglobulina humana (IGHG1) incluyendo los exones entre CH1 y CH3 con todos los intrones intermedios y la región 3' no traducida contigua.
	SEC ID nº 131	secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena y codificada por el plásmido pIgG-A
	SEC ID nº 132	cebador oligonucleótido TM-fw1
45	SEC ID nº 133	cebador oligonucleótido TM-rv1
	SEC ID nº 134	cebador oligonucleótido M1-rv
	SEC ID nº 135	cebador oligonucleótido M2-fw
	SEC ID nº 136	cebador oligonucleótido TM-fw2
	SEC ID nº 137	cebador oligonucleótido TM-rv2
50	SEC ID nº 138	cebador oligonucleótido mutSph1-1
	SEC ID nº 139	cebador oligonucleótido mut Sph1-2
	SEC ID nº 140	gen gamma 1 de cadena constante pesada de inmunoglobulina humana (IGHG1) incluyendo los exones de CH1 a M2 con todos los intrones intermedios, el sitio de poliadenilación para la forma secretada de IgG1 en el intrón 6 y la 3'UTR que contiene el sitio de polidenilación para la forma unida a membrana de IgG1.
55	SEC ID nº 141	secuencias de aminoácidos de la isoforma corta (slgG) codificada por el plásmido pmlgG-A.
	SEC ID nº 142	secuencias de aminoácidos de la isoforma larga (mlgG) de la región constante de cadena y codificada por el plásmido pmlgG-A.
	SEC ID nº 143	gen IGHG1 humano, incluyendo los exones de CH1 a CH3 con todos los intrones intermedios, y la parte 5' contigua del intrón 6, incluyendo el sitio de poliadenilación para la forma secretada de la inmunoglobulina.
60	SEC ID nº 144	secuencias de aminoácidos de la isoforma corta (slgG) de la región constante de cadena y codificada por el plásmido pmlgGΔ-A.
	SEC ID nº 145	secuencias de aminoácidos de la isoforma larga (mlgG) de la región constante de cadena y codificada por el plásmido pmlgGΔ-A.
65	SEC ID nº 146	Secuencia codificada eliminada del plásmido pmlgGΔ-B.

	SEC ID nº 147	secuencia codificada insertada para la generación del plásmido plgG-GPI-B (secuencia de aminoácidos del péptido de señal carboxi-terminal de la fosfatasa alcalina placentaria humana (número de acceso del NCBI: M13077; nucleótidos: 1542-1643))
5	SEC ID nº 148	secuencia de ADN de región constante del casete de expresión de cadena gamma, de CH1 a la 3'UTR del plásmido de expresión plgG-GPI-B
	SEC ID nº 149	secuencia de aminoácidos de la isoforma slgG de la región constante de cadena gamma codificada por el plásmido plgG-GPI-B
10	SEC ID nº 150	secuencia de aminoácidos de la isoforma larga de la región constante de cadena gamma, incluyendo el péptido de señal carboxi-terminal de la fosfatasa alcalina placentaria humana codificada por el plásmido plgG-GPI-B
	SEC ID nº 151	segundo ácido nucleico derivado del receptor 1 del factor de crecimiento fibroblástico humano
	SEC ID nº 152	segundo ácido nucleico derivado del receptor del factor de crecimiento epitelial murino
	SEC ID nº 153	segundo ácido nucleico derivado del receptor 1 del complemento humano (C3b/C4b)
	SEC ID nº 154	segundo ácido nucleico derivado del receptor de la interleuquina 4 murina
15	SEC ID nº 155	segundo ácido nucleico derivado de la cadena pesada α de inmunoglobulina humana
	SEC ID nº 156	segundo ácido nucleico derivado de la cadena pesada ϵ de inmunoglobulina humana (1)
	SEC ID nº 157	segundo ácido nucleico derivado de la cadena pesada γ 3 de inmunoglobulina humana
	SEC ID nº 158	segundo ácido nucleico derivado de la cadena pesada de tipo ϵ de Ig murina
	SEC ID nº 159	segundo ácido nucleico derivado de la cadena pesada de tipo γ 2A de Ig murina
20	SEC ID nº 160	tercer ácido nucleico derivado del receptor 1 del factor de crecimiento fibroblástico humano
	SEC ID nº 161	tercer ácido nucleico derivado del receptor del factor de crecimiento epitelial murino
	SEC ID nº 162	tercer ácido nucleico derivado del receptor 1 del complemento humano (C3b/C4b)
	SEC ID nº 163	tercer ácido nucleico derivado del receptor de la interleuquina 4 murina
25	SEC ID nº 164	tercer ácido nucleico derivado de la cadena pesada α de inmunoglobulina humana
	SEC ID nº 165	tercer ácido nucleico derivado de la cadena pesada ϵ de inmunoglobulina humana
	SEC ID nº 166	tercer ácido nucleico derivado de la cadena pesada γ 3 de inmunoglobulina humana
	SEC ID nº 167	tercer ácido nucleico derivado de la cadena pesada de tipo ϵ de Ig murina
	SEC ID nº 168	tercer ácido nucleico derivado de la cadena pesada de tipo γ 2A de Ig murina
	SEC ID nº 169	segundo ácido nucleico derivado del receptor de la interleuquina 4 humana
30	SEC ID nº 170	segundo ácido nucleico derivado de la cadena pesada ϵ de inmunoglobulina humana (2)
	SEC ID nº 171	segundo ácido nucleico derivado de la cadena pesada γ 4 de inmunoglobulina humana
	SEC ID nº 172	segundo ácido nucleico derivado de la cadena pesada δ de inmunoglobulina murina
	SEC ID nº 173	segundo ácido nucleico derivado de la cadena pesada ϵ de inmunoglobulina humana (2)
	SEC ID nº 174	tercer ácido nucleico derivado del receptor de la interleuquina 4 humana
35	SEC ID nº 175	tercer ácido nucleico derivado de la cadena pesada γ 4 de inmunoglobulina humana
	SEC ID nº 176	tercer ácido nucleico derivado de la cadena pesada de tipo δ de Ig murina

Ejemplos

40 Ejemplo 1

Clonación de fragmentos genómicos y construcción de vectores de expresión eucarióticos de slgG/mlgG

45 a) Construcción del vector de expresión de slgG 'plgG-A'

Para la expresión de una inmunoglobulina con especificidad contra una proteína "A", se construyó el vector 'plgG-A'. Codifica para la forma slgG secretada de la inmunoglobulina y comprende los elementos siguientes (ver la figura 1C):

50 1. Una unidad de transcripción para una cadena pesada gamma (γ) 1 humana, compuesta de:

- el intensificador y promotor tempranos inmediatos procedentes del citomegalovirus humano (CMV_h),
- una región 5' no traducida sintética que incluye una secuencia de consenso de Kozak (Kozak M., Nucleic Acids Res. 15 (1987) 8125-48),
- 55 - una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina que incluye el intrón de secuencia de señal,
- un ADNc de cadena pesada variable de un anticuerpo con especificidad contra una proteína "A",
- un intrón 2 híbrido de cadena pesada de ratón/humana que incluye el intensificador de Ig μ de ratón (región interruptor JH3-JH4) unido al gen de la cadena constante pesada de inmunoglobulina gamma 1 (IGHG1) humana que incluye los exones de CH1 a CH3 con todos los intrones intermedios y la parte 3' no traducida contigua que
- 60 contiene el sitio de poliadenilación para la cadena pesada de la forma secretada de IgG1.

La secuencia de nucleótidos de la región constante de cadena pesada se informa en SEC ID nº 130. La secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena γ y codificada por el plásmido plgG-A se informa en SEC ID nº 131.

65

2. Una unidad de transcripción para una cadena ligera kappa (κ) humana, compuesta de:

- el intensificador y promotor tempranos inmediatos procedentes del citomegalovirus humano (CMV_h),
 - una región 5' no traducida sintética que incluye una secuencia de consenso de Kozak,
 - una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina que incluye el intrón de secuencia de señal,
- 5
- un ADNc de cadena variable κ de un anticuerpo con especificidad contra una proteína "A",
 - el intensificador de Igk del intrón 2 de ratón unido al gen de la región constante κ de inmunoglobulina humana (IGKC), y
 - la región 3' no traducida del gen IGKC humano que contiene el sitio de poliadenilación.
- 10
3. Una unidad de transcripción de neomicina fosfotransferasa como marcador seleccionable para células de mamífero.
4. Un origen de replicación procedente del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*.
- 15
5. Un gen beta-lactamasa que proporciona resistencia a la ampicilina en *E. coli*.

b) Construcción del vector de expresión de slgG/mlgG 'pmlgG-A'

20

Un fragmento genómico de 5,2 kb del locus de la cadena constante pesada gamma 1 de inmunoglobulina humana (IGHG1) que comprendía la parte principal del intrón después del exón CH3 (intrón 6), el exón M1, el intrón después del exón M1 (intrón 7), el exón M2 y la región 3' no traducida contigua (3'UTR), incluyendo la señal de poliadenilación para la forma unida a membrana de la cadena gamma 1, se amplificaron a partir del ADN genómico humano (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) mediante PCR utilizando el sistema de PCR de moldes largos Expand (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) y el cebador oligonucleótido especificado en la Tabla 4.

25

Tabla 4: cebador oligonucleótido para la clonación y la mutagénesis.

Utilización para	Nombre	Secuencia (en dirección 5' a 3')	SEC ID nº
Amplificación de fragmento genómico IGHG1 de 5,2 kb	TM-fw1	GGCCGAGTCTGAGGCCTGAGT GGCATGAGGGAGGCAGAGT	132
	TM-rv1	AAGTGGATCCATGTAGAAAAG AGGAGAAGCCCCGGGGGTCC ATGTAGT	133
Amplificación de fragmento genómico IGHG3 de 1,1 kb	TM-fw1	GGCCGAGTCTGAGGCCTGAGT GGCATGAGGGAGGCAGAGT	132
	M1-rv	GATCCACTTCACCTTGAAGAA GGTGACGGTGGCACTGTAGCA CACGC	134
Amplificación de fragmento genómico IGHG4 de 1,6 kb	M2-fw	CACCTTCTTCAAGGTGAAGTG GATCTTCTCCTCGGTGGTGGGA CCTGAAG	135
	TM-rv1	AAGTGGATCCATGTAGAAAAG AGGAGAAGCCCCGGGGGTCC ATGTAGT	133
Amplificación del fragmento IGHG3-IGHG4 unido	TM-fw2	CTCCAGCAGCAGCTGCCCTGG GCTGGGCCACGA	136
	TM-rv2	CAGGGATCCCCCGAGGTGCAG CTGGACCAGCCTCCTCCTGAC CGTGTTTT	137

Mutación del sitio Sph en el 3'UTR	mutSphI-1	CTACCCCAGACCTCCGCTGCT TGGTGCcTGCAGGGCACTGGG GGCCAGGTGTCCCCTCAGCAG GACGT*	138
	mutSphI-2	CCTGCTGAGGGGACACCTGGC CCCCAGTGCCCTGCAGGCACC AAGCAGCGGAGGTCTGGGGT*	139
* Los nucleótidos alterados para la mutagénesis del sitio <i>Sph</i> se indican en letra minúscula.			

El fragmento amplificado corresponde a los nucleótidos 87203513-87208691 del "contig genómico del cromosoma 14 de *Homo sapiens*" (nº de acceso de NCBI: NT_026437, complemento inverso). La secuenciación del producto de PCR subclonado reveló una identidad de 98 por ciento en comparación con la secuencia del cromosoma 14 correspondiente con todas las diferencias observadas en los intrones o en la región 3' no traducida (3'UTR). El sitio de restricción Sph I situado 219 pb después del codón de parada del exón M2 fue destruido mediante mutagénesis sitio-dirigida basada en PCR utilizando los cebadores oligonucleótidos especificados en la Tabla 2. A continuación, se unió el fragmento con la parte 5' flanqueante del intrón 6 mediante clonación mediante un sitio de restricción *Sph* I en el vector de expresión pIgG-A de la cadena gamma 1 de inmunoglobulina, conduciendo de esta manera a una unidad de transcripción de cadena gamma 1 genómicamente organizada completa. Mediante subclonación se construyó el vector de expresión eucariótico 'pmlgG-A' que codifica para la forma secretada (slgG) y la forma unida a membrana (mlgG) de un anticuerpo con especificidad contra una proteína "A". El plásmido contenía los elementos siguientes (ver también la figura 1A):

1. La unidad de transcripción para una cadena pesada de gamma (γ) 1 humana anteriormente indicada, compuesta de:

- el intensificador y promotor tempranos inmediatos procedentes del citomegalovirus humano (CMV_h),
- una región 5' no traducida sintética que incluye una secuencia de consenso de Kozak,
- una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina que incluye el intrón de secuencia de señal,
- un ADNc de cadena pesada variable de un anticuerpo con especificidad contra una proteína "A",
- un intrón 2 híbrido de cadena pesada de ratón/humana que incluye el intensificador de Ig mu (μ) de ratón de la región interruptor J_H3-J_H4 (Banerji J., et al., Cell 33:729-740, 1983; Gillies S.D. et al., Cell 33:717-728, 1983) unida al gen de la cadena constante pesada gamma 1 de inmunoglobulina (IGHG1), que incluye los exones de CH1 a M2 con todos los intrones intermedios, el sitio de poliadenilación para la forma secretada de IgG1 en el intrón 6 y la 3'UTR que contiene el sitio de poliadenilación para la forma unida a membrana de IgG1.

La organización genómica de la región constante de cadena pesada se ilustra en la figura 2A, la secuencia de nucleótidos se informa en SEC ID nº 140. Las secuencias de aminoácidos de la isoforma corta (slgG) o la isoforma larga (mlgG) de la región constante de cadena γ y codificada por el plásmido pmlgG-A se informan en SEC ID nº 141 o SEC ID nº 142, respectivamente.

2. Una unidad de transcripción para una cadena ligera kappa (κ) humana, compuesta de:

- el intensificador y promotor tempranos inmediatos procedentes del citomegalovirus humano (CMV_h),
- una región 5' no traducida sintética que incluye una secuencia de consenso de Kozak,
- una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina que incluye el intrón de secuencia de señal,
- un ADNc de cadena variable κ de un anticuerpo con especificidad contra una proteína "A",
- el intensificador de Igk del intrón 2 de ratón (Emorine L. et al., Nature 304:447-449, 1983; Picard D. y Schaffner W., Nature 307:80-82, 1984) unido al gen de la cadena constante κ de inmunoglobulina (IGKC) humana, y
- la región 3' UTR del gen IGKC humano que contiene el sitio de poliadenilación.

3. Una unidad de transcripción de neomicina fosfotransferasa como marcador seleccionable para células de mamífero.

4. Un origen de replicación procedente del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*.

5. Un gen beta(β)-lactamasa que proporciona resistencia a la ampicilina en *E. coli*.

c) Construcción de los vectores de expresión de slgG/mlgG 'pmlgGΔ-A' y 'pmlgGΔ-B'

De manera similar a la indicada en el Ejemplo 1b), un fragmento genómico de 1,1 kb del locus de cadena constante pesada gamma 3 de inmunoglobulina humana (IGHG3) que comprende la parte principal del intrón situado después del exón CH3 (intrón 6) y el exón M1 se amplificaron por PCR (para los oligonucleótidos, ver la Tabla 2). El fragmento corresponde a los nucleótidos 87235195-87236300 del "contig genómico del cromosoma 14 de *Homo sapiens*" (nº de acceso de NCBI: NT_026437, complemento inverso), con una identidad de secuencia de 98 por ciento. Todas las diferencias se observaron dentro del intrón, excepto un intercambio de un solo nucleótido dentro del exón M1, que era silencioso y, de esta manera, no modificaba la secuencia de aminoácidos codificada. De manera similar, un fragmento genómico de 1,6 kb del locus de la cadena constante pesada gamma 4 de inmunoglobulina humana (IGHG4) que comprendía el exón M2 y la región 3' no traducida contigua, que incluía la señal de poliadenilación para la forma unida a membrana de la cadena de gamma 4, se amplificaron por PCR (para los oligonucleótidos, ver la Tabla 2). El fragmento corresponde a los nucleótidos 87087786-87089377 del "contig genómico del cromosoma 14 de *Homo sapiens*" (nº de acceso de NCBI: NT_026437, complemento inverso) con una identidad de secuencia de 98 por ciento y todas las diferencias se observaron en el 3'UTR. El sitio *Sph I* situado 212 pb después del codón de parada del exón M2 se destruyó mediante mutagénesis sitio-dirigida basada en PCR. Se unieron ambos fragmentos entre M1 y M2, se amplificaron por PCR (para los oligonucleótidos, ver la Tabla 2) y después se clonaron en el vector de expresión de la cadena gamma 1 mediante un sitio *Sph I* en el intrón 6, conduciendo de esta manera a un casete de expresión híbrida de gamma 1-gamma 3-gamma 4 con una organización genómica sin el intrón entre M1 y M2 (intrón 7). Mediante subclonación se construyó el vector de expresión eucariótico 'pmlgGΔ-A' que codifica para la forma secretada (slgG) y la forma unida a membrana (mlgG) de un anticuerpo con especificidad contra una proteína "A". El plásmido contenía los elementos siguientes (ver también la figura 1B):

1. La unidad de transcripción anteriormente indicada para una cadena pesada híbrida gamma 1-gamma 3-gamma 4, compuesta de:

- el intensificador y promotor tempranos inmediatos procedentes del citomegalovirus humano (CMV_h),
- una región 5' no traducida sintética que incluye una secuencia de consenso de Kozak,
- una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina que incluye el intrón de secuencia de señal,
- un ADNc de cadena pesada variable de un anticuerpo con especificidad contra una proteína "A",
- un intrón 2 híbrido de cadena pesada de ratón/humana que incluye el intensificador de Igu de ratón (región interruptor J_{H3}-J_{H4}) unido al gen IGHG1 humano que incluye los exones de CH1 a CH3 con todos los intrones intermedios y la parte 5' no traducida contigua que contiene el sitio de poliadenilación para la forma secretada de la inmunoglobulina.
- la parte 3' del intrón 6 y el exón M1 del gen humano IGHG3, y
- el exón M2 y la región 3' no traducida que contenía el sitio de poliadenilación para la forma unida a membrana de la inmunoglobulina del gen humano IGHG4.

La organización genómica de la región constante de cadena pesada se ilustra en la figura 2B, la secuencia de nucleótidos se informa en SEC ID nº 143. Las secuencias de aminoácidos de la isoforma corta (slgG) o la isoforma larga (mlgG) de la región constante de cadena y codificada por el plásmido pmlgGΔ-A se informan en SEC ID nº 144 o SEC ID nº 145, respectivamente.

2. Una unidad de transcripción para una cadena ligera kappa humana, compuesta de:

- el intensificador y promotor tempranos inmediatos procedentes del citomegalovirus humano (CMV_h),
- un 5'UTR sintético que incluye una secuencia de consenso de Kozak,
- una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina que incluye el intrón de secuencia de señal,
- un ADNc de cadena variable κ de un anticuerpo con especificidad contra una proteína "A",
- el intensificador de Igk del intrón 2 de ratón unido al gen de la región constante κ de inmunoglobulina humana (IGKC), y
- la región 3' no traducida del gen IGKC humano que contiene el sitio de poliadenilación.

3. Una unidad de transcripción de neomicina fosfotransferasa como marcador seleccionable para células de mamífero.

4. Un origen de replicación procedente del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*.

5. Un gen beta-lactamasa que proporciona resistencia a la ampicilina en *E. coli*.

Mediante el intercambio de las secuencias de ADNc codificantes de las regiones variables de las cadenas gamma y kappa, se construyó el vector de expresión de slgG/mlgG 'pmlgGΔ-B'. Presentaba la misma organización indicada para pmlgGΔ anteriormente, aunque, por el contrario, codificaba para una inmunoglobulina con especificidad contra una proteína "B".

Ejemplo 2

Transfección y análisis de las células Sp2/0-Ag14

5 a) Cultivo y electroporación de células Sp2/0-Ag14

Se cultivaron células de hibridoma Sp2/0-Ag14 (ATCC nº CRL-1581, Shulman M. et al., Nature 276:269-270, 1978) en medio RPMI (Invitrogen Corp., USA) complementado con suero de feto bovino (SFB) al 10% de contenido ultrabajo en IgG (Invitrogen Corp., US) y glutamina 2 mM (Invitrogen Corp., US) a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Para la transfección, las células se electroporaron con 10 µg de ADN plasmídico por cada 10⁶ células en tampón HEPES 20 mM (ácido N-(2-hidroxietil)-piperazín-N'-2-etanosulfónico), pH 7,0, que contenía NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 0,7 mM y glucosa 6 mM a 4°C. La electroporación se llevó a cabo a 220 V y 960 mF con un dispositivo de electroporación Genepulser (Bio-Rad Laboratories Inc., US). Tras la transfección, las células se distribuyeron en placas de 96 pocillos con 5.000 células en 100 µl de medio en cada pocillo. Para la selección de las células transfectadas, se añadieron 500 mg/ml de G418 (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) al medio un día después de la electroporación. Se cambió el medio cada dos a tres días para mantener la presión selectiva. Aproximadamente dos semanas después de la transfección, se aislaron clones de transfectoma a partir de placas de 96 pocillos y se propagaron adicionalmente en recipientes de cultivo apropiados. Para el almacenamiento, se almacenaron aproximadamente 10⁶ células de un clon en dimetilsulfóxido al 10% (Sigma-Aldrich Co., Alemania) en FCS bajo en IgG (Invitrogen Corp., US) y se almacenaron en nitrógeno líquido.

Las transfecciones de cada 10⁶ células con los plásmidos pmlgG-A, pmlgGΔ-A y plgG-A condujeron a 15, 19 y 12 clones independientes, respectivamente. De cada transfección se seleccionaron aleatoriamente 6 clones para análisis adicionales.

25 b) Cuantificación de IgG y análisis mediante citometría de flujo

Se sembraron 10⁵ células de cada clon del Ejemplo 2a) en 2 ml de medio que contenía G418 (tal como se ha indicado anteriormente) en placas de 6 pocillos y se cultivaron durante 48 horas. A continuación, se recolectaron los sobrenadantes y se cuantificó la cantidad de IgG secretada mediante inmunoensayo de fluorescencia de resolución temporal homogénea (HTRF) utilizando el "kit de detección de Fc humano" (CIS Bio international) siguiendo el protocolo del fabricante. Para analizar los anticuerpos unidos a la membrana plasmática mediante citometría de flujo, se lavaron 10⁵ células de cada clon dos veces con STF (solución salina tamponada con fosfato) a 4°C, después se resuspendieron en 50 µl de fragmento F(ab')₂ conjugado con FITC de ratón anti-IgG humana (Dianova, Alemania) diluido 1:50 en PBS que contenía SFB al 1% (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) y se incubaron durante una hora a 4°C en la oscuridad. Tras lavar dos veces con PBS, las células se resuspendieron en PBS y se analizaron con un citómetro de flujo FACSCalibur de BD (BD Biosciences, US). Como medida de la cantidad de IgG unida a la superficie celular, se determinó para cada clon la mediana de la intensidad de fluorescencia.

40 En la figura 3, la mediana de intensidad de fluorescencia en la citometría de flujo se muestra conjuntamente con la concentración de IgG en el sobrenadante de cultivo celular de cada clon. Se observó que para los clones transfectados con pmlgG-A o pmlgGΔ-A (es decir, plásmidos codificantes de tanto la forma slgG como mlgG), una cantidad incrementada de IgG secretada correspondía a una señal elevada de la superficie celular. No se observó dicha correlación para los clones transfectados con plgG-A (es decir, el plásmido codificante de únicamente slgG, la forma secretada del anticuerpo).

Ejemplo 3

Separación de células establemente transfectadas mediante citometría de flujo

50 Para la generación de clones que expresan establemente IgG, se transfectaron 3x10⁶ células Sp2/0-Ag14 con el plásmido pmlgGΔ-B mediante electroporación, tal como se ha indicado anteriormente. Un día después de la transfección, las células se transfirieron a medio de selección con 500 mg/ml de G418 y se cultivaron como un grupo durante aproximadamente dos semanas. Tras la selección, la IgG unida a la superficie de las células transfectadas se marcó y las células con las señales más intensas se separaron mediante citometría de flujo. Por lo tanto, se lavaron 4x10⁶ células del grupo dos veces con medio a 4°C y después se incubaron con fragmento F(ab')₂ conjugado con fluoresceína (FITC) de ratón anti-IgG humana (Dianova, Alemania), diluido 1:50 en medio, durante 20 minutos sobre hielo. Tras dos etapas de lavado con medio, las células se resuspendieron en medio y se transfirieron a un citómetro de flujo FACSVantage de BD (BD Biosciences, US). Se fijó un canal que comprendía células con el 5-6% superior de intensidad de fluorescencia de la población de muestra (figura 4) y se recogieron las células separadas por dicho canal. Las células recolectadas se expandieron mediante cultivo en medio de selección durante varios días. Con estas células se llevó a cabo un segundo ciclo y, seguidamente, un tercer ciclo de separación, tal como se ha indicado anteriormente. En lugar de recolectar las células separadas en forma de grupo, se llevó a cabo una cuarta y una etapa final de separación para las deposiciones de células individuales en placas de 96 pocillos. La deposición condujo a 141 clones independientes de entre los que se seleccionaron 21 para el análisis de la expresión de IgG mediante inmunoensayo de FRTH, tal como se ha indicado en el Ejemplo 2b). Dos clones de entre

ellos, 5B11 y 9B3, que mostraban las tasas de secreción de IgG más altas y, en consecuencia, las señales de superficie celular más fuertes, se adaptaron al crecimiento sin suero en cultivo bajo agitación para la evaluación adicional de su productividad.

5 Ejemplo 4

Determinación de la productividad específica de los clones

10 Para la determinación de su productividad específica, los clones 5B11 y 9B3 se cultivaron bajo condiciones definidas en medio ProCHO 6k (Cambrex Corp., US) complementado con 1x concentrado de colesterol/lípidos (Invitrogen Corp., US), glutamina 4 mM (Invitrogen Corp., US) y 250 µg/ml de G418 (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) en matraces de agitación de 100 ml (Belco, USA). Las células se cultivaron a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad hasta alcanzar una etapa de crecimiento estacionario. En varios puntos temporales durante la etapa de crecimiento exponencial, se determinó el recuento celular de cada clon con un contador celular CASY (Schärfe Systems, Alemania) y se determinó la concentración de IgG en los sobrenadantes mediante cromatografía de afinidad a proteína A (ver posteriormente). Como referencia se cultivo el clon J5-H3 y se analizó bajo condiciones iguales. Este clon se derivó también de la transfección de células Sp2/0-Ag14 y expresa establemente un anticuerpo idéntico a los clones 5B11 y 9B3, aunque sólo la forma secretada. El clon J5-H3 se generó convencionalmente mediante varias etapas de dilución limitante y de subclonación y se seleccionó de entre más de 1.000 clones para satisfacer los requisitos de productividad para un procedimiento de fabricación industrial.

25 Se determinaron las concentraciones de IgG en sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía analítica de afinidad utilizando una unidad de cromatografía Äkta™ Explorer (GE Healthcare, anteriormente Amersham Biosciences, Suecia). Se aplicó un volumen definido de un sobrenadante de cultivo celular a una columna de proteína A-sefarosa, facilitando la unión de IgG a la matriz de afinidad. La columna se lavó con ácido cítrico 100 mM, pH 5,0 y después los anticuerpos unidos se eluyeron con ácido cítrico 100 mM, pH 3,0. Se realizó un seguimiento de la elución mediante registro continuo de la absorción de UV del eluido a 280 nm. Se calculó la concentración de anticuerpo de la muestra a partir de la absorción de UV integrada tras la calibración del sistema con muestras estándares que contenían concentraciones definidas de anticuerpos.

30 Para cada clon se calcularon las tasas de producción específica (TPE) a partir de los recuentos celulares y las concentraciones de IgG en sobrenadantes de cultivo celular mediante la ecuación siguiente:

$$TPE = \frac{\Delta c(IgG)}{c(\text{células}) \cdot \Delta t} \left[\frac{pg}{\text{célula} \cdot \text{día}} \right],$$

35 en la que:

- "Δc(IgG)" es la diferencia entre la concentración de IgG en el sobrenadante al inicio y al final del intervalo de tiempo, en [pg/ml],
- 40 - "c(células)" es la media aritmética del recuento celular del inicio y el final del intervalo de tiempo en [células/ml] y
- "Δt" es la duración del intervalo de tiempo, en [días].

Se determinó una TPE media para cada clon basándose en cuatro TPE diferentes calculadas en varios puntos temporales durante la etapa de crecimiento exponencial (figura 5 y Tabla 5).

45

Tabla 5: determinación de las tasas de producción específicas (TPE).

Clon	forma de IgG expresada	intervalo de tiempo [h]	TPE [pg.célula ⁻¹ .d ⁻¹]	TPE media ± SD [pg.célula ⁻¹ .d ⁻¹]
5B11	slgG, mlgG	0-26,2	16,9	18,3 ± 3,4
		26,2-45,3	22,3	
		45,3-52,7	14,3	
		52,7-68,5	19,6	
9B3	slgG, mlgG	0-25,7	19,9	16,3 ± 5,3
		25,7-45	19,3	
		45-52,4	8,5	
		52,4-68,3	17,4	
J5-H3	slgG	0-26	16,7	18,4 ± 3,7
		26-45,2	17,3	
		45,2-52,6	15,6	
		52,6-68,4	23,8	

Ambos clones separados por mIgG unida a membrana, 5B11 y 9B3, mostraron TPE medias de entre 15 y 20 pg·célula⁻¹·d⁻¹, que es un intervalo que resulta adecuado para fabricar clones a escala industrial. Las TPE de dichos clones son comparables a una TPE que puede conseguirse con un clon obtenido mediante una estrategia convencional laboriosa con la misma línea celular y expresando el mismo anticuerpo (clon J5-H3).

5

Ejemplo 5

Detección de sIgG y mIgG mediante microscopía de inmunofluorescencia

10 Se detectaron los anticuerpos intracelulares y unidos a la superficie celular mediante microscopía de inmunofluorescencia. Para la tinción intracelular, las células unidas a portaobjetos de microscopía recubiertos con poli-L-lisina se fijaron con formaldehído al 2% (v/v) en PBS durante 10 minutos, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,2% (v/v) en PBS durante 10 minutos y se lavaron dos veces con PBS. Los sitios de unión no específicos se bloquearon con ASB (albúmina de suero bovino) al 3% (p/v) en PBS durante 30 min. Las células se lavaron dos veces con tampón de lavado (TL: ASB al 0,2% (p/v), Tween-20 al 0,1% (v/v) en PBS), después se incubaron con fragmento F(ab')₂ conjugado con R-ficoeritrina de cabra anti-IgG humana (Dianova, Alemania), se diluyeron 1:50 en TL durante una hora. Tras lavar cuatro veces con TL y dos veces con H₂O doblemente desionizada, las células se montaron bajo un cubreobjetos y se almacenaron a 4°C en la oscuridad hasta la microscopía. Para la tinción de los anticuerpos unidos a la superficie celular, se lavaron 10⁵ células con ASB al 1% (p/v) en PBS, después los sitios de unión no específica se bloquearon con ASB al 1% en PBS sobre hielo durante 30 minutos. Para el marcaje de IgG, las células se incubaron con fragmento F(ab')₂ conjugado con R-ficoeritrina de cabra anti-IgG humana (Dianova, Alemania), se diluyeron 1:50 en ASB al 1% (p/v) en PBS, durante una hora sobre hielo. Tras lavar tres veces con PBS frío, las células se unieron a portaobjetos de microscopía recubiertos con poli-L-lisina y se fijaron con formaldehído al 2% (v/v) en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar dos veces con PBS, las células se montaron bajo un cubreobjetos y se almacenaron a 4°C en la oscuridad hasta la microscopía. Se realizaron análisis intracelulares y de las células marcadas en superficie en un microscopio de fluorescencia Axiophot utilizando un objetivo Plan-APOCHROMAT 40x/1.0 (Carl Zeiss, Alemania).

15

20

25

30

En el clon 5B11 podían detectarse anticuerpos sobre la superficie celular (figura 6, imagen 1), que es principalmente la forma mIgG, así como intracelular (imagen 4), las cuales son ambas formas de IgG en las rutas de expresión/secreción. En contraste, en el clon J5-H3 sólo pudieron detectarse anticuerpos intracelulares (figura 6, imágenes 2 y 5), ya que este clon no expresa mIgG. No se observó tinción con ambos métodos en la línea celular no transfectada Sp2/0-Ag14 (figura 6, imágenes 3 y 6), ya que estas células no expresan IgG en absoluto.

Ejemplo 6

Detección de isoformas de ARNm de la cadena v mediante transferencia northern

40 Para definir la proporción entre las dos isoformas de cadena pesada que emergen por procesamiento alternativo/poliadenilación del transcrito primario, se analizó mediante transferencia northern el ARN de los clones transfectados establemente. Por lo tanto, se aisló el ARN total a partir de las células utilizando tecnología RNeasy (Qiagen, Alemania). En cada caso seguidamente se fraccionaron 10 µg de ARN total mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturante y se transfirieron a una membrana de nilón utilizando el sistema NorthernMax (Ambio Inc., US). Para la hibridación de la membrana de transferencia, se marcaron dos sondas de ADN diferentes con [alfa-³²P] mediante el método de cebado aleatorio utilizando el kit DECAprime II (Ambion Inc., US). Tal como se ilustra en la figura 7B, la sonda 'A' es complementaria al ARNm de la cadena pesada entre los exones CH1 y CH3 y, de esta manera, se hibrida con ambas isoformas. En contraste, la sonda 'B' únicamente se une al 3'UTR del ARNm de la cadena pesada del mIgG largo. Tras la hibridación y lavado astringente de la membrana, se analizó la misma mediante autorradiografía.

50

La figura 7A representa una autorradiografía de una transferencia northern con ARN total del clon 5B11, el clon J5-H3 y la línea celular Sp2/0-Ag14. La hibridación con sonda 'A' muestra una señal de 1,8 kb predominante en ambos clones expresantes de anticuerpos (carriles 1 y 2), que corresponde al tamaño esperado de la isoforma de ARNm corta que codifica la cadena pesada de la sIgG. En la exposición larga ilustrada también se detectan algunas señales débiles entre 2 y 4 kb. La banda de 3,3 kb, que sólo se observa en el clon 5B11 (carril 1), representa la isoforma de ARNm larga que codifica la cadena pesada de la mIgG, ya que una banda con el mismo patrón de migración se detecta como una única señal al hibridar la membrana con la sonda 'B' (carril 4). La comparación entre las intensidades relativas de señal de las bandas de 1,8 kb y 3,3 kb en el carril 1 sugiere que el transcrito primario del transgén de cadena pesada de anticuerpo se procesa predominantemente para formar la isoforma de ARNm pequeña, dando lugar a la forma sIgG secretada del anticuerpo. Sólo una cantidad menor (menos de 5%) se procesa completamente en la isoforma de ARNm larga, conduciendo de esta manera a mIgG unida a la membrana plasmática.

55

60

Ejemplo 7

Purificación y detección de isoformas de cadena pesada de IgG mediante extracción con carbonato alcalino e inmunotransferencia

5 Para detectar la cadena pesada de mlgG, se extrajeron las proteínas membranales de células establemente transfectadas utilizando el método de extracción con carbonato alcalino desarrollado por Fujiki (Fujiki Y. et al., J. Cell Biol. 93 (1982) 97-102). En cada caso, se lavaron dos veces 10^7 células con PBS y después una vez con NaCl 0,1 M sobre hielo. Tras la resuspensión en 1 ml de Na_2CO_3 0,1 M frío, pH 11,5, las células se rompieron mediante
10 sonicación durante 20 segundos, se incubaron sobre hielo durante 30 minutos y después se centrifugaron durante 60 minutos a $200.000\times g$ a 4°C . Mediante esta etapa las membranas celulares que todavía contenían proteínas integrales de membrana se separaron del contenido soluble. Se recolectaron los sobrenadantes y se añadió Triton X-100 hasta una concentración final de 1% (p/v), N-octil-beta-D-glucopiranosido hasta una concentración final de 60 mM, Tris-HCl, pH 7,4, hasta una concentración final de 50 mM y NaCl hasta una concentración final de 300 mM ("fracción SN"). De acuerdo con lo anterior, los pellets de membranas se resolvieron en 1,1 ml de Na_2CO_3 0,1 M, pH 11,5, Triton X-100 al 1% (p/v), N-octil-beta-D-glucopiranosido 60 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 y NaCl 300 mM. Se eliminaron los componentes insolubles después de dicha etapa, mediante centrifugación durante 10 minutos a $15.000\times g$ y se recolectaron los sobrenadantes como "fracción de membranas". Se llevaron a cabo ensayos de interacción con proteína A para purificar las isoformas de anticuerpo a partir de las fracciones de membranas o SN. Por lo tanto, se incubó cada fracción con 30 ml de volumen de lecho de proteína A-sefarosa (GE Healthcare, anteriormente Amersham Biosciences, Suecia) durante 60 minutos a 4°C , después se lavó cuatro veces con PBS que contenía Igepal CA360 al 0,02% (v/v). Se eluyeron las proteínas unidas a la matriz de proteína A con tampón para muestras de gel de proteínas reductoras a 70°C y se separaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (sistema NuPAGE®, Invitrogen Corp., US). Tras la separación, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno) siguiendo el método de inmunotransferencia semiseca (Ausubel F.A. et al., (editores) Current Protocols in Molecular Biology, vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1995). Las cadenas pesadas de IgG inmovilizadas sobre la membrana se marcaron con anticuerpo policlonales de conejo anti-IgG humana acoplado a peroxidasa de rábano picante (DakoCytomation, DAKO A/S, Dinamarca) y se detectaron mediante reacción de quimioluminiscencia (kit de transferencia western LUMI-Light PLUS, Roche Diagnostics GmbH) en un LUMI-Imager F1 (Roche Diagnostics GmbH).

Pudo detectarse una señal fuerte según la cadena pesada de slgG en la membrana y la fracción SN de ambos clones expresantes de anticuerpos (clones 5B11 y J5-H3, ver la figura 8, carriles 1, 2, 4 y 5). En el caso del clon 5B11, se detectó una proteína adicional que migraba sobre la cadena pesada de slgG (figura 8, carril 1). Esta banda se encontró predominantemente en la fracción de membranas de dicho clon, en la que las proteínas integrales de membrana se encontraban enriquecidas. Representa la isoforma de cadena pesada de mlgG más grande, que presenta un peso molecular calculado 8 kDa superior a la cadena pesada de slgG. Consistentemente no existía ninguna señal correspondiente en el clon J5-H3 (figura 8, carril 2), ya que dicho clon únicamente expresa la forma secretada del anticuerpo.

Ejemplo 8

Cultivo y transfección de células CHO-K1.

45 Se cultivaron células CHO-K1 (ATCC nº CCL-61; Puck T.T. et al., J. Exp. Med. 108:945-956, 1958) que habían sido preadaptadas al crecimiento sin suero en cultivo en suspensión, en medio ProCHO4-CDM (Cambrex Corp., US), complementado con L-alanil-L-glutamina 8 mM (Invitrogen Corp., US) y complemento 1x HT (Invitrogen Corp., US) a 37°C , 5% de CO_2 y 95% de humedad en matraces de suspensión. Cada 3 a 4 días se dividieron las células con 2×10^5 células/ml en medio fresco. Para la transfección, las células se electroporaron con 20 μg de ADN plasmídico por cada $7,5\times 10^6$ células en un volumen total de 200 μl de PBS a temperatura ambiente. Las electroporaciones se llevaron a cabo con un dispositivo de electroporación Gene Pulser XCell (Bio-Rad Laboratories, US) en una cubeta de 2 mm utilizando un protocolo de ondas cuadradas con un único pulso de 160 V durante 15 ms. Para la generación de clones que expresaban establemente IgG, se electroporaron 6×10^7 células con el plásmido pmlgG Δ -B tal como se indica. A continuación, las células se cultivaron como grupo en el medio indicado anteriormente durante aproximadamente dos semanas con 700 mg/ml de G418 (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) añadidos al cultivo un día después de la transfección para la selección de células establemente transfectadas.

Ejemplo 9

60 Separación de células CHO-K1 establemente transfectadas mediante citometría de flujo

Tras la selección, la IgG unida a la superficie de las células transfectadas se marcó y las células con las señales más intensas se separaron mediante citometría de flujo. Por lo tanto, en primer lugar se pasaron 4×10^7 células del grupo a través de una malla de nilón de 40 μm para eliminar los grandes agregados celulares y después se incubaron con Accumax (PAA) durante 15 minutos a 37°C para separar los agregados más pequeños restantes. Las células se incubaron en ASB al 1% (p/v) en medio (ver el Ejemplo 8) durante 20 minutos sobre hielo, después se tiñeron con 10

ng/ml de proteína A Alexa Fluor 488 (Molecular Probes Inc., Invitrogen Corp., US) en un volumen total de 8 ml de medio con ASB al 1% (p/v) durante 30 minutos sobre hielo en la oscuridad. Tras dos etapas de lavado con ASB al 1% (p/v) en medio, las células se resuspendieron en medio y se transfirieron a un separador celular FACSAria de BD (BD Biosciences, US). Se separó la población de células individuales vivas mediante un gráfico de puntos de dispersión directa/lateral (DD/DL). Se definió una subpoblación que comprendía las células con el 5% máximo de intensidad de fluorescencia de las células vivas separadas y se recolectaron aproximadamente 45.000 células de dicha subpoblación (grupo celular separado según mIgG). Como control se recolectaron aleatoriamente aproximadamente 40.000 células de la población de células vivas separadas a partir de DD/DL con independencia de su fluorescencia (grupo celular de control). Los grupos celulares recolectados se expandieron mediante cultivo en medio de selección (ver el Ejemplo 8) durante dos semanas. A continuación, se llevó a cabo un segundo ciclo de separación. Las células del grupo celular separado según mIgG se tiñeron para IgG de superficie celular tal como se ha indicado anteriormente. Utilizando un separador celular FACSAria de BD (BD Biosciences, US), las células con el 4% máximo de intensidad de fluorescencia se separaron de la población de células individuales vivas (separadas mediante el gráfico de puntos de DD/DL). Las células separadas se recolectaron como células individuales en placas de 96 pocillos. A partir del grupo celular de control, se recolectaron aleatoriamente células individuales de la población celular viva no teñida separada mediante DD/DL. Se expandieron los clones de células individuales mediante cultivo en medio de selección (ver el Ejemplo 8) durante tres semanas.

Ejemplo 10

Determinación de las concentraciones de IgG mediante ELISA

Se determinó la concentración de inmunoglobulina en sobrenadantes de cultivo celular mediante un ELISA de tipo sándwich utilizando un fragmento F(ab')₂ biotinilado anti-IgG humana como reactivo de captura y para la detección de un fragmento de anticuerpo F(ab')₂ anti-IgG humana conjugado con peroxidasa.

Se recubrieron placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina (placas de tira de poliestireno recubiertas con estreptavidina Pierce Reacti-Bind™, código nº 15121) con 0,5 µg/ml de fragmento de anticuerpo policlonal de captura F(ab')₂ de cabra anti-IgG humana biotinilado (F(ab')₂<Fcy_h>Bi; Dianova, Alemania, nº de código 109-066-098) (0,1 ml/pocillo) en tampón diluyente (tampón diluyente: tampón de PBS que contenía 0,5% (p/v) de albúmina de suero bovino) mediante incubación durante una hora a temperatura ambiente (TA) bajo agitación. A continuación, las placas se lavaron tres veces con más de 0,3 ml de tampón de lavado (tampón de lavado: PBS que contenía Tween-20 al 1% (p/v)). Se diluyeron en serie (dos veces) sobrenadantes (muestras) de cultivo celular que contenían IgG hasta una concentración de 0,5 a 20 ng/ml en tampón diluyente, se añadieron a los pocillos y se incubaron durante una hora a TA bajo agitación. Se utilizó anticuerpo estándar purificado (0,5 a 20 ng/ml) en tampón diluyente para la generación de una curva estándar de proteínas IgG. Tras el lavado de las placas tres veces con 0,3 ml/pocillo de tampón de lavado, los complejos unidos a anti-Fcy humano se detectaron con un fragmento F(ab')₂ de anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG humana específica de F(ab')₂ (F(ab')₂<Fcy_h>POD; Dianova, Alemania, nº de código 109-036-098). Tras lavar las placas tres veces con 0,3 ml/pocillo de tampón de lavado, las placas se revelaron con solución de sustrato de peroxidasa ABTS® (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) (Roche Diagnostics GmbH, Alemania, nº de código 1684302). Tras 10 a 30 minutos, se midió la absorbancia a 405 nm y a 490 nm frente a un blanco de reactivo (tampón de incubación + solución de ABTS) en un lector de placas TecanSpectrafluorplus (Tecan Deutschland GmbH, Alemania). Para la corrección del fondo, se restó la absorbancia a 490 nm de la absorbancia a 405 nm según la fórmula siguiente:

$$\Delta A = \left(A_{sample}^{405nm} - A_{sample}^{490nm} \right) - \left(A_{blank}^{405nm} - A_{blank}^{490nm} \right)$$

Se calculó el contenido de IgG de las muestras a partir de la curva de estándares.

Ejemplo 11

Cribado y selección de clones de CHO expresantes de mIgG

Tres semanas después de los depósitos de células individuales en placas de 96 pocillos, se analizaron mediante ELISA sobrenadantes de cultivo celular de 515 clones separados según mIgG y de 550 clones de control (ver el Ejemplo 10). La Tabla 6 muestra la distribución de los clones a diferentes niveles de concentración de IgG.

Tabla 6: Cribado mediante ELISA de clones depositados en placas de 96 pocillos

IgG en SN [mg/ml]	clones según mIgG		clones de control	
	nº de clones	% de clones	nº de clones	% de clones
≤ 1	0	0	495	90,0
≤ 2	65	12,6	44	8,0

≤ 3	76	14,8	5	0,9
≤ 4	67	13,0	2	0,4
≤ 5	66	12,8	0	0
≤ 6	58	11,3	1	0,2
≤ 7	35	6,8	0	0
≤ 8	39	7,5	0	0
≤ 9	32	6,2	1	0,1
≤ 10	21	4,1	0	0
≤ 11	16	3,1	0	0
≤ 12	9	1,8	1	0,2
≤ 13	6	1,1	1	0,2
≤ 14	4	0,8		
≤ 15	3	0,6		
≤ 16	2	0,4		
≤ 17	3	0,6		
≤ 18	2	0,4		
≤ 19	1	0,2		
≤ 20	2	0,3		
≤ 21	1	0,2		
≤ 22	1	0,2		
> 22	6	1,2		

Se observó que en los controles, el 90 por ciento de todos los clones mostraban una concentración de IgG de 1 µg/ml e inferior. En contraste, ningún clon separado según mIgG se clasificó en este grupo. Además, en este enfoque, 6 clones alcanzaron concentraciones de IgG superiores a 22 µg/ml, mientras que la concentración de IgG más alta medida en los controles fue de 12,3 µg/ml. Todos los clones separados según mIgG con más de 10 µg/ml y todos los clones de control con más de 3 µg/ml seguidamente se transfirieron a placas de 24 pocillos para un segundo cribado. Los clones se expandieron mediante cultivo en medio de selección (ver el Ejemplo 8) durante 20 días, después las concentraciones de IgG en los sobrenadantes de cultivo celular se determinaron mediante ELISA. La Tabla 7 muestra la distribución de los clones a diferentes niveles de concentración de IgG.

10

Tabla 7: Cribado mediante ELISA de clones depositados en placas de 24 pocillos

IgG en SN [mg/ml]	clones según mIgG		clones de control	
	nº de clones	% de clones	nº de clones	% de clones
≤ 5	2	3,7	3	50,0
≤ 10	1	1,9	1	16,7
≤ 15	2	3,7	1	16,6
≤ 20	1	1,8	1	16,7
≤ 25	5	9,3		
≤ 30	12	22,2		
≤ 35	13	24,1		
≤ 40	7	12,9		
≤ 45	5	9,3		
≤ 50	4	7,4		
≤ 55	1	1,8		
≤ 60	1	1,9		
conc. media de IgG (µg/ml)	31,4		6,1	

Los clones de control mostraron niveles de expresión de hasta 16,8 µg/ml, con una concentración media de IgG de 6,1 µg/ml. En contraste, la expresión media de los clones separados según mIgG fue de 31,4 µg/ml, siendo 58,9 µg/ml la concentración de IgG más alta observada de un clon en este grupo. Los seis clones separados según mIgG con más de 45 µg/ml y los dos clones de control con más de 10 µg/ml seguidamente se transfirieron a matraces de agitación de 125 ml para la evaluación posterior.

15

Ejemplo 12

20

Evaluación de productividad de los clones de CHO seleccionados

Para la adaptación a la agitación, los clones seleccionados del Ejemplo 11 se transfirieron a matraces de agitación de 125 ml y se cultivaron en 25 ml de medio de selección (ver el Ejemplo 8) durante una semana en un agitador giratorio a 150 rpm bajo condiciones estándares (ver el Ejemplo 8). A continuación, para cada clon, en 25 ml de

25

medio ProCHO5-CDM (Cambrex Corp., US), complementado con L-alanil-L-glutamina 8 mM (Invitrogen Corp., US), 1x complemento HT (Invitrogen Corp., US) y 400 µg/ml de G418 (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) se inocularon 1×10^6 células/ml y se cultivaron en matraces de agitación de 125 ml tal como se ha indicado anteriormente. Los días 0, 1, 2, 3, 4 y 7, se determinó el recuento celular de cada clon con un contador celular CASY® TT (Scharfe Systems, Alemania), indicando un crecimiento comparable de todos los clones sometidos a ensayo (ver la Tabla 8).

Tabla 8: recuento celular de los cultivos en matraz de agitación.

clon	recuento celular [10^6 /ml]					
	día 0	día 1	día 2	día 3	día 4	día 7
clones según mlgG						
1A1	1,10	1,15	4,30	5,57	7,46	9,96
1B6	1,10	1,22	4,12	5,60	6,58	8,76
1C5	0,99	1,81	5,59	5,53	6,06	5,76
1D1	0,99	1,58	3,08	5,77	5,39	5,40
1D6	1,11	1,31	5,06	5,70	6,60	8,36
2D6	1,09	1,42	3,37	5,32	5,42	5,12
clones de control						
KO2	1,07	1,42	3,23	4,94	5,06	7,12
KO6	1,03	1,55	5,89	5,56	7,44	8,00

El día 10, se recolectaron los sobrenadantes de cultivo celular y se determinaron mediante ELISA las concentraciones de IgG (ver la Tabla 9).

Tabla 9: determinación mediante ELISA de la productividad de cultivos bajo agitación de 10 días.

clon	IgG en SN [mg/ml]
clones según mlgG	
1A1	47,9
1B6	57,2
1C5	188,9
1D1	151,0
1D6	59,1
2D6	165,6
clones de control	
KO2	56,5
KO6	34,6

Se observó que tres de seis clones separados según mlgG (es decir, los clones 1A1, 1B6 y 1D6) mostraban niveles de expresión de un nivel comparable al de los dos clones de control. Los otros tres clones separados según mlgG (es decir, los clones 1C5, 1D1 y 2D6) mostraron una expresión de IgG marcadamente elevada que era hasta 3,3 veces superior a la observada en los clones de control.

Ejemplo 13

Análisis de transferencia northern de clones de CHO seleccionados

Los seis clones separados según mlgG y los dos clones de control adaptados al crecimiento en matraces de agitación (ver el Ejemplo 12) se analizaron mediante transferencia northern para definir la proporción entre las dos isoformas de cadena pesada que emergían del procesamiento alternativo del transcrito primario. Para la comparación se analizó en paralelo el clon '27'. Este clon se obtuvo mediante transfección estable de células CHO-K1 con un vector de expresión organizado genómicamente para sólo la forma secretada del mismo anticuerpo. Se llevó a cabo la transferencia northern tal como se indica en el Ejemplo 6 en detalle y se muestra en la figura 9.

Ejemplo 14

Construcción del vector de expresión 'plgG-GPI-B' de slgG/IgG-GPI

Para el anclaje a la membrana plasmática de una inmunoglobulina, el dominio transmembranal nativo codificado por la parte 3' del exón M1 y la región intracelular codificada por el exón M2 se sustituyeron por el péptido de señal carboxi-terminal de la fosfatasa alcalina placentaria humana que media en el anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI). Por lo tanto, la secuencia de ADN en el plásmido pmlgGΔ-B (ver el Ejemplo 1c) codificante de los 53 aminoácidos siguientes:

LWTTITIFITLFLSVCYSATVTFFKVKWIFSSVVDLKQTIIVPDYRNMIRQGA (SEC ID nº 146)

se sustituyó por la secuencia de ADN codificante de la secuencia de aminoácidos siguiente del péptido de señal carboxi-terminal de la fosfatasa alcalina placentaria humana (nº de acceso del NCBI: M13077; nucleótidos: 1542-1643)

5 AGTTDAAHPGRSVVPALLPLLAGTLLLLLETATAP (SEC ID nº 147).

La secuencia de ácidos nucleicos de la región constante del casete de expresión de la cadena gamma, de CH1 a la 3'UTR del plásmido de expresión plgG-GPI-B se proporciona en SEC ID nº 148.

10 La secuencia de aminoácidos correspondiente a la isoforma de slgG de la región constante de la cadena gamma codificada por el plásmido plgG-GPI-B se proporciona en SEC ID nº 149.

15 La secuencia de aminoácidos correspondiente a la isoforma larga de la región constante de la cadena gamma que incluye el péptido de señal carboxi-terminal de la fosfatasa alcalina placentaria humana codificada por el plásmido plgG-GPI-B se proporciona en SEC ID nº 150.

Este plásmido permite la expresión de la forma secretada (slgG) y una forma con anclaje GPI de un anticuerpo mediante procesamiento alternativo del pre-ARNm de la cadena pesada (ver la figura 10).

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Método de aislamiento de células productoras de polipéptidos

25

<130> 23748 WO

<150> EP 06010146.6

<151> 2006-05-17

30

<160> 176

<170> Patent In versión 3.2

35

<210> 1

<211> 2767

<212> ADN

<213> Homo sapiens

40

<400> 1

ES 2 573 027 T3

gtgagtcacc	cccaggecca	gggttgggac	ggggactctg	aggggggcca	taaggagctg	60
gaatccatac	taggcagggg	tgggcaactg	gcaggggagg	ggctaggctg	tcctgggcac	120
acaggeccct	tctcgggtgc	cggcaggagc	acagacttcc	cagtactcct	gggcatgga	180
tgtcccagcg	tcacatcctg	ctgtccacac	caagtgtctg	cccaggctgg	ctggcacagt	240
gtaagaggtg	gatacaacct	ctcgccgtgc	cctgaggagt	ggcggtttcc	tccaagaca	300
ttccccacgg	ctgggtgctg	ggcacaggcc	ttccctgggtg	tgaccgtgaa	tgtggtcacc	360
ctgaacagct	gcccctctctg	gggacatctg	actgtccaag	accacagtca	gcacctctgg	420
gagccagagg	ggtctccaga	gacccccaga	tgtcaggctt	gggctcagtg	cccagcgaaa	480
ggtcagcccc	acacatgccc	ataatgggag	cccaccaga	gtgacagccc	ccagcctcct	540
gccaggccca	cccttttccg	cccccttgag	gcatggcaca	cagaccagtg	cgcccactgc	600
ccgagcatgg	cccagtgagg	atgtggtggc	cacgaggggc	tgtacacaca	gcaggaggct	660
gtccgccctg	ctcagggcct	gctgcctatg	ccccagctgt	ccaaccaagg	gaggcatgga	720
agggcccctg	gtgtaagctg	gagccaggca	cccaggcccc	cgcccaccct	gcagagccaa	780
ggaaaggaag	acaccaagt	caacaagggg	cagggctgag	ggctgtccca	ggctcttttg	840
gcccgagggg	ctgccagcag	ccctgaccgg	gcatgggcct	tccccaaaag	cgacctgtg	900
aggtggcctc	acagagaacc	ccctctgagg	acagtgtctg	accctgectg	cctcacacag	960
atgggcccga	cagcagtggg	caacctgggg	ggcagcagcc	caacctgacc	ctgcagggac	1020
tgccccctgc	agcagcagct	gcttctcagt	cccccaacct	ccctgtcccc	gccagagggg	1080
cttccccgaa	gctgcagccc	caacctatgg	ctgcccacct	ggaaccggga	ctccctgtcc	1140

ES 2 573 027 T3

actgccccct ccccttcggg gcccacatctg tgctggggcc caggttcggc ctacagatcc 1200
 ccatcattgc catggcctcc tgaccttgcc tateccacccc caaccaccgg ctccatgctg 1260
 accctccccc aggctcccac gccagctgg cggccatcc ccaggcacag acagtctggg 1320
 atctcacagg ttagcctgga ccatccacct ggccagacct gggagaggct ggaagctgcc 1380
 ctgccaccat gctccagggc cccaggttgc agtactatgg ggtgaggggtg tgtgtgcaca 1440
 cctgtgtgta cctaggatat ccgagtgtac ccttgtgccc ccaagcacia gtctccctcc 1500
 caggcagtga ggcccagatg gtgcagtgg tagagctgag gcttatccca cagagaaccc 1560
 tggcgccttg gtcaaggaag cccctatgcc tttcttgcc cgatttcccc tcttgtctgc 1620
 tgagccagca ggggccacgt cctgggctgc tgtgaggagg aagcaagttg gtgctaggag 1680
 gggctcctgt gtgtgcatgg gcgggagggg tgcaggtatc tgagcacccc ggtctccact 1740
 tgagagagca gggcaggagc tccctgaccc acccagacta cacacgctgt gtccacgtgt 1800
 ctcccattat ctgtggcaga ggatccggct tctttctcaa tttccagttc ttcacaaagc 1860
 aatgcctttg taaaatgcaa taagaaatac tagaaaaatg atatgaacag aaagacacgc 1920
 cgattttttg ttattagatg taacagacca tggcccatg aaatgatccc ggaccagatc 1980
 cgtccacacc cgccactcag cagctctggc cgagctcaca gtacaaccac aataaactct 2040
 tgttgaatga actctaggaa gtctgtgacg tggctggttc ttgtcaatgc ttctgctg 2100
 cccacaggct ctctctctg gatggggctg tgcttgccac ggaagcgcgt ttttccggc 2160
 ctaggcttgc ctggggcccc actgcccgtct ccagctggag atgaccttct atacacacat 2220
 ttgctcatga cagacccttg cttagccccc ttccatggct ccctctgct gctgggataa 2280
 aatcaccttg cctggatata ccctcctggg cccctttcca ccctccttag tcagcacccc 2340
 cagttcaggg cacctgcttt ccccgcctgcg gagaagccac tctctcttg ctgcccggct 2400
 gtgtcttgc ttccacacct tgtcacagtg gccacttct aaggaaggcc tccctgtgtg 2460
 caggtgtgca gaagtgcccc agcctcccgt cacctttgtc acgggagccc aatccatgag 2520
 agtctatgg tctgtctgtc tgccccactc agggcagcga caagtcagg cggggaggac 2580
 acagtaggca gagatttgtc gaggggacat atgagcaaga gggtagggct gggagctccc 2640
 tggagataac cacgcctcct ggggaagactc gccgtcattt cagctccacg ctgtgcgggg 2700
 gtgggtggag gggtagcctg gccctcatga ccaggagct tctcactcag cccctgttcc 2760
 tccccag 2767

<210> 2
 <211> 1287
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

ES 2 573 027 T3

<400> 2
 gtaaagt gacacggccg gcaagcccc gctccccagg ctctcgggggt cgcgcgagga 60
 tgcttggcac gtaccccgtg tacatacttc ccaggcacc agcatggaaa taaagcacc 120
 agcgcctccc tgggcccctg cgagactgtg atggttcttt ccacgggtca ggccgagtct 180
 gaggcctgag tggcatgagg gaggcagagt gggctccact gtccccacac tggcccaggc 240
 tgtgcaggtg tgccctgggccc gcctaggggtg gggctcagcc aggggctgcc ctccggcaggg 300
 tgggggattt gccagcgtgg ccctccctcc agcagcagct gccctgggct gggccacgag 360
 aagccctagg agcccctggg gacagacaca cagcccctgc ctctgtagga gactgtcctg 420
 ttctgtgagc gccctgtcct ccgacccgca tgcccactcg ggggcatgcc tagtccatgt 480
 gcgtagggac aggcctccc tcacctctt acccccacgg cactaacccc tggcagccct 540
 gccagcctc gaccccgcat ggggacacaa ccgactccgg ggacatgcac tctcgggccc 600
 tgtggagaga ctggtccaga tgcccacaca cacactcagc ccagaccctg tcaacaaacc 660
 ccgactgag gttggccggc cacacggcca ccacacacac acgtgcacgc ctcacacag 720
 gagcctcacc cgggccaacc gcacagcacc cagaccagag caaggtcctc gcacacgtga 780
 aactcctcg gacacaggcc cccacgagcc ccacgcggca cctcaaggcc cacgagccgc 840
 tggcagctt ctccacatgc tgacctgctc agacaaacc agcctcctc tcacaagggtg 900
 cccctgcagc cgccacacac acacagggga tcacacacca cgtcacgtcc ctggccctgg 960
 cccactccc agtgccgccc ttccctgcag ctggggctac atgaggtgtg ggcttcacca 1020
 tctcctgcc ctctgggctt cagggagggg cacgggagac ggggagcggg tctgctgag 1080
 ggccaggctg ctatctaggg ccgggtgtct ggctgagccc cggggccaaa gctggtgccc 1140
 agggcgggca gctgtgggga gctgacctca ggacattggt ggccatccc ggccgggccc 1200
 tacatcctgg gtctgccac agaggggaatc acccccagag gcccaagccc agggggacac 1260
 agcactgacc accccttcc tgtccag 1287

- 5 <210> 3
- <211> 1301
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

10 <400> 3
 gtaaagt gacacggccg gcaagcccc gctccccagg ctctcgggggt cgcgcgagga 60
 tgcttggcac gtaccccgtc tacatacttc ccgggcacc agcatggaaa taaagcacc 120

ES 2 573 027 T3

agcgctgccc tgggcccctg cgagactgtg atggttcttt ccgtgggtca ggccgagtct 180
 gaggcctgag tggcatgagg gaggcagagc gggttccact gtccccacac tggcccaggc 240
 tgtgcaggtg tgccctgggccc gcctaggggtg gggctcagcc aggggctgcc ctccggcaggg 300
 tgggggattt gccagcgtgg ccctccctcc agcagcagct gccctgggct gggccacggg 360
 aagccctagg agcccctggg gacagacaca cagcccctgc ctctgtagga gactgtcctg 420
 tcctgtgagc gccctgtcct ccgacctcca tgcccactcg ggggcatgcc tagtccatgt 480
 gcgtaggggac agggcctccc tcacccatct acecccaagg caetaacccc tggtgcct 540
 gcccagcctc gcacccgcat ggggacacaa ccgactccgg ggacatgcac tctcgggccc 600
 tgtggagggga ctgggtccaga tgcccacaca cacactcagc ccagaccogt tcaacaaacc 660
 ccgcgctgag gttggccggc cacacggcca ccacacacac acgtgcacgc ctcacacagc 720
 gagcctcacc cgggcgaacc gcacagcacc cagaccagag caaggctctc gcacacgtga 780
 aactcctca gacacaggcc cccacgagcc ccacgcggca cctcaaggcc cacgagccgc 840
 tcggcagctt ctccacatgc tgacctgctc agacaaaacc agccctctc tcacaagggtg 900
 cccctgcagc cgccacacac acacaggccc ccacacacag gggaacacac gccacgtcgc 960
 gtccctggca ctggcccact tcccaatgcc gcccttccct gcagctgagg tcacatgagg 1020
 tgtgggcttc accatcctcc tgcctctggt gcctcagggg gggacacagg agatggggag 1080
 cgggtcctgc tgagggccag gtcgctatct agggctgggt gtctggctga gtcccggggc 1140
 caaagctggt gccaggggca ggcagctgtg gggagctgac ctcaggacac tgttgccca 1200
 tcccggccgg gccctacatc ctgggtcctg ccacagaggg aatcaccccc agaggcccga 1260
 gccagcagg acacagtatt gaccaccac ttctgtcca g 1301

<210> 4
 <211> 1914
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 4

gtaaaaccac cctgtacaac gtgtccctgg tcatgtccga cacagctggc acctgctact 60
 gaccctgctg gcctgcccac aggctcgggg cggtggccg ctctgtgtgt gcatgcaaac 120
 taaccgtgtc aacgggggtga gatgttgcac cttataaaat tagaaataaa aagatccatt 180
 caaaagatac tggtcctgag tgcaacgatgc tctggcctac tgggggtggcg gctgtgctgc 240
 acccaccctg cgctccctcc gcagaacacc ttctccaca gccccaccc ctgcctcacc 300
 cacctgcgtg cctcagtggc ttetagaaac cctgaattc cctgcagctg ctcacagcag 360

10

ES 2 573 027 T3

gctgacctca gacttgccat tcctcctact gcttcagaa agaaagctga aagcaaggcc 420
acacgtatac aggcagcaca caggcatgtg tggatacaca tggacagaca cggacacaca 480
caaacacatg gacacacaga gacgtgctaa cccatgggca cacacataca cagacatgga 540
cccacacaca aacatatgtg gacacacatg taaaaacatg cacaggcaca caaagagaac 600
actgactaca ggacacacaca cacacgggca cactaccac aggacacaaa cagatggaca 660
cgcgtacaca gacatgcaca cacccacagg cacaacacgt gcgcatgccg gccggccccc 720
gccacattc tcccagggcc ctgccggata ctctgtccct gcagcagttt gctccctgag 780
ctgtgctgga cccggggctt tgggccagg ctctgctgt ccttctgtct ctgcttggag 840
gtgctgccat ggacaccagc ttgggctctg cctggggagc ggaggcccca gggatagcat 900
gtgaccctg ctgaggccag gtcctgatg aaggcagcag atagcccca cacccaccgg 960
tgagcagaac cagagcctgt gccatgtgct gagagcaggc agtgactaag catatgggcc 1020
cagagggcag agtggctgcc ctgggcagct gctcctctta gcaggaggcc tcaggagatg 1080
agctagagca agtctgcccc tgcaaatacc acctgctccc caaccacag cagggagcag 1140
gcgaggtcag acagcagcag cccgggaagg accgagcccc agcaggggaag gcagggcccc 1200
agtgaggtct ccacacccaa cgcacagtgc tgtctctaac tggggccacc tccgagctcc 1260
cgccacactc ttggcccttt ggagtccctg gctccaggtg tctcccaagg gcccatctgt 1320
gcaggggatg caaccccccg aatgtcctca tcccactgtg gagctcaggt ctctgtctgc 1380
tcctgggtc ctggcagggg aggacaagtc cgccaggatg tcccctatgca gactctgctc 1440
caagagggag ctggagagtc agggccttgg tgagggagtc aggatcgggt tccccccagc 1500
tcagtctccc cacctgccag cccccacagc acagggcagg gccacacccc ctgcttcccc 1560
ctccaggaga gtcaggacat gctggccgct gctccgctgg ggccccgcc tccagcccc 1620
accttggctc gtgtgctgca tcccccaagc tctctctgcc accccaggac tctgaggaaa 1680
agacctcaga gtcccagccc tgcccagcct cggcctgtgc ccccgtgca tcaggcttcc 1740
aggggcccag cccatgcctt gggcagtgcc cgagcccccc tgcacttgcct ctccccaccc 1800
ctgggtgcag cacagcctag gggccaaggg tgggcctaga ggatgggccc cgggggggct 1860
ttgctgggtg ccaccccagc ctgacctat tccccctgct tgtgtctcct gcag 1914

<210> 5
<211> 2432
<212> ADN
<213> Mus musculus

5

ES 2 573 027 T3

<400> 5

gtaaaccac	caatgtcagc	gtgtctgtga	tcatgtcaga	gggagatggc	atctgctact	60
gagccaccct	gcctgtccct	actcctgaaa	taaactctgt	gctcatccaa	agtatccctg	120
cacttccatc	cagtgcctgt	ccatcatcct	tagggctctac	agaacacagg	gaggggtcag	180
ggcccagggg	gggagaaaca	ccaccaccta	agcttgtaag	gcctcggaga	ctttgaagac	240
ccttcatgcc	tagagtatat	gtgtatgcat	gtctatgtat	tggtgagtgc	ttatggatgg	300
gtccatgtgc	cttcatgtgt	gtacctgtgt	gcagcaagag	aggagtgagt	ttgtgtgcac	360
ctatggttta	taggtatgta	tatgggtata	agtacatatg	tggacacact	atatctatgt	420
ccctgtgagc	aagtgtgtgc	ctgtgcatac	ctatgagcat	gcatatatct	atgtgtgttc	480
atgttgggtg	aaacatgaga	gtgtgtgcac	ctgccctgtg	aatgtgcaat	gagtgaatgg	540
gaagtaagaa	taaactgggg	atgaaatcca	agggcagcag	actcagccaa	gaaggcaaag	600
ctcatgggag	agtccccagg	gcagtggggt	gctgcacaag	tactctgagt	ggtgggtggt	660
gtggctgttt	attagaccgc	agcttctaac	ccaaacaaga	cagggataga	tggagcaaaa	720
gggtagcacc	atcaaggctg	gtgccgtgtg	ggggtcacaa	tagagatgat	ggtatgagaa	780
tgaagggatg	aacacagggg	cactgggaag	aagatgccac	gcaccctcag	taggccatcc	840
ctgaatggaa	acatgcattc	agggtgacca	ctgactcatg	agaaagacat	atagcatggc	900
acagacaacc	ctcagcagca	ccctgctcct	cacacatgca	catgggcata	caccctgttc	960
tgcatacatg	cacatgggca	tacatgcaca	gacactcaca	tttgcacact	cacacagacc	1020
tgaaccctgg	aggaagatga	agttcacagc	ccacaccag	cttctggaaa	gcaaggggag	1080
tccccccaa	gccccggga	gaatttccag	gcccgacact	gacaactaca	cacaatggac	1140
aagggcatag	gccccccag	gtgccccctt	tctaacctaa	gtctcccttc	ccatcctgag	1200
cccaagtatc	acaaaccaga	agcaggataa	gaggcaaatc	tgggaagaag	caggagcagg	1260
ccatggagac	cactcccaca	caggcctcgg	cctcctccat	gggcaccctc	agaacacaaa	1320
gttctacaac	caggtatact	tggagcccag	gtgtccacaa	gagggcagtg	ggggccctgc	1380
tectgtctca	caggccttca	gaacttcggg	gggggggggg	aggagttgct	ggtttctagc	1440
aacttccctc	tgctctcaga	gcaagagtgg	agtaaaggcc	catgcatgcc	ctggatactc	1500
tccagcttga	aagtccagtt	ccctgagaat	agcaagagca	acagaccagc	ttgggaaacc	1560
tgactcagaa	aagtaccata	gccacccatg	gaatccaagg	cctggcccat	gacagagaat	1620
cctagtaagg	aggagtcaat	aggtgaaaga	ctgaatcccc	acagggagag	ggggcagaga	1680
agctggagaa	tcacgatagt	cgggaaagat	gatgagtgag	cggctggagg	gtaatggatg	1740
gctggctaca	aggatgaacg	atggggatga	tggatggatt	gatggatggc	tgcagtgaca	1800

ES 2 573 027 T3

gaaatacgag tggttgacta tcagtacaca tttcctactg ccacttaaaa tgaaactctg 1860
 tgcgcagaga acctgaggac agcaggggtg gctctactgg gggctcttac tgttgcttaa 1920
 cccccagtca cagctcttaa gaatgcaaca gagtcctctg accacatgtc caggccttgg 1980
 tagtctaact ttggcccaga aatcacattg gcctgtatct gtttgaaggt gtctgatctt 2040
 acacaaccct agtacccaag ccaagattag cctaagaact ggggtttagg gaggtattgc 2100
 taaatatcta gaaaggactg agacctaagg agccttgggt tcaaactctt ctgagagttt 2160
 gacagaaaca actctcttac catgacaggt ctctaattaa ggtttcccta agagagagag 2220
 atgggtcttg gggccatctc aagaactgct gggattccag tcccttacct gggaccctgc 2280
 ctctcatta tccctgaaca agtcccttcc cgggaataag ggaccctac caccactgtc 2340
 cccaaagccc aaggaggcat agaagcagaa accttaagtc tgagcccca tcccctggg 2400
 tttggateta gaaggatc tctgtcttac ag 2432

5 <210> 6
 <211> 1411
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 6
 gtaaattgatc ccagtgtcct tggagccctc tggctctaca ggactctgac acctacctcc 60
 accctccct gtgtaaataa agcaccagc actgccttgg gaccctgcaa taatgtctg 120
 gtgatttctg agatgtagag tctagctagg tcatggaatg aggggtctcc atggtttgag 180
 gcctgagttg tgactaagga aaaaccata ggctacact gccacacca gcacttttga 240
 atttgctga catgaaaaga atttacctct cctggaaag tggagcctta tccctaggca 300
 gttcccttac cagaccttcc tctagcttgc actttgttct gggcacagaa tgtgtctaac 360
 ccccaaagc aaggaagaca caacctctac ctccctcact ctgtccttac ccctttcct 420
 ggctaagcat ctactgagt gcgctgaata gatgcatgtg gccacagtct tgcagacaga 480
 cccttgccat ctctccactc agctttccag aggctaagtc tagcccgtat ggtgataatg 540
 cagggagctc tatgtatctc cagtgtatc agactcccaa gtggaggatg aacatggacc 600
 cattaanaacc aacctgcgca gcaacaccct gccataagg cccgtatgtg aaaatgtgca 660
 cacatctaca catgcacagg cacacacaca cacacatgca tgggcacaca cacatacaga 720
 gagagagaat cacagaaact cccatgagca tctatacag tactcaaaga taaaaggta 780
 ccaggtctac ccacatgatc atcctcggca tttacaagtg ggccaactga tacagataaa 840
 10 acttttctat gccaggagc ccaacatata cacaagtccg ctcatgacaa atctgtccct 900

ES 2 573 027 T3

gaacctcaga ctggcgcccc tgactcatac agtggacact cctccaaagc tgtatagctt 960
 cctttacttc cctgtgtgta ctttctctga agtacactca tcacacagaa gaggccctgt 1020
 gattactctg gccctctggt cttggtcate agagaataga cagaagatca ggcaaaactac 1080
 acagacactt cccacaatca tcacaggccc tgactctgct ctccagtctc aaaactgaag 1140
 gctggagcac acagaataag ctectgcaca ggccaggcca gtatcggggtc cagtgtgtct 1200
 gactgagccc agggacaaaa tggcagcact ttggggaact gaggtttctg gtccaagaag 1260
 gagagatgga ggcccagggg gggctctgctg acccagccca gccccagccca gctgcagctt 1320
 tctctggggc ctccatacag cctcctgcca cacagggaat ggccttagcc ccaccttatt 1380
 gggacaaaaca ctgaccgccc tctctgtcca g 1411

<210> 7
 <211> 1357
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 7
 gtaaatgagc tcagcaccca caaagctctc aggtcctaag agacactggc acccatatcc 60
 atgcatccct tgtataaata aagcatccag caaagcctgg taccatgtaa aactgtcctg 120
 gttctttcca aggtatagag catagctcac gggctgatag gtctggccag ggttgaggga 180
 cagccttgtc tataggaaga gaatgagggt tctgcaactg atgactcaga ggtcatgagt 240
 cattctgcct tggactgttg gggcttggt ttaggcagtg ccttttcctt gccttcccat 300
 gaaccagcag ctgccagaca tagagataat cctaggaagc ctcaaatgga taagcacaca 360
 aaccacctc ccttaggctg ttctgtccc cctgccccat ttctctactt aggggttttt 420
 ctgagtctat tgtggagtga cacatggcca ggggcattcc atagacctt gtcactata 480
 ctctcaactc aggcagcttt tcacagacga ggtctgcaca cccatacaaa tggctcactc 540
 ctgcctgtgc cacctggggc tgaggacat ggctcttgat gcccgaagg agggactatt 600
 agatagccac actcatgcta aatcctgacc ctgctgaaca ccatccagtc catatagcac 660
 atgtatcctc atgctctgta gcacaaaacg catttaacac actgggacaa ctctctgtg 720
 cccagcacag cacctacatc cagcaatgta tcaccataca cacggccaaa aattcaatgc 780
 ccacgtttct gccatcaca tcagacacac ctttctctt ctgaggacac tccattctcc 840
 gctcaaaaaca agacctctga agccagattc atctctggta cctcggggtc atgcttcaac 900
 cccacatgaa taattcaaac catagccata atggctgaa tcaacttaca ctgggatggt 960
 cccaagtcca ggcaagaaaa gccacaggct ctgctgatga ctgaagaata gcaaagggtc 1020
 agtccagctg tatagccact gttgacctgg gtccacaggcc ctgctgacce tccaccttct 1080
 cctgtactga aggaatgaaa gatgagacaa gcatagaggg cacttgaata atccaggtca 1140
 ctctgaggtc catccaaggc attattggac tcagggtggag gaagctgaga ctgatgtccc 1200
 agagggaaag gaaggaaagc agggcccggg gagggctctg tgtcccagtc aggctggaga 1260
 tctctcctct gacttcatgc agacatgtct gcctcacagg gaatctctcc cagcatcaac 1320
 catgttggga caaacactga ctgtcctctc tgttcag 1357

10

ES 2 573 027 T3

<210> 8
 <211> 1472
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 8
 gtaa atgaga acagcaccta gccattcctc gggctctaca agacactgat accagcccta 60
 accggtgaac cctataaata aagcaccag agatgggacc ttgtgagatt atcttggttc 120
 tttacatggc acatagttca tgatacact cagccacagg ctgtggggtc tggccagggt 180
 tcaaggtgta agttaacatc caagaaagaa caaggtctta tactgccaga cccaggcat 240
 gcaagtggac ctgcccttgc cagagatcat cctctctgc atagcaagtt tgaccaagg 300
 ggccctcttc atactcttcc ccacaaccag caactgttct gtgatgagtc tggagataga 360
 aatatgccc tagaaaatat ccaaagaaag gaacacagaa agtgtatccc acctcaacac 420
 gaacccacc ttcatttgc tgtecttccc tctaccgtga ctcccctacc ttgacctagg 480
 aggtctctgt atgtattaca tagacaggca ggaagactca tacatgaagc ccgttcatct 540
 ccaccacacc cctagcgata gggatagggg tgagtactcc taagagacta cctcccatat 600
 gacattcact cacacctaag ttccaagaca ctgagagact tatgacctta gctgccccca 660
 aggaagtaac taatcaaata cctacataga tgctgagacc agaactatta gaaccagcct 720
 gctaagcatc actcaacca catggtacct ccaagcctac atacatccac tgatacctca 780
 cctaggcagc atgaatagca accaaacca tcttagtgtc gggatatccc tagacactac 840
 ctaa atgtac acatttggac cagtgaagat gaaatagctc tcatgggtac ctaactgttt 900
 tcccctaaca cacacaagta ccttcagacc cattctgtcc ctctatgcct aagcccctat 960
 tttcatcct tacagttaac actctcccat agctgtataa cctgactcac ttcccaatgt 1020
 ggaccttcta ggaagcccag gtatcatcaa acgcaggccc tactctcact ctgtccctct 1080
 gtactcagtc accagggaac aagcagtagg tcaggcaagc tgcagagcta ttacctacag 1140
 ggcttccaag ccttgaatca gccaaagccag ccccagtact gagggatagg gtagacaaaa 1200
 agggttcctg catagcccag gccagcatca ggtccagtgt atctggctct acccagggac 1260
 aaaacggcag cacattgggg agctgagggt tctggttcac agagaacata aaggagagat 1320
 ggccccaggg agggtcagat ggccccaggg agggctctgt gaccagtcg ggctgcagct 1380
 ttctcctggg cctccatgca gcctcctgcc acacagggaa tggccctagc tctacctgt 1440
 tgggacaaac actgactttc ctctctgttc ag 1472

10

<210> 9
 <211> 1860
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15

ES 2 573 027 T3

<400> 9
gtaaaccac actgtacaat gtctccctga tcatgtctga cacagggcgc acctgctatt 60
gaccatgcta gcgctcaacc aggcaggccc tgggtgtcca gttgctctgt gtatgcaaac 120
taaccatgtc agagtgagat gttgcatttt ataaaaatta gaaataaaaa aaatccattc 180
aaacgtcact ggttttgatt atacaatgct catgcctgct gagacagttg tgttttgctt 240
gctctgcaca caccctgcat acttgccctcc accctggccc ttcctctacc ttgccagttt 300
cctccttggtg tgtgaactca gtcaggctta caacagacag agtatgaaca tgcgattcct 360
ccagctactt ctagatataat ggctgaaagc ttgcctaacc tgggtgcaggc agcattcagg 420
cacatatata gacacacatg catttatata tagatatata ggtacacatg tgtagacaca 480
tacatgaatg tgtattcatg gacacacaga caaaggatca catatataca catgagttca 540
tgcgcacaca catgcatgga cacttacaaa cgccttcaga gacaaatagg catagacaca 600
caaccactca cagaaacaga taccaatag catggctctg tgtacacaga aacagactat 660
aggcaaatat acacaaataa actatataga tacaagata tgcatatata cacatgtaca 720
gaaacatctt cacatgtgta cactaacatg tgaacaggta tagcacacag atacacctgg 780
actctgacca gggctgtaat ctccaaggct cagggtcag agagcctaca ctaggctggg 840
tactgatac tctcaggag ccactctat gattgggaga gataaccca ggtacaaagt 900
atgcctatct gtctcaacac catggggcag aagatactcc actaaccacc catgacagaa 960
agttagcctt ggctgtgtct ccattaatag aacacctcag aagaccaatg tgaaattgcc 1020
taaccactc acaccaccc tgatctccag ttcaaatgc agaaaacata atgcagttgt 1080
ccaaaagatg cccaaccac acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac 1140
acacacacac acacacacca tcaaggagcc tctgtaagga gtcaccacc aataacactg 1200
cctctttggg ctcatatcct ggacattctt catattcata tccatttggg gcctaggctt 1260
tagatatccc caagggctca tctttacagg gatcagagat cccaataaat gccctggctc 1320
cacagcctcc ctgaggtatc tgtctgttta tctcttggtta ccaagacca acattgctgg 1380
caggggtagg acaagcaacg cacgggaact ctgatcaaag aaagtcatga gatgcctgag 1440
tcttcagga agtaaggagg gacaacctct ggtatccctg ttcttattgc taaagcccaa 1500
gagacagggg gacctgctct aaattctcag tctaaacagc accgatggca ccacctgctc 1560
agggaaagtc cagagcacac caatatcatt ttgccacagt tctgagtct gccttacc 1620
aggtccatac attgcatctg tcttgcttgc tctgctgccc cagggtcctt ggaacaaagg 1680
ctccaaatta gtgtgtccta cagcttggcc tgtctgtgct ctcctctag cttgagctat 1740
taggggacca gtcaatactc gctaagatc tccagaacca tcagggcacc ccaaccctta 1800
tgcaaatgct cagtcacccc aagacttggc ttgacctcc ctctctgtgt cccttcatag 1860

ES 2 573 027 T3

<211> 87
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <400> 10
 agcctgtgga ccaccctgtc cacgtttgtg gcctcttca tctcaccct cctctacagc 60
 ggcattgtca ctttcatcaa ggtgaag 87

<210> 11
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 11
 gggctgtgga cgaccatcac catcttcac acactcttcc tgtaagcgt gtgctacagt 60
 gccaccgtca ctttcttc 78

15 <210> 12
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 12
 gggctgtgga ccaccatcac catcttcac acactcttcc tgtaagcgt gtgctacagt 60
 gccaccatca ctttcttc 78

25 <210> 13
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30 <400> 13
 aacctgtggg ccaccgctc caccttcac gtctcttcc tctgagcct cttctacagt 60
 accaccgtca ctttgttcaa g 81

35 <210> 14
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

40 <400> 14
 actgtgacct tctcaccct cttctactg agcttgttct acagcacagc actcactgtt 60
 aca 63

45 <210> 15
 <211> 84
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 15
 gggctctgga cgaccatcac catcttcac agcctcttcc tgctcagtgt gtgctacagc 60
 gctgctgtca cactcttcaa ggta 84

<210> 16
 <211> 78

<212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 16

5 **gggctctgga cgaccatcac catcttcac agcctcttcc tgctcagcgt gtgctacagc 60**
gcctctgtca cactcttc 78

<210> 17
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 17

10 **gggctctgga cgaccatcac catcttcac agcctcttcc tgctcagcgt gtgctacagc 60**
gcctctgtca ccctcttc 78

<210> 18
 <211> 84
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 18

15 **aacctgtgga ccactgctc caccttcac gtctcttcc tctgagcct cttctacagc 60**
accacgtca ccctgttcaa ggtg 84

<210> 19
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

20 **Gly Glu Ala Ala Arg Arg Pro Gly Leu Pro Leu Pro Leu Leu Leu**
1 5 10 15

His Gln Leu Leu Leu Leu Phe Leu Ser His Leu Arg Arg Leu
20 25 30

25 <210> 20
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

30 **Asp Ala Ala His Pro Val Ala Ala Ser Leu Pro Leu Leu Ala Gly Thr**
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Gly Ala Ser Ala Ala Pro
20 25

<210> 21
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

35

40

45

Ser Ser Ala Gly Ser Leu Ala Ala Gly Pro Leu Leu Val Ala Leu Ala
 1 5 10 15

Leu Tyr Pro Leu Ser Val Leu Phe
 20

<210> 22
 <211> 30
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Asp Ala Ala His Pro Gly Arg Ser Val Val Pro Ala Leu Leu Pro Leu
 1 5 10 15

Leu Ala Gly Thr Leu Leu Leu Leu Glu Thr Ala Thr Ala Pro
 20 25 30

<210> 23
 <211> 26
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 Ser Ala Ser Ser Asn Ile Ser Gly Gly Ile Phe Leu Phe Phe Val Ala
 1 5 10 15

Asn Ala Ile Ile His Leu Phe Cys Phe Ser
 20 25

<210> 24
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gly Ala Thr Val Gly Ile
 1 5 10 15

Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Ile
 20 25

<210> 25
 <211> 29
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 Ser Gly Thr Thr Arg Leu Leu Ser Gly His Thr Cys Phe Thr Leu Thr
 1 5 10 15

Gly Leu Leu Gly Thr Leu Val Thr Met Gly Leu Leu Thr
 20 25

<210> 26
 <211> 27
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens

<400> 26

Asn Gly Gly Thr Ser Leu Ser Glu Lys Thr Val Leu Leu Leu Val Thr
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 Cys Glu Gly Ile Ser Leu Leu Ala Gln Asn Thr Ser Trp Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Ser Leu Ser Leu Leu Gln Ala Thr Asp Phe Met Ser Leu
 20 25 30

<210> 28
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Ser Gly Ala Pro Thr Leu Ser Pro Ser Leu Leu Gly Leu Leu Leu Pro
 1 5 10 15

Ala Phe Gly Ile Leu Val
 20

<210> 29
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 Asp Leu Cys Asn Glu Lys Leu His Asn Ala Ala Pro Thr Arg Thr Ala
 1 5 10 15

Leu Ala His Ser Ala Leu Ser Leu Gly Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ala
 20 25 30

Val Ile Leu Ala Pro Ser Leu
 35

<210> 30
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala
 1 5 10 15

Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu Ser
 20

<210> 31
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31

ES 2 573 027 T3

Asn Ala Gly Glu Met Leu His Gly Thr Gly Gly Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Ala Leu Met Leu Gln Leu Trp Leu Leu Gly
20 25

<210> 32
<211> 49
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32
Ala Arg Gly Leu Met Asn Gly Tyr Arg Gly Pro Ala Met Asp Ser Glu
1 5 10 15

Glu Asp Met Met Val Thr Ala Leu His Ser Leu Thr Leu Gln Thr Val
20 25 30

Val Ile His Ser Leu Ser Ser Val Leu Pro Gly Ile Thr Leu Ala Ile
35 40 45

Asn

10 <210> 33
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 33

Ser Ser Gly His Ser Arg His Arg Tyr Ala Leu Ile Pro Ile Pro Leu
1 5 10 15
Ala Val Ile Thr Thr Cys Ile Val Leu Tyr Met Asn Val Leu
20 25 30

20 <210> 34
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 34
Ser Gly Ala Ser Ser Leu His Arg His Phe Gly Leu Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

Leu Ala Pro Leu Val Leu Cys Leu Ser Leu Leu
20 25

30 <210> 35
<211> 26
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 35

Ser Thr Gly Ser His Cys His Gly Ser Phe Ser Leu Ile Phe Leu Ser
 1 5 10 15

Leu Trp Ala Val Ile Phe Val Leu Tyr Gln
 20 25

5 <210> 36
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 36

Gly Ala Ala Pro Gln Pro Gly Pro Ala His Leu Ser Leu Thr Ile Thr
 1 5 10 15

10 Leu Leu Met Thr Ala Arg Leu Trp Gly Gly Thr Leu Leu Trp Thr
 20 25 30

<210> 37
 <211> 30
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus
 <400> 37

Asn Ala Ala Val Pro Thr Gly Ala Ser Thr Trp Thr Met Ala Gly Val
 1 5 10 15
 20 Leu Leu Phe Ser Leu Ser Ser Val Ile Leu Gln Thr Leu Leu
 20 25 30

<210> 38
 <211> 35
 <212> PRT
 25 <213> Mus musculus
 <400> 38

Asn Glu Arg Leu Val Ser Ala Ala Pro Gly His Ala Leu Leu Ser Ser
 1 5 10 15

Val Thr Leu Gly Leu Ala Thr Ser Leu Ser Leu Leu Thr Val Met Ala
 20 25 30

Leu Cys Leu
 35

30 <210> 39
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35 <400> 39

Ser Ala Ala Ser His Tyr Gln Gly Ser Phe Pro Leu Val Ile Leu Ser
 1 5 10 15

Leu Ser Ala Val Ile Phe Val Leu Tyr Gln
 20 25

<210> 40
 <211> 24

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 40

Ser Ser Gly Val Cys Trp Thr Ala Thr Trp Leu Val Val Thr Thr Leu
1 5 10 15

Ile Ile His Arg Ile Leu Leu Thr
20

5

<210> 41
<211> 32
<212> PRT
<213> Mus musculus

10

<400> 41

Asn Phe Ser Ala Ala Gly Leu Gly Leu Arg Ala Ser Ile Pro Leu Leu
1 5 10 15

Gly Leu Gly Leu Leu Ser Leu Leu Ala Leu Leu Gln Leu Ser Pro
20 25 30

15

<210> 42
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

20

<400> 42

Ala Lys Ser Phe Tyr Phe Ile Cys Tyr Leu Cys Leu Tyr Leu Ala Leu
1 5 10 15

<210> 43
<211> 22
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

25

<400> 43

Gly Asn Ser Ala Glu Gly Ser Met Pro Ala Phe Leu Leu Phe Leu Leu
1 5 10 15

Leu Gln Leu Trp Asp Thr
20

30

<210> 44
<211> 32
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

35

<400> 44

Cys Gly Gly Ile Ser Leu Leu Val Gln Asn Thr Ser Trp Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Ser Leu Ser Phe Leu Gln Ala Thr Asp Phe Ile Ser Leu
20 25 30

40

<210> 45
<211> 29
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 45

Ser Ala Ala Thr Arg Pro Glu Pro His Tyr Phe Phe Leu Leu Phe Leu
 1 5 10 15

Phe Thr Leu Val Leu Ala Ala Ala Arg Pro Arg Trp Arg
 20 25

5 <210> 46
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

10 <400> 46
 Ser Ser Gly Val His Trp Ile Ala Ala Trp Leu Val Val Thr Leu Ser
 1 5 10 15

Ile Ile Pro Ser Ile Leu Leu Ala
 20

15 <210> 47
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 47
 Ser Ala Ala Ser His Tyr Gln Gly Ser Phe Pro Leu Ile Ile Leu Ser
 1 5 10 15

Phe Trp Ala Val Ile Leu Val Leu Tyr Gln
 20 25

20 <210> 48
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

25 <400> 48
 Arg Asn Thr Gly Phe Leu Leu Ala Trp Pro Thr Phe Phe Leu Pro Val
 1 5 10 15

Phe Leu Ala Trp Leu Phe
 20

30 <210> 49
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 49
 Ser Ser Ala Gly Ala Arg Glu Ser Cys Val Ser Leu Phe Leu Val Val
 1 5 10 15

35 Leu Pro Ser Leu Leu Val Gln Leu Leu Cys Leu Ala Glu Pro
 20 25 30

<210> 50
 <211> 33
 <212> PRT

ES 2 573 027 T3

<213> Candida albicans

<400> 50

Ser Ser Gly Val Lys Ala Thr Gln Gln Met Ser Met Val Lys Leu Val
1 5 10 15

Ser Ile Ile Thr Ile Val Thr Ala Phe Val Gly Gly Met Ser Val Val
20 25 30

Phe

5

<210> 51

<211> 32

<212> PRT

<213> Yeast sp.

10

<400> 51

Asn Ala Ala Thr Asn Val Lys Ala Asn Leu Ala Gln Val Val Phe Thr
1 5 10 15

Ser Ile Ile Ser Leu Ser Ile Ala Ala Gly Val Gly Phe Ala Leu Val
20 25 30

15

<210> 52

<211> 25

<212> PRT

<213> porcine

<400> 52

Ala Arg Ala Ala Pro Thr Thr Ser Leu Gly Ser Leu Met Thr Val Ser
1 5 10 15

20

Ala Leu Ala Ile Leu Gly Trp Ser Val
20 25

<210> 53

<211> 26

<212> PRT

25

<213> porcine

<400> 53

Ser Ala Ala Pro Ser Leu His Leu Pro Pro Gly Ser Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

30

Leu Val Pro Leu Leu Leu Leu Ser Leu Pro
20 25

<210> 54

<211> 18

<212> PRT

35

<213> Trypanosoma brucei

<400> 54

Ser Asn Ser Phe Val Ile His Lys Ala Pro Leu Phe Leu Ala Phe Leu
1 5 10 15

Leu Phe

ES 2 573 027 T3

<210> 55
<211> 24
<212> PRT
5 <213> Trypanosoma brucei

<400> 55

Asp Ser Ser Ile Leu Val Thr Lys Lys Phe Ala Leu Thr Val Val Ser
1 5 10 15

Ala Ala Phe Val Ala Leu Leu Phe
20

10
<210> 56
<211> 24
<212> PRT
15 <213> Trypanosoma brucei

<400> 56

Asn Gly Ser Phe Leu Thr Ser Lys Gln Phe Ala Phe Ser Val Val Ser
1 5 10 15

Ala Ala Phe Val Ala Leu Leu Phe
20

20 <210> 57
<211> 18
<212> PRT
<213> Trypanosoma brucei

25 <400> 57

Ser Asn Ser Phe Val Ile Ser Lys Thr Pro Leu Trp Leu Ala Val Leu
1 5 10 15

Leu Phe

30 <210> 58
<211> 23
<212> PRT
<213> Trypanosoma brucei

<400> 58

35 Asp Gly Ser Phe Leu Val Asn Lys Lys Phe Ala Leu Met Val Tyr Asp
1 5 10 15

Phe Val Ser Leu Leu Ala Phe
20

40 <210> 59
<211> 23
<212> PRT
<213> Trypanosoma brucei

<400> 59

ES 2 573 027 T3

Asn Gly Ser Phe Leu Thr Ser Lys Gln Phe Ala Leu Met Val Ser Ala
 1 5 10 15

Ala Phe Val Thr Leu Leu Phe
 20

5 <210> 60
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Trypanosoma brucei
 <400> 60

Gly Ala Ala Thr Leu Lys Ser Val Ala Leu Pro Phe Ala Ile Ala Ala
 1 5 10 15

10 Ala Ala Leu Val Ala Ala Phe
 20

<210> 61
 <211> 18
 <212> PRT
 15 <213> Trypanosoma brucei
 <400> 61

Ser Asn Ser Phe Val Ile Asn Lys Ala Pro Leu Leu Leu Gly Phe Leu
 1 5 10 15

20 Leu Phe
 <210> 62
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Trypanosoma congolense
 25 <400> 62

Ser Gly Ser Ser His Gly Thr Lys Ala Ile Arg Ser Ile Leu His Val
 1 5 10 15

30 Ala Leu Leu Met
 20
 <210> 63
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Gallus sp.

35 <400> 63
 Ala Gly Asn Lys Leu Ile Gln Gln His Leu Leu Val Ile Thr Phe Val
 1 5 10 15

Pro Phe Ile Ile Leu Gly Gln Leu Gln Gly Leu Gly
 20 25

40 <210> 64
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Gallus sp.

ES 2 573 027 T3

<400> 69

Gly Ser Ala Ser Thr Val Val Ala Ser Leu Ser Leu Ile Ile Phe Ser
 1 5 10 15

Met Ile Leu Ser Leu Cys
 20

- 5 <210> 70
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
- 10 <400> 70
 acctggccat gacccccctg atccc 25
 <210> 71
 <211> 29
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens
- 20 <400> 71
 agctgcaact ggaggagagc tgtgcggag 29
 <210> 72
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
- 25 <400> 72
 agctgcaact ggaggagagc tgtgcggagg cgc 33
 <210> 73
 <211> 25
 <212> ADN
 30 <213> Homo sapiens
- 35 <400> 73
 agggggaggt gagcgccgac gagga 25
 <210> 74
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
- 40 <400> 74
 aacgtcaaga gccactttcc tatgtgctac t 31
 <210> 75
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
- 45 <400> 75
 ggctgcaact ggacgagacc tgtgctgagg cccaggacgg ggagctgg
 <210> 76
 <211> 27
 <212> ADN
 55 <213> Mus musculus
- 60 <400> 76
 ggctagacct ggatgatatc tgtgctg 27
 <210> 77
 <211> 23

<212> ADN
 <213> Mus musculus

 <400> 77
 5 agctggaact gaatgagacc tgt 23

 <210> 78
 <211> 33
 <212> ADN
 10 <213> Mus musculus

 <400> 78
 agggggaggt gaatgctgag gaggaaggct ttg 33

 15 <210> 79
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 20 <400> 79
Gly Phe Thr His
1
 <210> 80
 <211> 4
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens

 <400> 80
Ala Cys Thr Thr
1
 <210> 81
 30 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 81
Cys Ala Pro Ala
1
 35 <210> 82
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 40 <400> 82
Ala Gly Thr Thr
1
 <210> 83
 <211> 4
 45 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 83
Thr Ser Ser Pro
1
 50 <210> 84
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 55 <400> 84
Ile Thr Val Ser
1
 <210> 85

<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 85
Ser Gly Thr Thr
1

<210> 86
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 86
Glu Gln Leu Glu
1

15 <210> 87
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87
Lys Leu Val Lys
1

20 <210> 88
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88
Gln Val Lys Ile
1

25 <210> 89
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89
Cys Cys Gln Glu
1

30 <210> 90
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 90
Ala Ala Ala Met
1

40 <210> 91
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <400> 91
Ala Met His Val
1

50 <210> 92
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92
Gly Ser Arg Gly
1
5 <210> 93
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 93
Thr Cys Ile Pro
1
10 <210> 94
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 94
Tyr Gly Tyr Ser
1
15 <210> 95
<211> 4
20 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 95
Arg Ile Lys Phe
1
25 <210> 96
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 96
Gln Tyr Arg Ser
1
30 <210> 97
<211> 4
<212> PRT
35 <213> Mus musculus

<400> 97
Glu Asp Leu Cys
1
40 <210> 98
<211> 4
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 98
Thr Asp Leu Cys
1
45 <210> 99
<211> 4
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 99
Arg Ile Lys Phe
1
50 <210> 100

<211> 4
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 5 <400> 100
 Asp Leu Ala Arg
 1
 <210> 101
 <211> 4
 <212> PRT
 10 <213> Mus musculus
 <400> 101
 Ser Ser Phe Cys
 1
 <210> 102
 15 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 102
 His Leu Met Phe
 1
 20 <210> 103
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 25 <400> 103
 Ala Pro Ser Ser
 1
 <210> 104
 <211> 4
 30 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 104
 Lys Leu Val Lys
 1
 35 <210> 105
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 40 <400> 105
 Gly Gln Lys Thr
 1
 <210> 106
 <211> 4
 <212> PRT
 45 <213> Rattus norvegicus
 <400> 106
 Thr Leu Ala Arg
 1
 <210> 107
 50 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 107

Arg Ile Lys Phe

1

<210> 108
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

5

<400> 108

Asn Gly Thr Pro

1

<210> 109
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

10

<400> 109

Asn Cys Leu Tyr

1

<210> 110
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Candida albicans

15

20

<400> 110

Gly Ser Ser Ser

1

<210> 111
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Yeast sp.

25

<400> 111

Ser Ser Lys Lys

1

<210> 112
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> porcine

30

35

<400> 112

Glu Pro Leu Ser

1

<210> 113
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> porcine

40

<400> 113

Asn Tyr Gly Tyr

1

<210> 114
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trypanosoma brucei

45

<400> 114

Asn Thr Thr Gly

1

<210> 115
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trypanosoma brucei

50

<400> 115
Asn Ala Cys Lys
1
 <210> 116
 5 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trypanosoma brucei

 <400> 116
Glu Lys Cys Arg
 10 **1**
 <210> 117
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trypanosoma brucei
 15
 <400> 117
Thr Thr Gly Ser
1
 <210> 118
 <211> 4
 20 <212> PRT
 <213> Trypanosoma brucei

 <400> 118
Glu Lys Cys Cys
1
 25 <210> 119
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trypanosoma brucei
 30
 <400> 119
Glu Asp Cys Arg
1
 <210> 120
 <211> 4
 <212> PRT
 35 <213> Trypanosoma brucei

 <400> 120
Glu Pro Glu Pro
1
 <210> 121
 40 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trypanosoma brucei

 <400> 121
Asn Thr Thr Ala
 45 **1**
 <210> 122
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trypanosoma congolense
 50
 <400> 122
Ser His Leu Pro
1
 <210> 123
 <211> 4

<212> PRT
 <213> Gallus sp.

 <400> 123
 5 **Gln Cys Ser Gly**
 <210> 124
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Gallus sp.
 10
 <400> 124
Thr Val Ile Pro
1
 <210> 125
 <211> 4
 15 <212> PRT
 <213> Torpedo marmorata

 <400> 125
Asp Gly Glu Leu
1
 20 <210> 126
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Hamster sp.

 25 <400> 126
Asp Gly Arg Arg
1
 <210> 127
 <211> 4
 <212> PRT
 30 <213> Bos taurus

 <400> 127
Arg Ile Gln Phe
1
 35 <210> 128
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> moho mucilaginoso

 <400> 128
Asn Asn Val Cys
1
 40 <210> 129
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> moho mucilaginoso
 45
 <400> 129
Ser Thr Thr Thr
1

 <210> 130
 50 <211> 2074
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 130
 55

ES 2 573 027 T3

cctccaccaa gggcccatcg gtcttecccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg 60
 gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt 120
 ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtccctcag 180
 gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctecag cagcttgggc acccagacct 240
 acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttggtgaga 300
 ggccagcaca gggagggagg gtgtctgctg gaagccaggc tcagcgtcc tgccctggacg 360
 catcccggct atgcagcccc agtccagggc agcaaggcag gccccgtctg cctcttcacc 420
 cggaggcctc tgeccgcccc actcatgctc agggagaggg tcttctggct ttttccccgg 480
 ctctgggcag gcacaggcta ggtgccccta acccaggccc tgcacacaaa ggggcaggtg 540
 ctgggctcag acctgccaag agccatatcc gggaggacce tgcccctgac ctaagcccac 600
 cccaaaggcc aaactctcca ctccctcagc tcggacacct tctctctcc cagattccag 660
 taactcccaa tcttctctct gcagagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac 720
 cgtgcccagg taagccagcc caggcctcgc cctccagctc aaggcgggac aggtgccccta 780
 gagtagcctg catccaggga caggccccag ccgggtgctg acacgtccac ctccatctct 840
 tcctcagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag 900
 gacaccctca tgatctcccc gacccctgag gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac 960
 gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 1020
 acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 1080
 ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc 1140
 ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggtg ggaccctggg ggtgcgaggg 1200
 ccacatggac agaggccggc tcggcccacc ctctgccctg agagtgaccg ctgtaccaac 1260
 ctctgtccct acagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga 1320


```

tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga 1380
catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccaegcctcc 1440
cgtgctggac tcegaeggct cettcttctc ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag 1500
gtggcagcag gggaaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta 1560
cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgagtg cgacggccgg caagcccccg 1620
ctccccgggc tctcgcggtc gcacgaggat gcttggcacg taccctctgt acatacttcc 1680
cgggcgcca gcatggaaat aaagcaccca gcgctgcctt gggccctctc gagactgtga 1740
tggttctttc cacgggtcag gccgagtctg aggcctgagt ggcattgaggg aggcagagcg 1800
ggtcccactg tccccacact ggcccaggct gtgcaggtgt gcttgggccc cctaggggtg 1860
ggctcagcca ggggctgccc tcggcagggt gggggatttg ccagcgtggc cctccctcca 1920
gcagcacctg ccctgggctg ggccacggga agccctagga gccctgggg acagacacac 1980
agccctgcc tctgtaggag actgtcctgt tctgtgagcg cctgtctctc cgacctccat 2040
gcccactcgg gggcatgcga cagattgagg atcc 2074

```

<210> 131
 <211> 330
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Amino acid sequence of the gamma-chain constant region encoded by plasmid plgG-A

10 <400> 131

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1          5          10          15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
          20          25          30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
          35          40          45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
          50          55          60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65          70          75          80

```

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 132
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> TM-fw1

<400> 132
 ggccgagtct gaggcctgag tggcatgagg gaggcagagt 40

5 <210> 133
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> TM-rv1

<400> 133
 aactggatcc atgtagaaaa gaggagaagc cccgggggtc catgtagt 48

15 <210> 134
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> M1-rv

<400> 134
 gatccacttc acctgaaga aggtgacggt ggcactgtag cacacgc 47

25 <210> 135
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> M2-fw

<400> 135
 caccttcttc aaggtgaagt ggatctctc ctcggtggtg gacctgaag 49

40 <210> 136
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> TM-fw2

45 <400> 136
 ctccagcagc agctgccttg ggctgggcca cga 33

50 <210> 137
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> TM-rv2

55 <400> 137
 cagggatccc ccgaggtgca gctggaccag cctcctcctg accgtgtttt 50

60 <210> 138
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Artificial

65 <220>
 <223> mutSphI-1

ES 2 573 027 T3

<400> 138
 ctaccccaga cctccgctgc ttggtgctg cagggcactg ggggccaggt gtcccctcag 60
 caggacgt 68
 5 <210> 139
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> mutSphI-2
 <400> 139
 cctgctgagg ggacacctgg cccccagtgc cctgcaggca ccaagcagcg gaggtctggg 60
 gt 62
 15 <210> 140
 <211> 6949
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 140
 cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg 60
 gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt 120
 ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag 180
 gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgcctccag cagcttgggc acccagacct 240

ES 2 573 027 T3

acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttggtgaga 300
 gggcagcaca gggaggagg gtgtctgctg gaagccaggc tcagcgtcc tgccctggacg 360
 catcccggct atgcagcccc agtccagggc agcaaggcag gccccgtctg cctcttcacc 420
 cggaggcctc tgcccgcccc actcatgctc agggagaggg tcttctggct ttttccccgg 480
 ctctgggcag gcacaggcta ggtgcccta acccaggccc tgcacacaaa ggggcaggtg 540
 ctgggctcag acctgccaa agccatatcc gggaggaccc tgcccctgac .ctaagcccac 600
 cccaaaggcc aaactctcca ctccctcagc tcggacacct tctctcctcc cagattccag 660
 taactcccaa tcttctctct gcagagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac 720
 cgtgcccagg taagccagcc caggcctcgc cctccagctc aaggcgggac aggtgccta 780
 gaggtagcctg catccaggga caggccccag ccgggtgctg acacgtccac ctccatctct 840
 tctcagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttc tcttcccccc aaaaccaag 900
 gacaccctca tgatctccc gaccctgag gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac 960
 gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa 1020
 acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacctc 1080
 ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtga aggtctcaa caaagccctc 1140
 ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggtg ggaccctgg ggtgcgaggg 1200
 ccacatggac agaggccggc tcggcccacc ctctgcctg agagtaccg ctgtaccaac 1260
 ctctgtccct acagggcagc cccgagaacc acagggtgac accctgcccc catcccggga 1320
 tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga 1380
 catcgccgtg gagggggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc 1440
 cgtgctggac tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctaccctgg acaagagcag 1500
 gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta 1560
 cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgagtg cgacggccgg caagcccccg 1620
 ctccccgggc tctcgcggtc gcacgaggat gcttggcacg taccctgt acatacttcc 1680
 cgggcgcccc gcatggaaat aaagcaccca gcgctgcctt gggcccctgc gagactgtga 1740
 tggttctttc cacgggtcag gccgagtctg aggcctgagt ggcatgaggg aggcagagcg 1800
 ggtcccactg tccccacact ggcccaggct gtgcaggtgt gcctgggccc cctagggtgg 1860
 ggctcagcca ggggctgcc tcggcagggt gggggatttg ccagcgtggc cctccctcca 1920
 gcagcacctg ccctgggctg ggccacggga agccctagga gccctgggg acagacacac 1980

ES 2 573 027 T3

agcccctgcc tctgtaggag actgtcctgt tctgtgagcg ccctgtcctc cgacctccat 2040
 gccactcgg gggcatgctt agtccatgcg cgtagggaca ggccctccct caccatccta 2100
 cccccacggc actaaccctt ggcagccctg cccagcctcg caccgcgatg gggacacaac 2160
 cgactccggg gacatgcact ctcgggccct gtggagggac tggcgcagat gccacacac 2220
 aactcagcc cagaccggtt caacaaacc cgcactgagg ttggccggcc acacggccac 2280
 cacacacaca cgtgcaagcc tcacacacgg agcctcacc ggccgaaccg cacagcacc 2340
 agaccagagc aaggctcctg cacacgtgaa cactcctcgg acacaggccc ccacgagccc 2400
 cagcgggcac ctcaaggccc acgagccgct cggcagcttc tccacatgct gacctgtcga 2460
 gacaaaccca gcctcctct cacaagggtg ccctgcagcc gccacacaca cacaggcccc 2520
 cacacgcagg ggaacacacg ccacgtcgcg tccttgccac tggccactt cccaatacag 2580
 cccttcctg cagctggggt cacatgaggt gtgggcttca ccatcctcct gcctctggg 2640
 cctcagggag ggacacggga gacggggagc gggctcctgt gagggccagg tcgctatcta 2700
 gggccgggtg tctggctgag tcccggggcc aaagctgggt cccagggcgg gcagctgtgg 2760
 ggagctgacc tcaggacatt gttggcccat cccggccggg ccctacatcc tgggccccgc 2820
 cacagagga atcaccccca gaggccaag cccaggggga cacagcactg accaccocct 2880
 tcctgtccag agctgcaact ggaggagagc tgtgcccagg cgcaggacgg ggagctggac 2940
 gggctgtgga cgaccatcac catcttcac acactcttc tgtaagcgt gtgctacagt 3000
 gccaccgtca ccttcttcaa ggtcggccgc acgttgctcc cagctgtcct tgacattgtc 3060
 cccatgctg tcacaaactg tctctgacac tgtcccacag gctgtcccca cctgtccctg 3120
 acgtgtccc ccatgctctc aaaaactgtc cctgacattg tcccacatgc tgccccacc 3180
 tgtccaacag tgtccccag gctctcccca catgtcccg aactgtccc ccatgctgtc 3240
 cccatctgtc cccaacactg tccccaccc tgtccccctt tgtcccacac actgtcccc 3300
 acagttcca cctgtccctg aactgtccc ccatgcttcc cccacctgtc cctgacacca 3360
 tccccactc tgtcccctat agttcctggc cctgtcccc acgtgtccc ctacagtacc 3420
 tggcactgtc cccatgctg tcccctcctg tatgaaacc tgtcccacat gctgtcccca 3480
 cctgtccgtg acaatatccc ccacactgtc cccacctgtc cccgacactc tcctccacgt 3540
 tgttcttacc taaaccgac acttctctcc atgtgtccc caccatctc cgacactgta 3600
 ccccagttg tccccactg tcctcaaac tgtcccccat gctgtcccca cctgtcccca 3660
 aactctcct ccatgctgtc cccacctgtc cctgatattg tccccatgc agtctccacc 3720
 tgtcccacat gctgtcccc aggtgtgacc taccagtaca aactgtccc ccatgctgtc 3780

ES 2 573 027 T3

cccacctgtc cctgacactg tcccccaacgc tgccccctcc tgcccccgac actgtcccc 3840
 aactgtccc cacctgtccc caacactatc ctccatgctg tccccctctg tccccacctg 3900
 tccccctaac tgccccccat gctgtccccca ccagtccecca aaactttcct ccacactgtc 3960
 cccacctgtc cccaacactg tcccccaacgc tatccccctt gtccccgaca atgtccccac 4020
 tgtttcctcc tgttccctcc tatccctgac actgtccgcc atgctgtccc cacctgtccc 4080
 tgacactgtc tcccactctg tccccataaa tcctgacac tgccccccac gccgtccctt 4140
 cccgtatgca ccaactgtccc ccaagctgtc cccacctgtc ctcaacacag tcccccatgc 4200
 tgccccacc tgccccaac actctcctcc atgtccccac ctgtccctga tattgtcccc 4260
 catgcagtc ccacctgtcc ccgatgctgt cccccgggct gtacctacca gtccaacact 4320
 gtcccccaaca ctctccccac ctgtccctga tactgtcccc catgctgtcc ccacctgtcc 4380
 cggacactgt tctccacgat ctccccctct gtccctgaca ctgtccccca cactgtcccc 4440
 acctgtcccc aacactatcc tccatcctgt cccaacctgt ctctacact gtcccccatg 4500
 ctgtccccac cagtccccaa cactgtctc catgctgtcc cccatgtccc caacactgtc 4560
 ccccatgcta cctccccctgc cctgacaat gtccccactg tttcctgtcc cctcctatcc 4620
 ctgacactgt ccccatgct gtccccacct gtcccccaaca tggctccac cggtcctga 4680
 cactgtctcc cactctgtcc cctataatcc ctgacactgt cccccacacc gtccccctct 4740
 gtatgacca cggccccca tgctgtcccc acctgtccct gatgctgtcc tccacacagt 4800
 cccacctct cctgacact gtccccatct ctcccccaaca ctctctcca tgctgtcctc 4860
 aactgtcccc aacactctc cacactctgt ctccacctgt ccctgacact gtcccccaaca 4920
 ctgtcctcac ctgtgtctga cactgtcccc cagctgtcc ccacctgtcc ctgacgtgt 4980
 cttctgtgct gtccacatgc tgttggtgcc ctggctctgc tctctatcac caagcctcag 5040
 agcaggcagt ggtgaggcca tggcacctgg gtggcatgag gggccgatg ggcctcaggg 5100
 gcagggctgt ggcctgcgtg gactgacagg tgggtgggcc ttgggggcag agaggtggcc 5160
 tcagtgcctt gaggggtggg tggggctcgg gggcaggct gtggcctcgc tcaccctgt 5220
 gctgtgcctt gcctacaggt gaagtggatc ttctctcgg tgggtggacct gaagcagacc 5280
 atcatccccg actacaggaa catgatcgga cagggggcct agggccaccc tctgcgggg 5340
 gtccagggcc gccagacc cacacaccag ccatgggcca tgctcagcca ccaccaggc 5400
 cacacctgcc cccgacctca ccgccctcaa cccatggct ctctggcctc gcagttgcc 5460
 tctgacctg acacacctga cacgcccccc ttccagacc tgtgcatagc aggtctacc 5520

ES 2 573 027 T3

cagacctccg ctgcttggtg cctgcagggc actggggggc aggtgtcccc tcagcaggac 5580
gtccttgccc tccggaccac aaggtgctca cacaaaagga ggcagtgacc ggtatcccag 5640
gccccaccc aggcaggagc tggccctgga gccaaccccg tccacgccag cctcctgaac 5700
acaggcgtgg tttccagatg gtgagtggga gcatcagccg ccaaggtagg gaagccacag 5760
caccatcagg ccctgttggg gaggcttccg agagctgcca aggctcactc agacggcctt 5820
cctcccagcc cgcageccagc cagcctccat tccgggact cccgtgaact cctgacatga 5880
ggaatgacgt tgttctgatt tcaagcaaag aacgctgctc tctggctcct gggaacagtc 5940
tcggtgccag caccaccct tggctgctg cccacactgc tggattctcg ggtggaactc 6000
gaccgcagg gacagccagc cccagagtcc gcaactggga gagaaggggc caggcccagg 6060
aactgccac ctcccacca ctccagtcca ccgagatcac tcggagaaga gtctgggcca 6120
tgtggccgct gcaggagccc cacagtgcaa gggtgaggat agcccaagga agggctgggc 6180
atctgccag acaggcctcc cacagaaggc tggtgaccag gtcccaggcg ggcaagactc 6240
agccttggtg gggcctgagg acagaggagg cccaggagca tcggggagag aggtggaggg 6300
acaccgggag agccaggggc gtggacacag ccagaactca tcacagaggc tggcgtccag 6360
tcccgggtca tgtgcagcag gaacaagcag ccaactctggg ggcaccaggt ggagaggcaa 6420
gacgacaaaag agggtgcccc tgttcttgcg aaagcggggc tgctggccac gagtgtctga 6480
cagaggcccc cacgctctgc tgccccatc acgccgttcc gtgactgtca cgcagaatct 6540
gcagacagga agggagactc gagcgggagt gcgccagag cctgcctcgg ccgtcagggg 6600
ggactcccgg gctcactcga aggaggtgcc accatttcag ctttggtagc ttttcttctt 6660
cttttaaatt ttctaaaget cattaattgt ctttgatgtt tcttttgtga tgacaataaa 6720
atatcctttt taagtcttgt acttcgtgat gggagccgcc ttctgtgtc cacgcgcctc 6780
ctgcccccg tgggaagcac ggtcaggagg aggctggctc agctgcacct cgggggctcc 6840
ctgcactcgc cccccgcctc ctgcagccac acgcattgcc cgagcgacct tccctggccc 6900
ctgtcactac atggaccccc ggggcttctc ctcttttcta catggatcc 6949

<210> 141
<211> 330
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 141

10 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

ES 2 573 027 T3

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

ES 2 573 027 T3

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 142
 <211> 399
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 142

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

10

ES 2 573 027 T3

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Cys
 325 330 335
 Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu Leu Asp Gly Leu Trp Thr Thr Ile Thr
 340 345 350
 Ile Phe Ile Thr Leu Phe Leu Leu Ser Val Cys Tyr Ser Ala Thr Val

ES 2 573 027 T3

355

360

365

Thr Phe Phe Lys Val Lys Trp Ile Phe Ser Ser Val Val Asp Leu Lys
 370 375 380

Gln Thr Ile Ile Pro Asp Tyr Arg Asn Met Ile Gly Gln Gly Ala
 385 390 395

<210> 143
 <211> 4608
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 143
 cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg 60
 gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg acggtgtcgt 120
 ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtccctcag 180
 gactctactc cctcagcagc gtgggtgaccg tgcctccag cagcttgggc acccagacct 240
 acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttggtgaga 300
 ggccagcaca gggaggagg gtgtctgctg gaagccaggc tcagcgtcc tgctggacg 360
 catcccggct atgcagcccc agtccagggc agcaaggcag gccccgtctg cctcttcacc 420
 cggaggcctc tgcccgtccc actcatgctc agggagaggg tcttctggct ttttccccgg 480
 ctctgggcag gcacaggcta ggtgccccta acccaggccc tgcacacaaa ggggcagggtg 540
 ctgggctcag acctgccaag agccatatcc gggaggacct tgcctctgac ctaagcccac 600
 cccaaaggcc aaactetcca ctccctcagc tgggacacct tctctctcc cagattccag 660
 taactcccaa tcttctctct gcagagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac 720
 cgtgcccagg taagccagcc caggcctcgc cctccagctc aaggcgggac aggtgccccta 780
 gagttagcctg catccaggga caggccccag ccgggtgctg acacgtccac ctccatctct 840
 tcctcagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag 900
 gacaccctca tgatctcccg gaccctgag gtccatgctg tgggtggtgga cgtgagccac 960
 gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 1020
 acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 1080
 ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc 1140
 ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggtg ggaccctgtg ggtgagggg 1200
 ccacatggac agaggccggc tcggcccacc ctctgccctg agagtgaccg ctgtaccaac 1260

ES 2 573 027 T3

ctctgtccct acagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga 1320
tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga 1380
catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccaagcctcc 1440
cgtgctggac tccgacggct ccttcttccct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag 1500
gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta 1560
cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgagtg cgacggccgg caagcccccg 1620
ctccccgggc tctcgcggtc gcacgaggat gcttggcacg taccctctgt acatacttcc 1680
cgggcgcccc gcatggaaat aaagcaccca gcctgcccct gggcccctgc gagactgtga 1740
tggttctttc cacgggtcag gccgagtctg aggcctgagt ggcatgaggg aggcagagcg 1800
ggtcccactg tccccacact ggcccaggct gtgcaggtgt gcctgggccc cctaggggtg 1860
ggctcagcca ggggctgccc tcggcagggt gggggatttg ccagcgtggc cctccctcca 1920
gcagcacctg ccctgggctg ggccacggga agccctagga gccctgggg acagacacac 1980
agcccctgcc tctgtaggag actgtcctgt tctgtgagcg ccctgtcctc cgacctccat 2040
gcccactcgg gggcatgcct agtccatgcg cgtagggaca ggccctccct caccatcta 2100
ccccacggc actaaccctt ggagccctg cccagcctcg caccacatg gggacacaac 2160
cgactcctgg ggacatgcac tctcgggccc tgtggaggga ctgggccaga tgcccacaca 2220
cacactcagc ccagaccctg tcaacaaacc ccgactgag gttggccggc cacacggcca 2280
ccacacacac acgtgcacgc ctcacacacg gagcttcacc cgggcgaacc gcacagcacc 2340
cagaccagag caaggtcctc gcacacgtga aactcctcg gacacaggcc cccacgagcc 2400
ccacgcggca cctcaaggcc cagagccgc tcggcagctt ctccacttgc tgaccagctc 2460
agacaaacc agccctcctc tcacaaagtg cccctgcagc cgccacacac acacaggccc 2520
ccacacacag gggaacacac gccacgtcac gtcctggca ctggcccact tcccaataca 2580
gcccttccct gcagctgagg tcacatgagg tgtgggcttc accatcctcc tgccctctgg 2640
gcctcagga gggacacggg agacggggag tgggtcctgc tgagggccag gcctctatct 2700
agggccgggt gtctggctga gtcccggggc caaagctggt gccagggcg ggcagctgtg 2760
gggagctgac ctcaggacac tggtggcca tcccggccgg gccctacatc ctgggccccg 2820
ccacagaggg aatcaccccc agaggcccaa gccaggggg acacagcact gaccaccccc 2880
ttcctgtcca gagctgcaac tggaggagag ctgtgcggag gcgcaggacg gggagctgga 2940
cgggctgtgg acgaccatca ccattctcat cacactcttc ctgctaagcg tgtgctacag 3000
tgccaccgtc accttcttca aggtgaagtg gatcttctcc tcgggtggtg acctgaagca 3060

ES 2 573 027 T3

gaccatcgtc cccgactaca ggaacatgat aaggcagggg gcctagggcc accctctgcg 3120
 ggggtgtccag ggccgcccag accccacaca cgagccgtgg gccatgctca gccaccaccc 3180
 aggccacacc tgccccctga cctcacccgc ctcaaccca tggtctctg gcttcgcagt 3240
 cgcctctga gccctgaaac gcccccttc cagaccctgt gcatagcagg tctaccccag 3300
 acctccgctg cttgggtgcca gggcactggg ggccaggtgt ccctcagca ggacgtccct 3360
 gccctctgga ccaccagggtg ctcacacaaa aggaggtaac cggcatcca ggccccact 3420
 caggcaggac ctgcctctgg agccaacccc gtccacgcca gcctcctgaa cacaggcatg 3480
 gtttccagat ggtgagtggtg agcatcagtc gccaaagtag ggaagccaca gcaccatcag 3540
 gccctgttgg ggaggcttcc gagagctgcg aaggctcact cagacggcct tctcccagc 3600
 ccgcagccag ccagcctcca ttccgggcac tcccgtgaa tctgacatg aggaatgagg 3660
 ttgttctgat ttcaagcaaa gaacgtgct ctctggctcc tgagaacagt ctcggtgcca 3720
 gcaccacccc ttggctgcct gccacactg ctggattctc ggggtggaact cgaccgcag 3780
 ggacagccag cccagagtc cgcactgggg agagaagggg ccaggcccag gacactgcca 3840
 cctcccaccc actccagtcc accgagatca ctcagagaag agcctgggccc atgtggccgc 3900
 tgcaggagcc ccacagtgca agggtgagga tagcccaagg aagggtctggg catctgcca 3960
 gacagggctc ccacagaagg ctggtgacca ggtcccaggc gggcaagact cagccttggg 4020
 ggggcctgag gacagaggag gcccaggagc atcggggaga gaggtggagg gacaccggga 4080
 gagccaggag cgtggacaca gccagaactc accacagagg ctggcgtcca gtcccgggtc 4140
 acgtgcagca ggaacaagca gccactctgg gggcaccagg tggagaggca agacgacaaa 4200
 gagggtgccc gtgttcttgc gaaagcgggg ctgctggcca cgagtgtctg acagaggccc 4260
 ccacgtctctg ctgccccat cacgcccgtc cgtgactgtc acgcagaatc cacagacagg 4320
 aaggaggct cgagcgggac tgcggccagc gcctgcctcg gccgtcaggg aggactcctg 4380
 ggctcactcg aaggaggtgt caccatttca gctttggctt ttcttcttct tttaaatttt 4440
 ctaaagctca ttaattgtct ttgatgttcc tttttgatg acaataaaat atccttttta 4500
 agtcttgtac ttcgtgatgg gagccacctt cctgtgtcca cgcgcctcct gccccgggtg 4560
 gaaaacacgg tcaggaggag gctggtccag ctgcacctcg ggggatcc 4608

<210> 144
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la isoforma corta (slgG) de la región constante de cadena gamma codificada por el plásmido pmlgGdelta-A

10

<400> 144

ES 2 573 027 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

ES 2 573 027 T3

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 145
<211> 399
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Secuencia de aminoácidos de la isoforma larga (mlgG) de la región constante de cadena gamma codificada por el plásmido pmlgGdelta-A
pmlgGdelta-A

<400> 145
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

ES 2 573 027 T3

65		70							75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90					95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
		115					120					125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165					170					175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		195					200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225					230					235					240
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				245					250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				

ES 2 573 027 T3

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Cys
325 330 335

Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu Leu Asp Gly Leu Trp Thr Thr Ile Thr
340 345 350

Ile Phe Ile Thr Leu Phe Leu Leu Ser Val Cys Tyr Ser Ala Thr Val
355 360 365

Thr Phe Phe Lys Val Lys Trp Ile Phe Ser Ser Val Val Asp Leu Lys
370 375 380

Gln Thr Ile Val Pro Asp Tyr Arg Asn Met Ile Arg Gln Gly Ala
385 390 395

<210> 146
<211> 53
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 146
Leu Trp Thr Thr Ile Thr Ile Phe Ile Thr Leu Phe Leu Leu Ser Val
1 5 10 15

Cys Tyr Ser Ala Thr Val Thr Phe Phe Lys Val Lys Trp Ile Phe Ser
20 25 30

Ser Val Val Asp Leu Lys Gln Thr Ile Val Pro Asp Tyr Arg Asn Met
35 40 45

Ile Arg Gln Gly Ala
50

10

<210> 147
<211> 34
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15

<400> 147
Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly Arg Ser Val Val Pro Ala
1 5 10 15

Leu Leu Pro Leu Leu Ala Gly Thr Leu Leu Leu Leu Glu Thr Ala Thr

20

<210> 148
<211> 4551
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

ES 2 573 027 T3

plasmid plgG-GPI-B<223> secuencia de ADN de región constante del casete de expresión de cadena gamma, de CH1 a 3'UTR del plásmido de expresión plgG-GPI-B

5

<400> 148

```

cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcacctc ctccaagagc acctctgggg      60
gcacagcggc cctgggctgc ctggtaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt      120
ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag      180
gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgcctccag cagcttgggc acccagacct      240
acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttggtgaga      300
ggccagcaca gggagggagg gtgtctgctg gaagccaggc tcagcgtcc tgcctggacg      360
catcccggtc atgcagcccc agtccagggc agcaaggcag gccccgtctg cctcttcacc      420
cggaggcctc tgcccgcccc actcatgctc agggagaggg tcttctggct ttttccccgg      480
ctctgggcag gcacaggcta ggtgccccta acccaggccc tgcacacaaa ggggcagggtg      540
ctgggctcag acctgccaa agccatatcc gggaggacc tgcacctgac ctaagcccac      600
cccaaaggcc aaactctcca ctccctcagc tcggacacct tctctctec cagattccag      660
taactcccaa tcttctctct gcagagcca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac      720
cgtgcccagg taagccagcc caggcctcgc cctccagctc aaggcgggac aggtgcccta      780
gagtagcctg catccaggga caggccccag cgggtgctg acacgtccac ctccatctct      840
tctcagcac ctgaactect ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag      900
gacacctca tgatctcccg gaccctgag gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac      960
gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag     1020
acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc     1080
ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc     1140
ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggtg ggaccctgg ggtgcgaggg     1200
ccacatggac agaggccggc tcggcccacc ctctgcctg agagtgaccg ctgtaccaac     1260

```

ES 2 573 027 T3

ctctgtccct acagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga 1320
tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga 1380
catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc 1440
cgtgctggac tccgacggct ccttcttccct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag 1500
gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta 1560
cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgagtg cgacggccgg caagcccccg 1620
ctccccgggc tctcgcggtc gcacgaggat gcttggcacg taccctctgt acatacttcc 1680
cgggcgcccc gcatggaaat aaagcaccca gcgctgcctt gggcccctgc gagactgtga 1740
tggttctttc cacgggtcag gccgagtctg aggccctgagt ggcatgaggg aggcagagcg 1800
ggtcccactg tccccacact ggcccaggct gtgcaggtgt gcctgggccc cctagggtgg 1860
ggctcagcca ggggctgccc tcggcagggt gggggatttg ccagcgtggc cctccctcca 1920
gcagcacctg ccctgggctg ggccacggga agccctagga gccctgggg acagacacac 1980
agcccctgcc tctgtaggag actgtcctgt tctgtgagcg ccctgtcctc cgacctccat 2040
gcccactcgg gggcatgcct agtccatgcg cgtagggaca ggccctcctt caccatcta 2100
ccccacggc actaaccctt ggcagccctg cccagcctcg caccacatg gggacacaac 2160
cgactcctgg ggacatgcac tctcgggccc tgtggagggga ctggtccaga tgccccacaca 2220
cacactcagc ccagaccctt tcaacaaacc ccgactgag gttggccggc cacacggcca 2280
ccacacacac acgtgcacgc ctcacacagc gagcttcacc cggggaacc gcacagcacc 2340
cagaccagag caaggtcctc gcacacgtga aactcctcg gacacaggcc cccacgagcc 2400
ccacgcccga cctcaaggcc cagcagccgc tcggcagctt ctccacttgc tgaccagctc 2460
agacaaacc agccctcctc tcacaaagt cccctgcagc cgccacacac acacaggccc 2520
ccacacacag gggaacacac gccacgtcac gtccctggca ctggcccact tcccaataca 2580
gcccttcctt gcagctgagg tcacatgagg tgtgggcttc accatcctcc tgcctctg 2640
gcctcagggg gggacacggg agacggggag tgggtcctgc tgagggccag gcctctatct 2700
agggccgggt gtctggctga gtcccggggc caaagctggt gccagggcg ggcagctgtg 2760
gggagctgac ctcaggacac tgttgccca tcccggccgg gccctacatc ctgggccccg 2820
ccacagaggg aatcaccccc agaggcccaa gccaggggg acacagcact gaccaccccc 2880
ttctgtcca gagctgcaac tggaggagag ctgtgcggag gcgcaggacg gggagctgga 2940
cggggccggc accaccgacg ccgcgcacc ggggcggtcc gtgggtcccc cgttgcctcc 3000
tctgctggcc gggaccctgc tgctgctgga gacggccact gctccctagg gccaccctct 3060

ES 2 573 027 T3

gcgggggtgtc cagggccgcc cagaccccac acacgagccg tgggcatgc tcagccacca 3120
cccaggccac acctgcccc tgacctcacc gccctcaacc ccatggctct ctggcttcgc 3180
agtcgccctc tgagccctga aacgcccccc ttccagaccc tgtgcatagc aggtctaccc 3240
cagacctccg ctgcttggtg ccagggcact gggggccagg tgtcccctca gcaggacgtc 3300
cctgccctct ggaccaccag gtgctcacac aaaaggaggt aaccggcatc ccaggcccc 3360
actcaggcag gacctgccc tggagccaac cccgtccacg ccagcctcct gaacacaggc 3420
atggtttcca gatggtgagt gggagcatca gtcgccaagg tagggaagcc acagcaccat 3480
caggccctgt tggggaggct tccgagagct gccaaggctc actcagacgg ccttcctccc 3540
agcccgcagc cagccagcct ccattccggg cactcccgtg aactcctgac atgaggaatg 3600
aggttggttct gatttcaagc aaagaacgct gctctctggc tcctgagaac agtctcggtg 3660
ccagcaccac cccttggtg cctgccaca ctgctggatt ctgggtgga actcgacccg 3720
cagggacagc cagccccaga gtccgcactg gggagagaag gggccaggcc caggacactg 3780
ccacctcca cccactccag tccaccgaga tcactcagag aagagcctgg gccatgtggc 3840
cgctgcagga gccccacagt gcaaggtga ggatagccca aggaagggtt gggcatctgc 3900
ccagacaggc ctcccacaga aggctggtga ccaggtccca ggcgggcaag actcagcctt 3960
ggtggggcct gaggacagag gaggcccagg agcatcgggg agagaggtgg agggacaccg 4020
ggagagccag gagcgtggac acagccagaa ctcaccacag aggctggcgt ccagtcccgg 4080
gtcacgtgca gcaggaacaa gcagccactc tgggggcacc aggtggagag gcaagacgac 4140
aaagaggtg cccgtgttct tgcgaaagcg gggctgctgg ccacgagtgc tggacagagg 4200
ccccacgct ctgctgcccc catcacgccg ttccgtgact gtcacgcaga atccacagac 4260
aggaaggag gctcagcgg gactgcggcc agcgcctgcc tcggccgtca gggaggactc 4320
ctgggctcac tcgaaggagg tgtcaccatt tcagctttgg cttttcttct tcttttaaat 4380
tttctaaagc tcattaattg tctttgatgt ttcttttttg atgacaataa aatatccttt 4440
ttaagtcttg tacttcgtga tgggagccac cttcctgtgt ccacgcgcct cctgcccccg 4500
gtggaaaaca cggtcaggag gaggtggtc cagctgcacc tcgggggatc c 4551

<210> 149
<211> 330
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Secuencia de aminoácidos de la isoforma slgG de la región constante de cadena gamma codificada por el plásmido plgG-GPI-B

<400> 149

ES 2 573 027 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Pro
100 105 110

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
195 200 205

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Ala Cys Pro Gly
210 215 220

ES 2 573 027 T3

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 150
<211> 380
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Secuencia de aminoácidos de la isoforma larga de la región constante de cadena gamma, incluyendo el péptido de señal carboxi-terminal de la fosfatasa alcalina placentaria humana codificada por el plásmido plgG-GPI-B

<400> 150
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

ES 2 573 027 T3

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Cys
 325 330 335

Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu Leu Asp Gly Ala Gly Thr Thr Asp Ala
 340 345 350

Ala His Pro Gly Arg Ser Val Val Pro Ala Leu Leu Pro Leu Leu Ala
 355 360 365

Gly Thr Leu Leu Leu Leu Glu Thr Ala Thr Ala Pro
 370 375 380

- 5 <210> 151
- <211> 2061
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

<400> 151
 gtacacactg taacttctcc tctcgatgtc ctgccctcgc cacgggcacg gggggagcat 60
 gcatttccag gcttggggag acacagaggc aggagagctg gaagaatggg ctctgctg 120
 cctggtgccca catcctgccc cagctttgag ggctgaatcc tctcagctca gagaagagct 180
 tccctagttt tgcaggcgca cggaggcctc ccaccctac acctgcctct gctctcccc 240
 tggccattgc aatgcatgcc cgggatctgg gttaccctg cagcccact cctccagggc 300
 aggctccttc cgtccttggg tccagcagcc tccccctcc gctgggtact gagcatctga 360
 aaagtctcag atagggcctt acacctctt tcccttctca agtgctcagc ccaggggtgg 420
 ggcttgctgc ttgcaaagag cagcccaccc tcctgtactg ccatcctatt gcctttgaag 480
 aaggaggcca gcctggacag gtgaactgag ttgccttcag aaaggcctgt ctcaggcagc 540
 cgcagcaggc ttcacgatgt ccatgtatcc tgtttgctg ctgccgtctc tcctctccca 600
 agaggggagg tctgcgtggt gagccaggga ggaaggagcc tgcagcctgc tcagggtggt 660
 ggctggtgac tgcggggcca gggcttgctg ctgtctctcg gaatgtcctg catgtgggtc 720
 tggctgttcc tgetggcact gccctcttct ctctccccct ctttcccact ctgccctgct 780
 tgcccgtcag ggtctccgga tgcccctgct ggaggcagag aagcgttctg tttttatcat 840
 cgtccctgct ttggctctgt ccgtgctccc catgtgctcc caatcagttg tcttcgttcc 900
 tcaacatcag ggaaagaaaa aacagcaaca cttctccctg tcatcagctc tgctgtctcc 960
 10 ttgtcaggcc ttgggacggt ctctgggctc agtctagggt cgtgcctcat gcctcatgcc 1020

ES 2 573 027 T3

tctctgggaa ggttcccagg ggcgccgct ccatggttg ctggtgggtt ttaaagggga 1080
 aggttgggag gaggcctgtg gaaggaggag ggcgctccac acccgtgggg caaagcgtgt 1140
 tccatgaaac cagtgtgtg cgtgtgtgga tgaagcctc ccagcctctc gtgctgaagg 1200
 gaaaggtgga ccgaactggc ttagctgtctg tggcaatggg gtgggggggtg agtcctaate 1260
 agaaggtggg agaagagaat aacaaaatgg aactccgccc cctgcccga catttcctta 1320
 agtttttagga gttggggcct atgagtagaa tttgaaagaa ctaccaaaaa agcttatttt 1380
 tggaaattaa gtcagctttg cctgtggttt ggctaggaat aaatatttac ctgtgtgccc 1440
 ctacagagat gacacagacc caaagtggga cattgagcaa ggcacaggct ggttcccctc 1500
 ctgtcctctg tcctcattct gtgagtgcc ccatcaccag gtactgtggc ctgcagaaat 1560
 aaacgaggca ccaacctgc cctcaggac cccgtgtctt cttagggaca gaggactcag 1620
 aaacatctgt gtccccgcat gtaagtgca tgcacacagt gctgaggctt tgcagagaag 1680
 ggccatggct ccctgaggag accaagaaag gcacatagaa gtgacttctc agctggcct 1740
 tgcaggatcc ctgggtgctt gtacctctcc agtccagctg agcaaggagg ctcaggaatt 1800
 aatgaagatg gggcttgtgt agcacgatgg ttctaggcca tcccttttcc atggctcaag 1860
 tccattgaag gcagcctcca aaatcagggg gttgcctgat cctcctagtg ccacaatccc 1920
 agtcctagct agaacttggc atggttcttc tccctaaaag ttcccagggg acaggagaca 1980
 ggtgttgctt ttctaagga gcgggacctc gcatggacgg ggccctccaa gctgctaac 2040
 acctgttcg cactgactca g 2061

<210> 152
 <211> 2726
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 152
 tacgttcaat ggcagtggat cttaaagacc ttttgatct aagaccagaa gccatctctg 60
 actcccctct cacctccag tttcttcaa atcctctggg ccagccagag gtctcagatt 120
 ctgccctctt gccctgtgcc cacctgttg accactggac agcatatgtg atggctactg 180
 ctagtgccag cttcacaaga ggtaaacact acggactagc cattcttctc atgtatctgt 240
 ttctgcaaat acagccgctt tacttaagtc tcagcacttc ttagtctcct ctttctctct 300
 cagttagccca aggggtcatg tcacaacat ggtgtgaagg gctactttgt caaatgaaaa 360
 ggtctatctt ggggggcatt ttttctttt cttttttct tgaacacat tgcccagcaa 420
 agccaataaa tttctctcat cttttgttt ctgataaatt cttactattg attgaaatgc 480

ES 2 573 027 T3

ttccctgagg aacattaaat tatgtatgaa tttccattca aagtcacat gcagcagtgg 540
 tatcaagcag gcagcatcta gtgcagaact gagattgtct acagaatgcc tgcttgatgc 600
 tcagccttat atcccagtta cggacatgtc tacaatatgc ccttctctta ccatctctcc 660
 cttacttca tgatgtggta gctgattcct tctgccatca actgaaatgg caaaataaag 720
 gaaagcctga atcctgtctc ccctcttagt ttccaaggac acttgcccag aaaaatgcgc 780
 ccccccccc cegtatcccc aggcagcatc caggactttc ttaaatgggt ctctgtacaa 840
 tcccaccttt aaaacagtca gtgaccattc tttgtaatca ttactttatt aatgggtttc 900
 ttttctaaac cacctgcctt tgctgttgta gcttctcaat acatgctctg agacaaatca 960
 ttccttatat attccaatat tgctgaaaac tcattaattt ttactaatag ggggttgttt 1020
 tctaaagctc aggaaatgac ttgtactccc taagtaggaa atgttgcaaa ccaccatttc 1080
 atgatgtaca gttgattcaa ttaagtcagg tctgtgagga ctttggttcc ttatctatat 1140
 gtaaataatg ctgataccaa atctttgcta ttcattaaca tgtaatcttg caaataataa 1200
 taaatttaac agaaactcaa attgaggtag attcttaagg ataatagctt tcagcctagc 1260
 cataaaagaa atgaaaaaat agtctttaa gatcccaaat tcagaattag taatattaat 1320
 tcagatagtc cttcgtgaaga ttgaaaaaca tgacttctga tttctcatct ttccaaagtt 1380
 agacttgacc ttggtgagat ggcaaagtta aaaaattcct ggggtttaag gatatatgg 1440
 ggcaacagtc acagcaacgg tgatgctttt tataatctaaa tcctgtcagg ttttgtttcc 1500
 actgagctca ttcattcacc tagggatctc attaaaagta ggggaccggg ctggtgagat 1560
 ggctcagcag gtaagagcac ccgactgctc ttccgaaggg cctgagttca aatcccagaa 1620
 accacatggt ggctcacaac catccgtaac aagatctgac tccctcttct ggtgtgtctg 1680
 aagacagcta cagtgtactt acatataata aataaataaa tcttaaaaaa aaaaaaaaaag 1740
 taggggacc tatcagaggt ctcaatgtgc ctggaaggtc tccaacatg gctgtgggaa 1800
 aatgcctgac aatttttttt caattgcatg tgtgttctcc gagaaaggat aagatgcaag 1860
 tttatataag aagcaggatt tacttatact aaaatgcctt acacgtaagg ttcaggtagc 1920
 atcgtggcag agagggtaga aagactgtaa gagccagagg accaggatgt ccgctcttag 1980
 tgtcttctat atatgaaaga aagctgtacc cgtgaattct caaacagttg tctacatctc 2040
 acctgcacaa tggccgttct ggaaatctaa aaaaaacaaa aaacaaacaa acaataaat 2100
 aaataaataa atatcaaaaa atcaaaaacc acccctagat gaaaagctac aagtaattaa 2160
 aagctgctaa aagggggaga atcaattttc tccagagaca agtccctgat aggtcatcca 2220

ES 2 573 027 T3

atttcgggtg atcagcccta agcacataca catataagca atactaaacg gacacagctg 2280
 gtctatatac ttacaacttg gggcttgaag gaagttggg ggaaggggg gagagtagta 2340
 atgatgtatg taaatacagt actcatgtac gaaactcccc aaaaataaag aattcttaaa 2400
 attattaaaa actggatttc ttgtcttga ctattttctg aattttatat taatattttc 2460
 atcatcaaaa gactataaaa tgattataat aatgagagaa gttcagatga aacatcaact 2520
 gtcttaaatg tagaaaagga aactgacttc aggcagagaa gctaaaaatg ttggcaacct 2580
 tgccttggga cttagccacc agtcatttcc tctatataag tcacccatat cccaatttct 2640
 gagataattt taaatgttat cactgtgtca aaggtgcagg acatgtatgg aatgcccata 2700
 ttaccttctc ttgtctctca ttccag 2726

<210> 153
 <211> 5686
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 153
 gggtgagttg gcagcaacat ctcttggttt aagagttcca gcacagcgat agtactttct 60
 agccacatct cagcaaggaa actaggctat tgccacctgc tcttaagagg cttgaacaca 120
 ggtgttaact cctgattgaa atgaacaaag ataggagaag attaggggga aaatctgtat 180
 ccttgctgga aaccagggca gtgcacatat aaagagtatg ctgttctactg gatgggaagg 240
 aaaaaaactt agaagtgtag tagtcaaagc acacaaaca cctaaccga gagtagacat 300
 tgctggaaga aaggggaagc catgtagcag ctgtgtgaga gaatgaatct taatgataac 360
 agcatgatcc cttgctaggg ctgccatcaa aaagtacagg ccttcctcgt tttattgtac 420
 ttcgcagatg ttatgctttt tacaattga acgcttggg gaacgctgtg taagcatggt 480
 cgtcggcatc atttatccaa cagcgtgtgt tgacttcgtg tctctgtgta gcattttgat 540
 tattctcaca gtatcccaga tgttttcatt attatcatgt ctgtgatagt gatctgtcat 600
 cagtgatctt tgatgttact attgtcattg tttggggccc ctacgaactg cacccatata 660
 agacagaaaa cttaatcaat aaatgtgcgt gctttgactg ctccatggac tagacattcc 720
 ccttctgtct ccctctcttc aggactccct aatccctgag acacaataat actaaaatga 780
 ctccaattaa taaccctaca atagccttta agtgttgaca tgaaggggaag agtcatgcat 840
 ctcttacttt aaatcaaaag ctagagatga ttaagcttac tgaggaagat acgttgaaaa 900
 ccaagatagg ccaaaagcca ttcctcatgt gccaaacagc tagaaagttg taaaggcaaa 960
 gtaaaaaatac ttgaaggaaa tttaaaatgc tcttccagtg aacacatgta tgataagaag 1020

ES 2 573 027 T3

gtaaaacagc cttattgctg atatggaaga agtttttagtg gtctagacat aagatcaaac 1080
 tagaaacatt tcctgaagcc aaagcgtaat cctgagcaag gccgtaactc tcttcaattc 1140
 tgtgaaggct gacagaagct ggaagctagc agaatttggg tcctgaggtt taaggaaaga 1200
 agccctctcc ataacataaa ggtccaaggt gaagcagcca gtgctcatat agaagttgca 1260
 gcaagttatc tagaaaatct agctaagatc actgacgaag gtgttacact aaataacaga 1320
 ttttccatgt agacaaaaca gccatctatt ggactttcat agctagagag gagaagccaa 1380
 tactggggtt caaagcttca aagaacaggc tgacttttta ggagctaatag ccgctgggtga 1440
 ctttgagttg aagccaatgt tcaccgacca ttctaaaaat cctagggccc ttaagcatta 1500
 agttaaatat accttgctg tgtctataaa tggaagaaca aagcctgatg acagaggat 1560
 gtttgccgca tagtttactg aatattttaa gccactggt gagatctagt gctcagaaaa 1620
 acagattcct ttcaaaatat tactgctcat tgacattgca cctaagcagc caagagctct 1680
 aatggagaag gacatggaga tgaatggagt tttcctgcct gctaacaaca gcagccattc 1740
 tgcagcccat ggctgaagga gtaattttga ctttcaagtt tcactattta agaaatacat 1800
 tttgtaaggt gagtccccac agacagtaat tcctctgatg gatctgaaca aaataagttg 1860
 aaaactgctg gaaagaattc atcattctac ataccattaa gaacattcgt gattcatggg 1920
 aagagcttaa aatatcaaca ttaataggag tttggtagaa gttaattcca accctcatgg 1980
 ctgactttga gaggttcaag acttcagcgg aggaaataac tgaagatgtg gtgaaaatcg 2040
 caagagaact acaattagaa gtggagcctg aagacgtgac tgaattgcca caaattcatg 2100
 atcaaacttg aacagatgag gagttgcttc tcatgaatca gcagagaaag tggttttttt 2160
 gaggtggagt gtcttcctgg tgatgatgac atgagcattg tgaaaatgac cacaaaggat 2220
 acagaatatt acaaaaactt aggtgataaa gcagcagcag tatcgggagg attaactcca 2280
 attttgaaag cagttcagag ggtaaaatgt tatcaaacag cattgcatgc tagaaaaatc 2340
 ttttgtagaa ggaagagtcc atcaatacag caattttatt gctgtctcag ctttaagaaat 2400
 tgccacagcc accccagcct tcagcaacca ccaccctgat cagtcagcag ccatcaacct 2460
 tgaggcaaga ccctccacca acaaaaagat tacaattat tgaaggtcag ataactttta 2520
 gtattttctt atcaataaac ctttttttaa agtatgactt tgtttagaca taatgctatt 2580
 tcacacttaa tagactaccg tatagtataa acacaacttt tagactcact gagaaatcaa 2640
 aaaattcatc tgactcattt gttgtgatat gtgttttatt gtggtggtct ggaactgaac 2700
 ctgcaatata tttgaggaat gtctgtaaca cgaagtgggc ggcttaatac aacagaagtt 2760
 tttggagttc cattctagag actggaaatc caaaatcaag gttttgggag ggccacgctc 2820

ES 2 573 027 T3

cctctgaatc ctgtagggaa ggatccttca ttgcatcttc cagcttctgg agccacaggc 2880
cttccttggc atgtggcagc agaactccaa tttctgtctc tgtcctcata tggccatctt 2940
ccctctgggt ctgtgtcctc atatgctgtt ctctctgtgc atgtctgttt ccaaagtttt 3000
cccttttaat aaggacacca gtcacactgg attagggcct accttcatga cctcacetta 3060
acttgattgc gtctgcaaag atcgtatttc caaataaggt cacatccaca gggactggag 3120
gttaagactt cagcatactc aggggagaca caattcaacc tataacagag cccttttgaa 3180
aatgtcaggc atcaggtgct cacagcacac ggtccagctg ttgggtgctca cccttgctca 3240
gcacacggtg gaggctctgc ctcaatctca ttcttcatgg gaacagctaa gccaggtagc 3300
gaatacgagt tacgtttgtg tcaccacagc agacactgaa aggaagtttg tgggtgccag 3360
cacatttgcc agcataggcc tcacagacca caacacctag aatctgacaa aaattagaat 3420
aaatccgatg tctccttttc tctctttttt taagcatttt taaatacaat tggtaaattt 3480
cctgactgta ccctactcat cttgcattgc tgaataagtg aggaacctct ctatggcatg 3540
aagcagaaaa ccattgagct tatgagaaga aacaggaaat acatgtaaaa gagaccagtc 3600
tgaaaaatca ggagaaattt tacaaaagag atttactgcc aagaaaccag ggaaactttc 3660
agaacactct ccttttcata tttgtaacaa gattcaattg tacaataact tctgtgaaac 3720
tagccatgaa gtgtgtacat gaatgaatat atgtattcag tgtgtttata tatttcattt 3780
catacatgtg atctatatca tatatatata tatatatata tatatatatc acaatgaata 3840
ttgcagaaaa ttaaagcaaa gagtaagaag agttaaccaa atgttccctg aatgcagtgg 3900
gaaaagatga aaaggagaag acaggcaagc acagtggctc acacatgtaa tcccaacata 3960
ttgagaggcc ggggcaagag gatcacttga gcccaggagc tcaagaccag cctggacaac 4020
atggcaaaaa cccatctcta caaaaaagta taaaaattag ctgggcatgg cagcatgtga 4080
ctgtagtcac agctaggcag gagaatgaag tgggaggatc acctgagccc aggaggctga 4140
ggcttcagtg agccttgatg gcaaccctgc actccagcct ggatgacaga atgagaccct 4200
gtctcaaaaa aggaaaaaga gaagacatat gtaacacagt gtcaggattc aaaatacatg 4260
tagcaaaaat tccagaaggg taagcaaata agcccatacc tagccatcac tagggaaact 4320
tctgtgtttc agggatagag aaaaaaactc tgattccaga aataaaatgt gaaaatataa 4380
taccgcgaaa agaaataaat ttattgacac cacattgatt ctatattgta taagatatat 4440
tgtataacac taaattgtag aagatagcac ttctcttgag ccaagcta atgcacacct 4500
agaggctcca ggtacacatt aaaggataag caaagacaca aaaattgtac catttaagta 4560

ES 2 573 027 T3

tgtttcccag gcaattcata agcaaatttt taaaaaggag aatgatgaat tccaaaggaa 4620
 atctcaatga gataggatgt aggtaaaaag aaaaaacaac aataaaaaaa acatacacac 4680
 aaaatcttgg caatgtaata ataatttatt aataatctct ctaaactcat agaatatatc 4740
 aataaaacta gaaaatgtga gacagcaaga aaagataggc tagacttaca ttacagaaaa 4800
 gatgagtaga ctgactatat agagtttgac tctaaaattg agaaaaggagg tttaaataatg 4860
 tgtcacgtgt atatgtataa tatacatgca cacatataaa atgaaattcc tctactggaaa 4920
 aatattaag ttttaattcc aaattattag aatgactaaa acagttgaat ctatctgttc 4980
 catatagtaa ttgaggggga aggaaaagga atagcaagga atccattttt ctcttccacc 5040
 agaaataagc tcctcatgt ttgggtcagg tcaactttatt cattgctttc tccacatcct 5100
 catcattagg catcatgaaa tcaatgaaaa ggcagtgaaa gaatgatgat gaaagctaat 5160
 caaatgtatc atttacctca atacgtttgg tttaatcttc ttgttgaaag acaaattctc 5220
 ctagacagga tcaaaagcaa catatcttgt atttataaaa aacatgtctc aagtaaaatg 5280
 acatagtatt atacacacac acacacatac acacacacac acacattaag ggaaaatgca 5340
 gacaaaaaat ggcagaaata atatttagag aaagatagaa ttttaagaaaa aaaattgtca 5400
 aacaggctctg caaataaatt gttttatfff ggtgccagtt acagtccgca atgaagcgaa 5460
 gatattaaga agcaaagtgg gccaggagaa attagagcag aaatatctct ttcaatagtg 5520
 agagaatagg aaaaagaagt agaaaagctg ggaacaatag gtaaagtta ggctaggcct 5580
 tagacttctc ctgcattgta atccctctgg tttgccacat atgcatgctg tcaggaagtt 5640
 gatgaggtat gtacagcaca atttattttc ctttttttgc ctttag 5686

<210> 154
 <211> 1260
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 154
 gtgagtatca gggctgtagg ctgtgaggat ctctacagcc gtgtatattc tctgttcaga 60
 aattccctct ggctgaccgt ggcgttttcc gttctaggat gcctctaact atacatccct 120
 gtggctgtgg tgtggtgatc cgagggctgc actaacacac agatttctgt ggttgtcact 180
 gttcagggcc acagaatgac tgagtcttct ttctatacag tatgcagtag ctggatagtc 240
 aggactgggg aaggttgtgt gaggttgact cggtgttacc gctgaggagg aaaagggctt 300
 gtccagagca ggcgtgatgt acagcgcaca ttgtttttt cagcaagtaa tgaaaatctg 360
 tgactgagtg accttggggg ctgcgggtgt gaggagagct cacgggaatc ctggagcagt 420

ES 2 573 027 T3

gtgagtatca gggtcgtagg ctgtgaggat ctctacagcc gtgtatatcc tctgttcaga 60
aattccctct ggctgaccgt ggcgttttcc gttctaggat gcctctaact atacatccct 120
gtggctgtgg tgtggtgatc cgagggctgc actaacacac agatttctgt ggtgtgcact 180
gttcagggcc acagaatgac tgagtcttct ttctatacag tatgcagtag ctggatagtc 240
aggactgggg aaggttgtgt gaggttgact cggtggtacc gctgaggagg aaaaggcctt 300
gtccagagca ggcgtgatgt acagcgcaca ttgtttttt cagcaagtaa tgaaaatctg 360
tgactgagtg accttggggg ctgcggtggt gaggagagct cacgggaatc ctggagcagt 420

<210> 155
<211> 2627
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 155
gtaaaccac ccatgtcaat gtgtctgttg tcatggcga ggtggacggc acctgctact 60
gagccgccc cctgtccca ccctgaata aactccatgc tcccccaagc agccccacgc 120
ttccatccgg cgctgtctg tccatcctca ggtctcagc acttgggaaa gggccagggc 180
atggacaggg aagaataccc cctgcctca gcctcgggg gccctggca cccccctgag 240
cctttccacc ctggtgtgag tgtgagttgt gagtgtgaga gtgtgtggtg caggaggcct 300
cgctggtgtg agatcttagg tctgccaagg caggcacagc ccaggatggg ttctgagaga 360
tgcacatgcc ccggacagtt ctgagtgagc agtggcatgg ccgtttgtcc ctgagagagc 420
cgcctctggc tgtagctggg agggaatagg gagggtaaaa ggagcaggct agccaagaaa 480
ggcgcaggta gtggcaggag cggcgagggg gtgaggggct ggactccagg gccccactgg 540
gaggacaagc tccaggaggg ccccaccacc ctagtgggtg ggcctcagga cgtcccactg 600
acgcatgcag gaaggggcac ctccccttaa ccacactgct ctgtacgggg cacgtgggca 660
caggtgcaca ctcacactca catatacgcc tgagccctgc aggagcggaa cgttcacagc 720

ES 2 573 027 T3

ccagaccag ttccagaaaa gccaggggag tcccctcca agccccaag ctcagcctgc 780
 tcccctaggc cctctggct tccctgtgtt tccactgtgc acagatcagg caccaactcc 840
 acagaccct cccaggcagc ccctgctccc tgcttgcca agtctcccat cccttcctaa 900
 gcccaactag gacccaaagc atagacaggg aggggccacg tggggtggca tcagaagcag 960
 gccagtgaga cagggcctgc ccagggcct ctgcatgcct ctggctctg cctggggctc 1020
 ccaggagtgt aagaacagtc ccacaaccac tgtggggaca cctggcacc agactcccac 1080
 aagggggcag tggggcccct gctcgtgcct tagacatctt ccgggcctcc ccagggcccc 1140
 ccgcttctg gctgcctccc tetgctetca gggccaaggt gaggtggagg cactgtcac 1200
 ccctgagggt ccagtcacca gaggtaatt gagagcaaca ggtcactcg ggaagccctg 1260
 ccacagagaa gccctccagc ccatgggacc caggacctg cccaggggag gggcttttaa 1320
 agagaggggg aaagaggag aatcaacaga tgaggggctg aaccagcaga cagagatcag 1380
 gcagacacat gggtagatcc taggacatat aatgaatgga tgggtggatg gaggattggt 1440
 agacggagga tggatgggtg ggtaaatggc tggatggagg atggacagat ggatatatga 1500
 tggatggatg aaggacgggt ggatggagga tggatgagt gatgaatgaa ggatggaaga 1560
 tggatggatg gatgggtgga tggactgat gatgatggat ggatggatgg atggatgatg 1620
 gatggatgg taggcgatg gaggatgga ggggtgatg aggatggaag atagatggag 1680
 gggatgatg aggatgggtg gactgacgga ggattgagga tactggggtg ggtgggtggg 1740
 tagatctatg gaggataggt gtatggaaga taattggatg gagaattgct ttatgaaatg 1800
 atgaatgaag agatgaaaa tagctttata gatggatggg tgaatggatg gatggataga 1860
 tggagaagg atgaatggat ggaaaatagc tttatagata tatgggtgga tatttaagtg 1920
 atagccttac attaatagat gaatggagga tgaatggtg ggtgagtgg taggagtgtt 1980
 actgatggag ggggtgatat acggataata gctttataga tggatggatg gatagatgga 2040
 tggaggata gaaagacagg tgaatgactg gatgtatcag catatgaca gcaggtacag 2100
 ctgtacatg gaggtctatg ccctgagacc ctgaggaaaa tgaggatgcc cgtgctggtg 2160
 gccctcact gccctcgct tgtaaccct cagccacatt ccctgggaag gcaacagagg 2220
 cctctggtct tgccattca accttgcca cactgagtgt cagaccagg tctctgtctt 2280
 ggaccagat ctcttgagg gtgggtgtgt ctggtcctct ctggccccg gaccagtca 2340
 ctgaatacgt ggctgggact gagacgggt ggggtgggag gggcgggagg gtacctcggg 2400
 ctcaagcttc ccttgagaa gcagatggtg tccactttct gcctgcca gtctctcct 2460
 gaagtgcct aagaatgca aagacagaag gtcccagccc ctcacctggg actctgcctc 2520
 ctcacctcc ctgggggagt ctcaggcctt agatggggac ccagaccaca ctgtccccag 2580
 accccaagga agcatagccg ctgttcacac gagtctgggc ctggcag 2627

5 <210> 156
 <211> 1937
 <212> ADN

ES 2 573 027 T3

<213> Homo sapiens

<400> 156

gtaaagtacg tactcctgcc tccctccctc ccagggctcc atccagctgt gcagtgggga 60
ggactggcca gaccttctgt ccactgttgc aatgacccca ggaagctacc cccaataaac 120
tgtgcctgct cagagcccca ggtacaccca ttcttgggag cgggcagggc tgtgggcagg 180
tgcattcttg cacagaggaa tgggcccccc aggaggggca gtgggaggag gtgggcaggg 240
ctgagtcccc ccaggagagg cgggtgggagg aggtgggcag ggctgagggt ccaactcatcc 300
atctgccttc gtgtcagggt tatttgtcaa acagcatatc tgcagggact catcacagct 360
accccgggccc ctctctgccc ccactctggg tctaccccct ccaaggagtc caaagaccca 420
ggggagggtcc tcaggaagg ggcaaggag cccccacagc cctctctctt gggggcttgg 480
cttctacccc cctggacagg agccccctgca cccccaggta tagatgggca cacaggcccc 540
tccaggtgga aaaacagccc taagtgaac cccacacag acacacacga cccgacagcc 600
ctgcccgaag tctgtgccac tggcgttcgc ctctctgccc tgtcccgcct tgccgagtcc 660
tggccccagc accggggccg gtggagccga gccactcac accccgcagc ctccgccacc 720
ctgcccctgtg ggcacaccag gccaggtca gcagccaggc cccctctcct actgcccccc 780
accgcccctt ggtccatcct gaatcggccc ccaggggatc gccagcctca cacaccagct 840
ctgcccact cacgcctcac tcaaggcaca gctgtgcaca cactaggccc catagcaact 900
ccacagcacc ctgtaccacc accagggcgc catagacacc ccacacgtgg tcacacgtgg 960
cccacactcc gcctctcag ctgcctccag cgaggctact gccaaagcct tcctctgagc 1020
catacctggg ccgctggatc ccagagagaa atggagaggc cctcacgtgg tgtcctccag 1080
tccaaccctc cctgtcacc tgtcagcagc agcaccacac agccaaacac aggatggatg 1140
cgtgggctcc atccccact cacccacacc ggaaccccag agcaggctac gtgcccctca 1200
cagacctcaa accacatgt gcatctgaca cccagatcc aaacgctccc cccggtcatg 1260
cacaccaagg gcacagcacc caccaaatcc acacggaaac acgggcaccg ggcaccccat 1320
gagcacaag cccctccatg tctgaagaca gtccctgcac accgtcacag ccatacatc 1380
agcttactc tcacgtcca gccacctgc accagctct gggcctggag cagcagaaag 1440

ES 2 573 027 T3

aggtgtgagg gccccgaggcg ggacctgcac ctgctgatga cccgggacca gcaggcagct 1500
 cacggtgttg ggggaagggag tggagggcac ccagggcagg agccagaggg accaggctgg 1560
 tgggcggggc cgggccgggg tagggccagg aggcagctct ggacaccac aggcctgggc 1620
 tcatagtcca caccaggaca gcccctcaga gcacccatgc agtgagtccc aggtcttggg 1680
 agccaggccg cagagctcac gcatccttc gagggcctg agtgaggcgg cactgctgt 1740
 gccgaggggt tgggtccttc tctggggagg gcgtggggtc tagagaggcg gagtggaggt 1800
 aaccagaggt caggagagaa gccgtaagga acagagggaa aatggggcca gagtccgggc 1860
 gcagggacga gaggtcagga gtggtcggcc tggctctggg ccgttgactg actcgggacc 1920
 tgggtgccca ccctcag 1937

<210> 157
 <211> 1301
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 157
 gtaaagtgt ggcagggccg gcaagcccc gctccccggg ctctcggggg cgcgcgagga 60
 tgcttgacac gtacccctg tacatacttc ccgggacacc agcatggaaa taaagcacc 120
 agcgtgccc tgggccctg cgagactgtg atggttcttt ccacgggtca ggccgagtct 180
 gaggcctgag tggcatgagg gaggcagagc gggctcccact gtccccacac tggcccaggc 240
 tgtgcaggtg tgcctgggccc gcctaggggtg gggctcagcc aggggctgcc ctcgccaggg 300
 tgggggattt gccagcgtgg ccctccctcc agcagcagct gcctgggct gggccacggg 360
 aagccctagg agccctggg gacagacaca cagcccctgc ctctgtagga gactgtcctg 420
 tcctgtgagc gccctgtcct ccgaccgcga tgcccactcg ggggcatgcc tagtccatgt 480
 gcgtagggac aggcctccc tcacccatct acccccacgg cactaaccct tggcagccct 540
 gccagcctc gcacccgat ggggacacaa ccgactccgg ggacatgcac tctcgggccc 600
 tgtggagaga ctggtccaga tgcccacaca cactcagc ccagaccctg tcaacaaacc 660
 ccgactgag gttggccggc cacacggcca ccacacacac acgtgcagc ctcacacag 720
 gagcctcacc cgggcgaacc gcacagcacc cagaccagag caaggtcctc gcacacgtga 780
 aactcctcg gacacaggcc cccacagacc ccacgggca cctcaaggcc cagagcccg 840
 tcggcagctt ctccacatgc tgaccagctc agacaaacc agccctcctc tcacaagggtg 900
 ccctgcagc cgccacacac acacaggccc ccacacacag ggaacacac gccacgtcg 960
 gtccctggca ctggcccact tcccaataca gcccttcct gcagctgggg tcacatgagg 1020
 tgtgggcttc accatcctcc tgcctctgg gcctcaggga gggacacggg agacggggag 1080
 tgggtcctgc tgagggccag gtcgctatct agggccgggt gtgtggctga gtcccggggc 1140
 caaagctggt gccagggcg ggcagctgtg gggagctgac ctcaggacac tgttgccca 1200
 tcccggccgg gcctacatc ctgggtcctg ccacagaggg aatcaccctc agaggcccga 1260
 gccagcagg acacagcact gaccaccctc ttctgtcca g 1301

10

<210> 158

ES 2 573 027 T3

<211> 1553
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5 <400> 158
 gtaacacctc cctccatccc tcttaggcct ccatgtagct gtggtgggga aggtggatga 60
 cagacatccg ctcaactgtg taacaccagg aagctacccc aataaacact cagtgcctga 120
 ttagagccct gggcgcctgt tcttggggaa ggcaggttat gggcagaaat atcttggcct 180
 gaaagaaggg acacccaag agaaggacag gagtgaagca tggctcacc atctgtctat 240
 gtgttgata tttgacaaat aggacatcac aggacttcag cataggtacc cctggctcctt 300
 cctgctcttc actggatata atgcacctga tctctagaga tgcagctaaa atgagccagt 360
 ctgggaaacc tcagcaccca cctctcagtc ttgcaagctc ctgctcccag acattcctgg 420
 atactaaacc ccttcaggta gagaacagc caaagtcaac atctaggacg caggactcaa 480
 catggtcctg ctccctccct ctctactcaa cagccattga ggctgagccc accgcccaca 540
 ccgctcgcct tgccaaatga tcacaccagg cctgggtgctc ctctgtttac tacctaaact 600
 cactccaacc caaattcctc ccaaggacca gaatgggctg acagcctcat acagtcaggt 660
 tccccatct atgacatggt ttcacatgca tgcacacaca cacacacaca cacacacaca 720
 cacacacaca cacacacaca cacacaggct tcattgagct ctctggttta gcaatagccc 780
 aaagcaagcc atacatccat cccagttcca gaaggataag aaaaccagaa ccaagacaca 840
 cccacaccta ttccataccc aaccaacagc acatatggct tacacacctg agattagtgg 900
 ctcccatcat gtacacacac atgcacacaa aggagcccat acatacccat catttccaga 960
 ggtaagtatc taacctttgg atctgagata tctctgagga acaccaatgg cagagtcaac 1020
 cagcacctca gcctccagac taaatcctta cattttggcc cacccaagc catgagagat 1080
 ggaggagggg ggaggcctga gctgcgggaa agcagagaca ggaagatgga ctgtttggtg 1140
 agagtagtaa accagacaat ggggagacta aggcaggagt agagccccta caaggcccag 1200
 agtctgcttt agagtccatg tgtcctgacc tgcccctcag atgccacaac caagatttct 1260
 ggttccagag catgcatgca ggcctagaa atggacctat gagctcagag ccttcttaga 1320
 gagcctggg tactctctga aaaaaggca attctgtgta gaggcacct ctggccaaag 1380
 accctaagac agtcatacac acacacacac acacacacac acacacacac aacacacaca 1440
 acacacacaa cacaggtagg tttatcatg ctctttgggt tagcaatagc cctgttgatg 1500
 gtgggggata ctgggtcact gtgggcactg gagtagaaag agggaatgaa cag 1553

10 <210> 159
 <211> 1354
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15 <400> 159

ES 2 573 027 T3

gtaaatgagc tcagcacaca caatgctcct gggctctaata ggacactggc acctatatcc 60
atgcatccct tgtataaata aagcaccag caaagcctgg gaccatgtaa aactgtcctg 120
gttctttcca aggtatagag catagctcac gggctgatag ttctagccag ggttggagga 180
cagccttgtc tttaggtttc tgcactgcag gactcagagc tcatgagtca tcttggcctg 240
aagagtggaa cttagcttta ggcagtatct ttcctttact tcccacaaac cagcagctgc 300
cagacataga gataatccta ggaagcctca aatggagaag cacacaaacc cacctcctc 360
aggctgttcc tctccccagg cccacttct ttacctaagg gtttctctga gtctattgta 420
gaggcacaca tggccaggga tattccggag acccttagca tccatacact caactcaggc 480
agcttttcac aggtgaggtc tgcacatcca tacagagggc tcaactcctgc ctgtgccag 540
tggggctgag gcacatggct cttgctgccc caagggaggg actattagat agccacagtc 600
atgctgaatc ctgaccatt caaattagcc tgctgaacac catccagtcc atatagcaca 660
tgtatccaca tgcactgtg cacacacaca ttaacacac tgggacaact cctctgtgccc 720
ctgcacagca cctacatcca gcaatgtatc accatacaca cggccaaaaa ttcaatgccc 780
acgtttctgc catcacaac agacacacct ttcctctctg tggccactgc attatatgct 840
caacacaaga cctctgaagc cagatccatc tctggtacct cagggctatg cttcaacccc 900
acatgaatta tgcaaaccat agccataatg gtctgaatca cttcacattg gaatggccc 960
aagatcaggc aagaaaagcc acaggctctg ttgatgactg aaggacagca aagggctcagt 1020
ccagctgtat aaccactgtt gacctgggtc acagaccctg ctgaccctcc atattctctt 1080
gtactgaatg aatgaaaaat gagacaagca tagagggccc ttgcacaatc taggtcagta 1140
tgaggcttac ccgaggcatc attggagtca gctggaggaa gctgagactg atgtcccaga 1200
gggaaaggaa aagaaagaag gctccaggaa gggctctgctg taccagtccag gctggagctc 1260
tctcctctac ttcattgcaa catgtctgca tcacagggaa tctctcccag caccaacct 1320
ggtgggacaa aactgactg tcctctctgt tcag 1354

5 <210> 160
<211> 81
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 160
tcgcccctgt acctggagat catcatctat tgcacagggg ccttctctcat ctctgcatg 60

10 gtggggctgg tcatcgtcta c 81

<210> 161
<211> 90
<212> ADN
15 <213> Mus musculus

<400> 161
cttctctctctc tctctctctctc tctctctctctc tctctctctctc tctctctctctc 20
ctctctctctctc tctctctctctc tctctctctctc tctctctctctc tctctctctctc 20

20 <210> 162
<211> 29
<212> PRT

ES 2 573 027 T3

<213> Homo sapiens

<400> 162

Thr His Asp Ala Leu Ile Val Gly Thr Leu Ser Gly Thr Ile Phe Phe
 1 5 10 15

Ile Leu Leu Ile Ile Phe Leu Ser Trp Ile Ile Leu Lys
 20 25

5

<210> 163
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

10

<400> 163
 cgccttccac tgggggtcac catctcctgc ctctgcatcc cgttgttttg cctgttctgt 60

tacttcagca ttaccaagat t 81

15

<210> 164
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 164
 accatcacct tctcaccct ctctctgctg agcctgttct atagcacagc actgaccgtg 60

20

acc 63

<210> 165
 <211> 87
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25

<400> 165
 tggacgtgga cggcctctg catcttcgcc gcactcttcc tgctcagcgt gagctacagc 60

gccgcatca cgctcctcat ggtgcag 87

30

<210> 166
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

35

<400> 166
 gggctgtgga cgaccatcac catcttcate acactcttcc tgttaagcgt gtgctacagt 60

gccaccgtca ccttcttc 78

40

<210> 167
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 167
 gagctgtgga ccagtatattg tgtcttccatc accctgttcc tgctcagtgt gagctatggg 60

gccactgtca ccgtcctc 78

45

<210> 168
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

50

<400> 168

ES 2 573 027 T3

gggctctgga caaccatcac catcttcac agcctcttcc tgctcagcgt gtggtacagc 60

gcctctgtca cactcttc 78

<210> 169

<211> 3111

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 169

gtgagtatca agaggcctaa gcaatggtaa tctccactct ccattcttcc cctgtggcca 60

gacacttccc ctggctgagt ctctgggctt ttatatcata ggatgcctct aatggcaatc 120

ES 2 573 027 T3

ctgccattag atacacctgc cgtggtgtat ctgccaggta ggcaggctag gctgcagtaa 180
 caaacaagcc cacaatttcc atggcttaac actatgggaa tatatttctt gctcacgtaa 240
 caagctaacg tgaatggtgc tggttttag gtggtttccc tccctgtaga aatctgggga 300
 gtgaggttct ttccatcttg tggtgccgtc attctccagg acaaagattc ttacctactt 360
 ttgtgtcctg gtttcctttg gcagcctggt gaagcctatg gacctcattt cagaatattt 420
 ttaaatacat aaaatcccag cctgggcaat atagtgaac ccccatctgt acaaaaatta 480
 gccaggcatg gtggcatgca cctgtagtcc caggactggt gaaggctgag gtgggaggat 540
 cacttgagcc caggagttag aggctgcagt gagccgtgat cgtaccactt tactcccacc 600
 tgggtgacag agcaagagcc catctctaaa aataaataaa tacaatgaaa taaaataaaa 660
 taaatagaac tacagaggaa actaattgta ttgaaatgca gttataaaac atttaaacac 720
 atttttaatc tagagatata tgtgcttctt tattaagatc tataaataat aagttctagg 780
 ggtagctcgc ataaatactg taatttcaa gtagataagc ataaataata ctttatgata 840
 ctgaaattgt gatgtgatat gagaatagct gtgagttttg ttttgctggg gacaggatca 900
 gtgatgctgt cactactggg gtctcttccc tccattcttt ttttaaaatt gtattttatt 960
 ttatttttaa aattttaaaa taaatagaga cagggtatca ctatggtgcc caggctgctt 1020
 ttgacctcct gggctccagt gatcttccca tcttggett ccaaagtgct gggattacaa 1080
 gtgggagcca gtgttccctg ccccttctc cattcttaat ggaaggagat gctaggtgtg 1140
 agaggttagg gaaagtaaag atgtaatttc tttcccatcc aagttctcag acccctgaat 1200
 tctacctgca gccatggttg tccatcaacc ccaagtgaag aatccctgct ctagggcccc 1260
 accattgtct gtatccagcc agcagaagag gcgtgattat ggagatcaca tctgcttctt 1320
 gaaagcagac agcccggaag tgggccgcat cacttctct caaattctat tggtgaaaaat 1380
 ggtcacatga ctacacatag ccacaaagga ggctgggaac tttctcactt ggaacctaca 1440
 tcccagaaac aactcttttc agtgaggtat cccacaggtc tttcgagta gaaatattga 1500
 ttatctcaca taaaatgaag tcttacaat ggacctactg ggtttgtac agcagccaag 1560
 tgatatctct tcccttctgc tgtcttccct tctgcatcc ttcacatggt ggcattgtat 1620
 ccttagactt gccaccatg ccctcagggt ggccgttgca cactgtctta cataaagcag 1680
 gaaggaaagg aaaggctgct acgagagagt gtacctgtg catctctttt ttaatcagga 1740
 agcaaacatc tttctagaag cttccctagc aaaattcccc ttacatctca ttggccaaga 1800
 ctggtacatg ttacatggtt actgttatta cttgctcatt gcaaggaaga ctgggaactc 1860

ES 2 573 027 T3

aaatgcctgg aaaaaggaac aggataatcg tgattggctc aagccttagg gtgggcatgg 1920
 ctccctgaca agggagagag gaaaaagctg ttgagtgaag aagactgctt cagtttcccc 1980
 atctgtataa tgggaggagt aagggtctgc gtaaaaactc aatgaaagaa gattcttcaa 2040
 cgtggtaggt gcagtggcag ctggcagtac cctgaccctg ccaccgcaca gccctctcag 2100
 cattgctcat cctgcaactgt ggatatcagt tgagccacgt gtctcctgcc ctgggctgtg 2160
 agctccatag gcagggctctc catggctgta tctccagaac ccagcacaga accaggtgct 2220
 tgggaaagt ttgaattgat tctcatctgc cattggcatg gggaagggaa ctagcttgta 2280
 tgaacagat aacaatgtat gggaccctca ttcattattt cagcaaataat ttgctgagtt 2340
 cctcctacat ggctagccct gtgctagaca ctggggaatc ggcgatgaac aaagcagata 2400
 gaaatcccca ctcttggtga gctgacattc tggagggaga gacaaaaagc aaacatataa 2460
 agaaagaaag aaatcacatg gatctggatg acagtgagtg ctgggaagaa aataaaagca 2520
 gaggaagggg atggagcgat gggcaggggg caacggtagg gaggggtgctg gggaaaactt 2580
 tttggagaat gtgacgatga aagtgaacaa ggagaagtca accgtgttga gatgatggca 2640
 gctaattgat tggacaggcc actctgttct gagtgcatta tctattgatt catcatgtca 2700
 tcctcgcaac agccctgcac gatcaattct gtcattaacc ccatagtaca gatgaggatg 2760
 cggaggcaca gagaagataa gggacttctc ctgtgtcaca cagcaaggag ccatccggct 2820
 cctaagttgg tgcatttgac ttctgtgctt ccgaaagaa agagcagcaa gtttaagatc 2880
 tggaggtggc actgagcttt ggaggagcag ggggcaatga ggtggccggg gtgacgagga 2940
 ctcaatgtgc aagagggaga gtgggggga gatgaggtgg aggggtggtc ggcggtcaga 3000
 tcgtggaggg tctcggacga gggctcctgac cctgggtctc cagtcttggg aagtggagcc 3060
 caggctgtac catggctgac ctcagctcat ggcttcccct cccacttcca g 3111

<210> 170
 <211> 2093
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 170
 gtaaattgacg tactcctgcc tccctccctc ccagggctcc atccagctgt gcagtgggga 60
 ggactggcca gaccttctgt ccaactgttgc aatgacccca ggaagctacc cccaataaac 120
 tgtgctgct cagagcccca ggtacacca ttcttgggag cgggcagggc tgtgggcagg 180
 tgcattcttg cacagaggaa tgggcccccc aggaggggca gtgggaggag gtgggcaggg 240
 ctgagtcccc ccaggagagg cgggtgggag aggtgggcag ggctgaggtg ccaactcatcc 300

ES 2 573 027 T3

atctgccttc gtgtcagggt tatttgtcaa acagcatatc tgcagggact catcacagct 360
 accccggggc ctctctgccc cactcttggg tctaccccct ccaaggagtc caaagaccca 420
 ggggaggtcc tcaggaagg ggcaaggag cccccacagc cctctctctt gggggcttgg 480
 cttctacccc cctggacagg agcccctgca cccccaggta tagatgggca cacaggcccc 540
 tccaggtgga aaaacagccc taagtgaaac cccacacag acacacacga cccgacagcc 600
 ctgcccgaag tctgtgccac tggcgttcgc ctctctgccc tgtcccgcct tgccgagtcc 660
 tggccccagc accggggcgc gtggagccga gccactcac accccgcagc ctccgccacc 720
 ctgccctgtg ggcacaccag gccagggtca gcagccaggc cccctctcct actgcccccc 780
 accgcccctt ggtccatcct gaatcggccc ccaggggatc gccagcctca cacaccagt 840
 ctgcccact cacgcctcac tcaaggcaca gctgtgcaca cactaggccc catagcaact 900
 ccacagcacc ctgtaccacc accagggcgc catagacacc ccacacgtgg tcacacgtgg 960
 cccacactcc gcctctcacg ctgcctccag cgaggctact gccaagcct tcctctgagc 1020
 catacctggg ccgctggatc ccagagagaa atggagaggc cctcacgtgg tgtcctccag 1080
 tccaaccctc cctgtcacc tgtcagcagc agcaccccac agccaaacac aggatggatg 1140
 cgtgggctcc atccccact caccacacc ggaaccccag agcaggctac gtgcccctca 1200
 cagacctcaa accccatgt gcacttgaca cccagatcc aaacgctccc cccggtcatg 1260
 cacaccaagg gcacagcacc caccaaatcc acacggaaac acgggcaccg ggcaccccat 1320
 gagcaciaag ccctccatg tctgaagaca gtccctgcac accgtcacag ccatacattc 1380
 agcttactc tcactgccc gccacctgc acccagctct gggcctggag cagcagaaag 1440
 aggtgtgagg gcccgaggcg ggacctgcac ctgctgatga cccgggacca gcaggcagct 1500
 cacggtgttg gggaaaggag tggagggcac ccagggcagg agccagaggg accaggctgg 1560
 tgggcggggc cggccgggg tagggccagg aggcagctct ggacacccac aggcctgggc 1620
 tcatagtcca caccaggaca gccctcaga gcacccatgc agtgagtccc aggtcttggg 1680
 agccaggccg cagagctcac gcactcttc gagggccctg agtgaggcgg cactgctgt 1740
 gccgaggggt tgggtccttc tctggggagg gcgtggggtc tagagaggcg gagtggaggt 1800
 aaccagaggt caggagagaa gccgtaagga acagagggaa aatggggcca gagtggggc 1860
 gcagggacga gaggtcagga gtggtcggcc tggctctggg ccggtgactg actcgggacc 1920
 tgggtgccc cctcagggc tggttggcgg ctccgcgcag tcccagaggg ccccgatag 1980
 ggtgctctgc cactccggac agcagcagg actgcccaga gcagcaggag gctctgtccc 2040
 ccacccccgc tgccactgtg gagccgggag ggctgactgg ccagggtccc cag 2093

<210> 171
 <211> 1285
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 171

ES 2 573 027 T3

gtaaatgagt gccagggcgg gcaagccccc gctccccggg ctcteggggt cgcgcgagga 60
 tgcttggcac gtaccccgtg tacatacttc ccgggcgccc agcatggaaa taaagcaccc 120
 agcgtgccc tgggcccctg cgagactgtg atggttcttt ccacgggtca ggccgagtct 180
 gaggcctgag tggcatgagg gaggcagagc gggctcccact gtccccacac tggcccaggc 240
 tgtgcaggtg tgccctgggccc gcctaggggtg gggctcagcc aggggctgcc ctccggcaggg 300
 tgggggattt gcccagcgtg ccctccctcc agcagcacct gccctgggct gggccacgag 360
 aagccctagg agcccctggg gacagacaca cagcccctgc ctctgtagga gactgtcctg 420
 ttctgtgagc gccctgtcct ccgacccgca tgcccactcg ggggcatgcc tagtccatgt 480
 gcgtagggac aggccctccc tcacccatct acccccacgg cactaacccc tggcagccct 540
 gcccagcctc gaaccacat ggggacacaa ccgactccgg ggacatgcac tctcgggccc 600
 tgtggagggga ctggtccaga tgcccacaca cacactcagc ccagaccgt tcaacaaacc 660
 ccgactgag gttggccggc cacacggcca ccacacacac acgtgcacgc ctcacacag 720
 gagcctcacc cgggcgaacc gcacagcacc cagaccagag caaggtcctc gcacacgtga 780
 acactcctca gacacaggcc cccacgagcc ccacgcggca cctcaaggcc cacgagccgc 840
 tggcagctt ctccacatgc tgaccagctc agacaaacct agccctcctc tcacaagggtg 900
 cccctgcagc cgccacacac acaggggaac acacgccacg tcgcgtccct ggcactggcc 960
 cacgtcccaa tacagccctt ccctgcagct ggggtcacat gagggtggg tttcaccatc 1020
 ctctgccct ctggggctca gggagggaca cgggagacgg ggagtgggtc ctgctgaggg 1080
 ccaggtcgct atctagggcc ggggtgtctg ctgagccca gggccaaagc tggtgcccag 1140
 ggtggacagc ttccgggagc tgacctcagg acattgttg cccatcccgg ccgggccta 1200
 catcctgggc cccgccacag agggaatcac ccccagaggc ccaagcccag ggggacacag 1260
 cactgaccac ccccttctg tccag 1285

<210> 172
 <211> 6350
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 172

ES 2 573 027 T3

gtaagtcaca actgggtaag agtgtcaagc aaggacagca cttggtacct atgatagaca 60
 aatactcctg tttgggaaga ggaggtctgc attgtctaga taagaggaac actgtgctta 120
 tctgtttcag tttaaaagac agaactacat aacacttcac cctttctaca acacttagat 180
 ttttcagccc tctcctctat ggtgtttcct gaacctgaa gaaagtgata tagatgttta 240
 tttattttct agggccactg ttccaaagaa acaatcacgt attattagca gcttgaccag 300
 gtgtgaatth cccccagtat ccacttctgc tccctgtggg atgaagtccc tccataagta 360
 aagttgaagg ctgtgggcat aaatgcaa at gctgtaatc caatthtaca agtccatgac 420
 atacatthaa caaacaatag cagtacttc tctactggag cctatgaact cccagctat 480
 aggtthttcc cttctgcaga gcagagctta aatccaatag ggaagaagt ggttgtaccc 540
 ataactgcca taccactatt acaccaataa gcacatctta catagcaaga caattagtgt 600
 agcactcaaa gtccatgttc aagagagaat gttggcaaca gcctatataa catctcccag 660
 cacagaaaag aaaaggaaaag gaaaggaaaag gaaaggaaaag gaaaggaaaag gaaaggaaaag 720
 gaaaggaaaag gaaaggaaaag gaaaggaaaag gaaagaaaag aaaagaaaag aaaagaaaag 780
 aaaagaaaag aaaagaaaag aaaagaaaag aaaagaaaag aaaagaaaag aaaagaaaag 840
 aaaagaaaag aaaagaaaag aagacagcca gaaggcagct tccacttcag tccatgcccc 900
 tgtthttctat gtcttacagc caaggttagt gaagtctcta gcagtaggaa tttatcatct 960
 acttctggca tgcaagtaaa atcaatggtg ataactthtg tggthtggg ctccttggga 1020
 gcctccctga acaataatth atgcagaggt agcccagctt tgccactggg gcttccatta 1080
 aacaaactth ggattgaggg agtgtcttht tctacctgca cacagtgatt cctatgthtt 1140
 aactcttaat gagtcaactgt tgtthgttgt tgttgttatt gttgttgtta ttgttgttgt 1200
 tgttgttgtt tctatcaacc cagacactat agggctataa ggcaggtgga agcatcaactg 1260
 gctccagctg ttctcagtea tgctcttcct atcaatgtht gtgtaatgac tgccccttht 1320
 actgtcggth ttctatgggt gcctatggat aacgctgggt tgggcgaaac ccttgatggc 1380
 agctthtccc actgcttget tatccatgta ggtgagagca cattcaactc cacttgagag 1440
 gcttaggcct ttatgaagtc tgccatgacat atgggatagg taggcttata tgcttacc 1500
 tcatgcaccc atgtgctggg accataagca agatcagacc tcacctgttc atgtagcatg 1560
 cagaggatca gaatatthca caagaatgcc agaagctctc attactctct ggccttctct 1620
 taaagatcac atctctaac aaagcttacc aaagccacta acatctgagt tagtctact 1680
 caggtacaca tthcttaatg ctccagcaaa agcatcteta cccacttcat tgggcactaa 1740
 acaccacttc tcacatgtht agagthttth gthaagactt taaattatct ttcagtcatg 1800

ES 2 573 027 T3

tctgatgttc atgggcacct cagccagtaa taactgagtg tttctggtgt gtgcaggttt 1860
 ttgtctgttt tgtgttgttt atatgccagg aaaaagctgt ttagtacaga tctaattggc 1920
 attccccttc cttcatggtg tggatatttc ttttgagtta aaacatcccc tcttgtggca 1980
 gggggagggc tagaggtaa tggaatgatt tcccagttt ccttgataa atgaaacctt 2040
 tgtctcaggg aaggaagaat ggttctactt ctgtttctcc acttcatgat gctgactcta 2100
 gcctcttcca tgccccgtgt ctccaggcta tgaaggaatc cagcatgctt ttctctcttc 2160
 cttccttacc ttcttcatgg gttccaagtg ggttcctgtg gtttccacag gaaaggcttt 2220
 ttagcacaaa tctgatctgt actgtctttc ctttatcccc tgccagctct gagacagaaa 2280
 gccagcatct ctatcagaat ctctcttttg ccttcagaat cagagaccac tgtgaaaggc 2340
 agcatccgtg catctttttt tccattgtac tccttcatta cgtgagcaag atttttctaa 2400
 gcagatagct tagccttcat cgcacatctt agcacacact gcaaagtca cacagacagc 2460
 ttgctatgcc atcccatgta tactattttc aaggattgca ataccttctc tgatctgaaa 2520
 tccattcaag taaaacaaca tgttgcaggt ccaattcaag aggcattgcca cctcatacca 2580
 tataaaagaa gatggtcagc aaaaattcct gctctctcag acaactcaga cttgggagca 2640
 gaaattccta tcacctctag cagggagtaa acaactacta ctacagctgg aagcatacta 2700
 tctcctacca taaaagatgc tagcttctct gacaccttag acctgaggca aggaatcctc 2760
 tgcctcattt ctttctgtct ctggaaagcc tacaggacta agggctgctg taagcttgac 2820
 acaagcttga gggtgaaagg tgtcagacag gcttcacctg aggggccta tatatgagtg 2880
 tagtgaggat ggaacaggct acgtggggca tcctccggca tcttgcctc agagtggcct 2940
 tcagagccca ggctcaagtc agccatactt cccacttag actctggaaa tgccacagta 3000
 tgtccacaac ctccacacc agctacacaa aattgagaga gggacctagt gggactgcag 3060
 caatcacatg aggccatacc tggaccagcc aagctgccag tataacagtc gtggctctga 3120
 gattttgaaa gcttggctctg ttgtctatgc ctccggatct ttgggatgcc ttaggatcca 3180
 tcgagaaagt tctagagatc atgcctgttt ctggctgcac tgtactgact gagaacaggg 3240
 gctacagcac cactgtttct catggcctac ttctgccag gtgggcctc attagtactg 3300
 aaaggagcct gacctacact tgccccaaat tggccttttc ttttcccctg tggcattggt 3360
 tcctcaaagg aactaagggt tttctcttac ttgactcctt caggatctct ctacagattt 3420
 tcacaggtca ctctcagag ctagagtcac accagcatga ctatcctctg cccacattca 3480
 cacagcatgc ttaggaagtc tgggcatgct ctgtagtcac cttcattagg ttgttcccac 3540

ES 2 573 027 T3

ctgcctctct atctgccctt gcccacttc cccttgttct gcctggttgg ctctccctac 3600
 tctgtgcttc acatgtcttg aggtagatac atctgcctga gtcccacata acacttcttc 3660
 atcacaccaa ccctgagaa caataatggt cttagttctg tcgactagca cctcctgact 3720
 tgtctctatg atgccattct tcccctccta cccatccatc accctggtgc caaggcactc 3780
 tctgagacat cttgtttcta catagataca gaagaacatt tgattaggca tgtaggcat 3840
 ggtgaaagaa aaacaccaag taaactttta acatcacaat tttatttaa actactagag 3900
 aggactcagc aatgctcaaa gagactaaat tcccagggtga aaggagatgg gatggtgtat 3960
 tctaggcaca gacagacaga gcagtgggac atatgtaatc accaagaaat cagccaaatt 4020
 ttaataaac accttagctg ccgagagggga tgagaacaca gaagaatccc aaattctgag 4080
 ccaatcacca ctcaactaac ctcccacca ggacactgct aagcaagaaa caccttcgag 4140
 cacagtgtgg gcagaatatc catctgttac cagctccaag gcctgctgaa tataaggggt 4200
 atcccaaagc acctagagcc agaagtcaac tatgatacc cagctccagc acagctcagt 4260
 tcccagttcc aaaaaacagg tcttccatgc ctgggtggata agatgatatg cacttgtatc 4320
 tcacccccag actctacaat ccatgtatat acaatgccta gcatgcaatc agtaattaca 4380
 agatacaaat gattgataac caagacagag acagtacatg ggattagacc tgaggtacgg 4440
 gaaaggttgg gaaagcattc atagtgtccc ttgctacaag aagtcccaga gctttgcagg 4500
 gtgtgagcag attctaactt cccccattgg caagtcttct caaagctgct tctgctacta 4560
 gagaaccctc tttcccagcc acctgccact atttatcact tatctgagtt ttccccatga 4620
 ttctaggatg ctaccacctc ctgcctgagt cagacgggtc ttccaggaga cctgatggtc 4680
 ctgcccttgc ctgagacctt tctaggctga atggatca tgtccactgt ctggttagct 4740
 tgggtgcctc tgtgttaagt tgcttcatac tacatgtagc aaggaaagt acctttccac 4800
 ttctcaggac actgtaaaga agcacttctg taaattatag tgagaaacga tcaataataa 4860
 atgaaatgaa caaacataaa cctctcttat ctctatggga cctgccctaa ggcctcttgt 4920
 ggatgcctga aaccttgagt gtcttaagc catgtgtcac ttcagtcatt aacctgtggc 4980
 tgaggtggat cctgactgac aaacagacag gcatgtagac agcttgaagc ctggacaaag 5040
 agaaggttga cgttccaggc aaagcaagag cctatcacat tgttcaaag tgtgtgattt 5100
 agaatcagaa gatttcttgt ttaaaatata ctcaaaaagt tataaaatata cagccaggac 5160
 tagtcataaa gcttaaatct gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagaggtgtt 5220
 catgtatata catatgtgtg tgtgtgtata tatatgtatg tatatgtatg tatatgtgta 5280
 tattggtgtt tgggtgtcag attccctgga attaaagtta taaacagtta tgagctgcaa 5340

ES 2 573 027 T3

agtaggcttt ccaatgtctt gttctccaac cataggtaat tgaaactgga aactacaggt 5400
 aaaggaggct gccaaagtgtt tcttattatg ctaagattca gtgttctaca atattcacat 5460
 gatttcactt tgatatggtg aaatgccttt aggccaacgc atccacagac ttcacagtga 5520
 cccagctga gcttacatat aatgtcaaac agcacttgtt gaatagatac ccaggcagcc 5580
 ctgtgacca tgggtgtttc ctttaattctt cccatctgcc ttggactttc acaccttgag 5640
 ttgagatgtg ctttctgtag aaatgtatth ccctagggtct gtacatcagc caccaccctt 5700
 tctgatcttg gaccatactt cagtctccag ctgggatatt catatgcatg cttagatatg 5760
 gcataacat cgtaaacgct tctgtttacc tttaggatta agttaccgta gctaggatgc 5820
 tttccaatct ctcctccat ttgcaaagge tcagggttcc ttctgactct ggagtagtac 5880
 tctttcccaa tgagtgcacc atgaccacta ttcttctta gaatgttact cccctttctc 5940
 tgcctttttc atggcacatc tttctgagaa aacctacctg gtctagctgc tctttctggg 6000
 tcttcttaag tagtaacct aactcctgcac catccgtgtg gcagtgacat agatccacat 6060
 caggtttggg ttcagatatt ccaatcccat gcagaccaat ctatgtgtga gattccagga 6120
 tccagcagge tggggcatgg gttgaggggt aggattcttt ggggcaaagt ggtagtagg 6180
 cacttgggac tggaaagtgat aagtattagc gggaggaggg catatgatca aaacattgct 6240
 gctggatgtg aaagctgtac cttcagggtc agtgttcagg agaccagggt aataagaaat 6300
 gatctttctg tagggtggag accttctcat gagcactagt tcttccctag 6350

<210> 173
 <211> 1739
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 173
 gtaacacctc cctccatccc tcttaggcct ccatgtagct gtgggtggga aggtggatga 60
 cagacatccg ctcaactgtg taacaccagg aagctacccc aataaacact cagtgcctga 120
 ttagagcctt ggggtgcctgt tcttggggaa ggcaggttat gggcagaaat atcttggcct 180
 gaaagaaggg acacccaag agaaggacag gagtgaagca tggctcacc atctgtctat 240
 gtgttgata tttgacaaat aggacatcac aggacttcag cataggtacc cctggteett 300
 cctgctcttc actggatata atgcacctga tctctagaga tgcagctaaa atgagccagt 360
 ctgggaaacc tcagcacca cctctcagtc ttgcaagctc ctgctcccag acattctctg 420
 atactaaacc ccttcaggta gagaaacagc caaagtcaac atctaggacg caggactcaa 480
 catggctctg ctccttccct ctctactcaa cagccattga ggctgagccc accgcccaca 540

ES 2 573 027 T3

	gtaacacctc cctccatccc tectaggcct ccatgtagct gtggtgggga aggtggatga	60
	cagacatccg ctcaactgtg taacaccagg aagctacccc aataaacact cagtgcctga	120
	ttagagccct ggggtgcctgt tcttggggaa ggcaggttat gggcagaaat atcttggcct	180
	gaaagaaggg acaccccaag agaaggacag gagtgaagca tggctcacc atctgtctat	240
	gtgttgata tttgacaaat aggacatcac aggacttcag cataggtacc cctggteett	300
	cctgctcttc actggatata atgcacctga tctctagaga tgcagctaaa atgagccagt	360
	ctgggaaacc tcagcaccca cctctcagtc ttgcaagctc ctgctcccag acattcctgg	420
	atactaaacc ccttcaggta gagaaacagc caaagtcaac atctaggacg caggactcaa	480
	catggctctg ctccctccct ctctactcaa cagccattga ggctgagccc accgccccaa	540
	<210> 174	
	<211> 93	
5	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 174	
	ttcgagcage acctcctgct gggcgtcagc gtttctgca ttgtcatcct ggccgtctgc	60
	ctgttgtgct atgtcagcat caccaagatt aag	93
10		
	<210> 175	
	<211> 78	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
15		
	<400> 175	
	gggctgtgga cgaccatcac catcttccatc acactcttcc tgctaagcgt gtgctacagt	60
	gccaccgtca ccttcttc	78
20		
	<210> 176	
	<211> 84	
	<212> ADN	
	<213> Mus musculus	
	<400> 176	
	ggcctgtggc ccacaatgtg caccttcgtg gccctcttcc tgctcacact gctctacagt	60
25	ggcttctgca ccttcatcaa ggta	84

REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico que comprende, en dirección 5' a 3',
- el intensificador y promotor tempranos inmediatos del citomegalovirus humano (CMV_h),
 - 5 - un 5'UTR sintético no traducido que incluye una secuencia de consenso de Kozak,
 - una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina que incluye el intrón de secuencia de señal,
 - un ADNc de cadena pesada variable de un anticuerpo con especificidad contra una proteína,
 - un intrón 2 híbrido de cadena pesada de ratón/humana que incluye el intensificador de Ig μ de ratón (región interruptor J_{H3}-J_{H4}) unido al gen IGHG1 humano que incluye los exones de CH1 a CH3 con todos los intrones intermedios y la parte 5' contigua del intrón 6, que incluye el sitio de poliadenilación para la forma secretada de la
 - 10 inmunoglobulina,
 - la parte 3' del intrón 6 y el exón M1 del gen IGHG3 humano, y
 - el exón M2 y la región 3' no traducida que contiene el sitio de poliadenilación para la forma unida a membrana de la
 - 15 inmunoglobulina del gen IGHG4 humano.
2. Ácido nucleico según la reivindicación 1, que comprende una secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 143.

Fig. 1

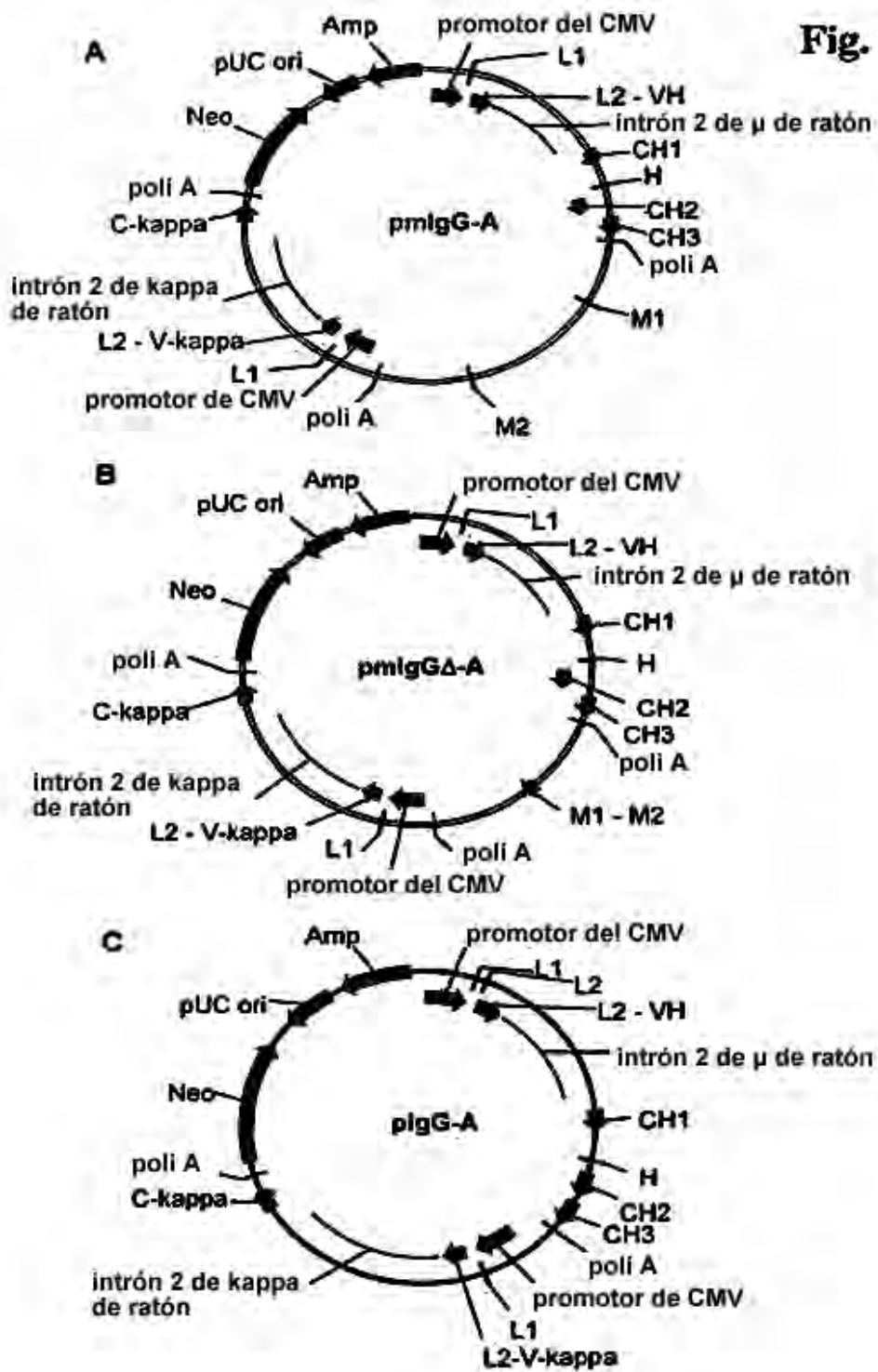


Fig. 2

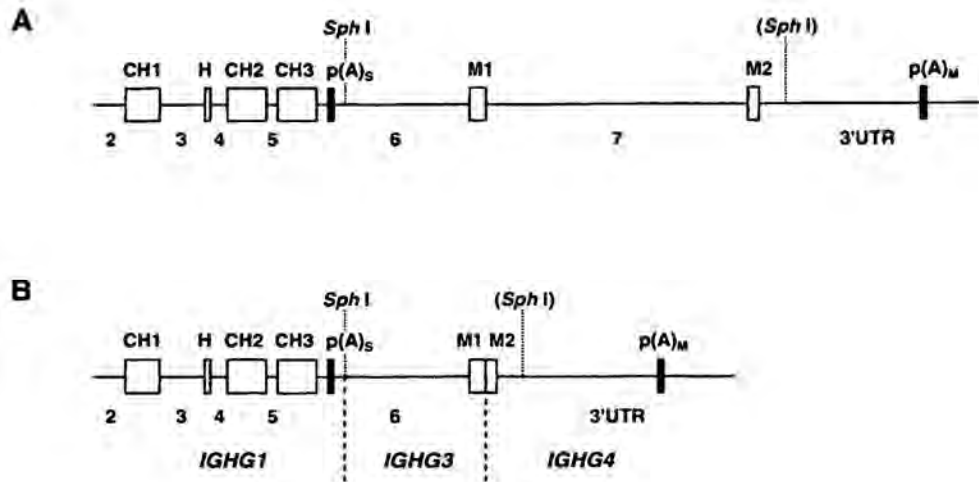


Fig. 3

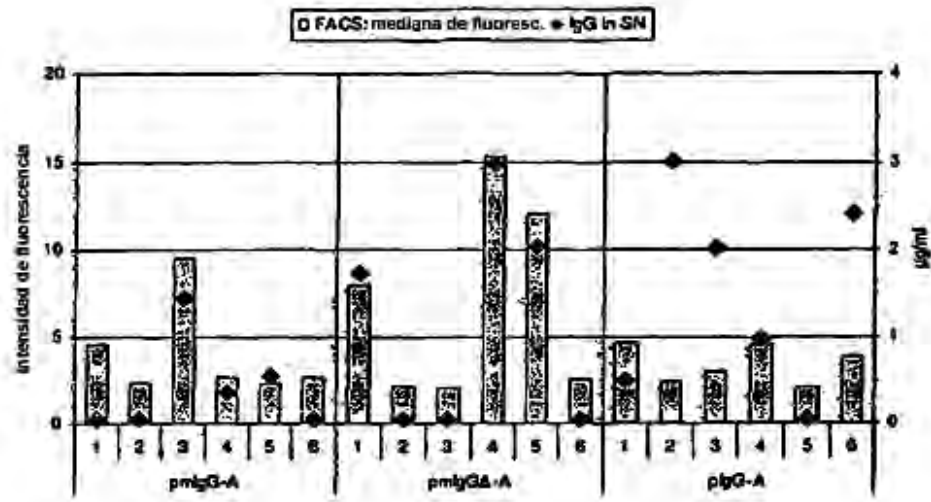


Fig. 4

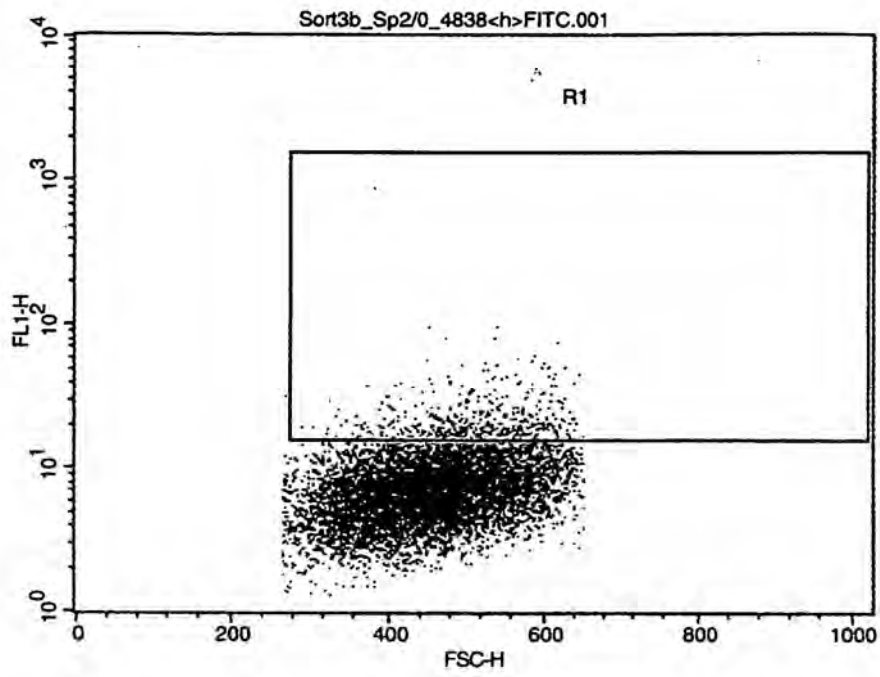


Fig. 5

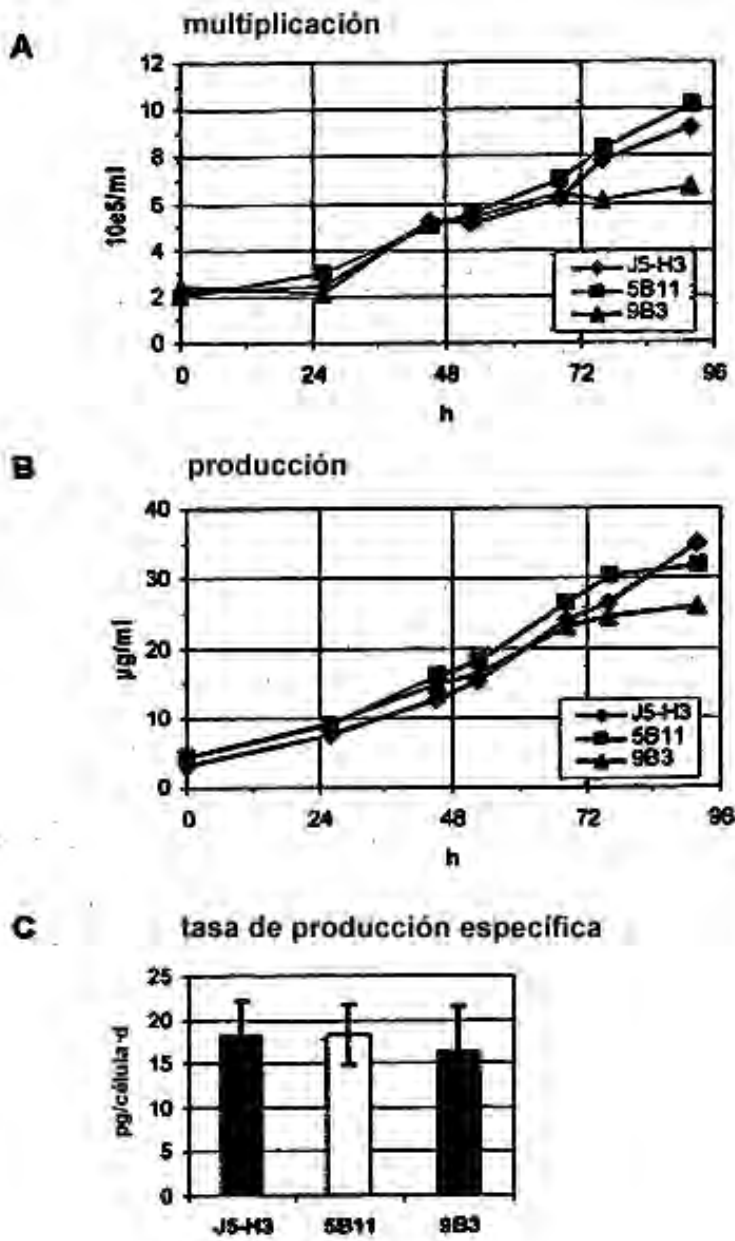


Fig. 6

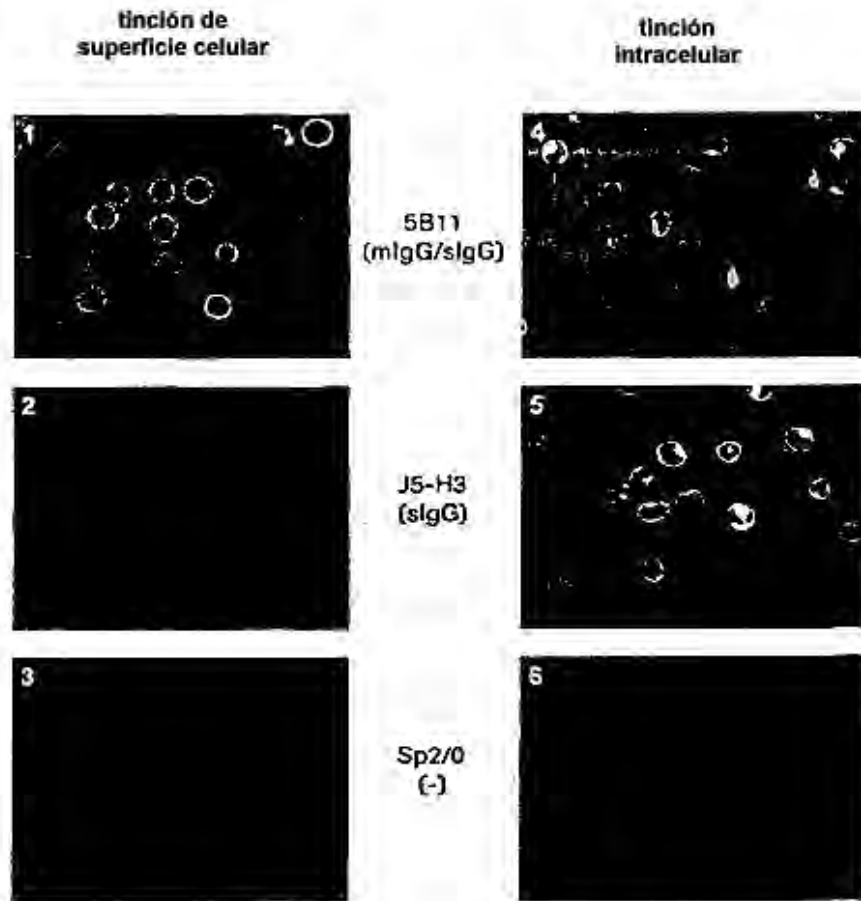


Fig. 7

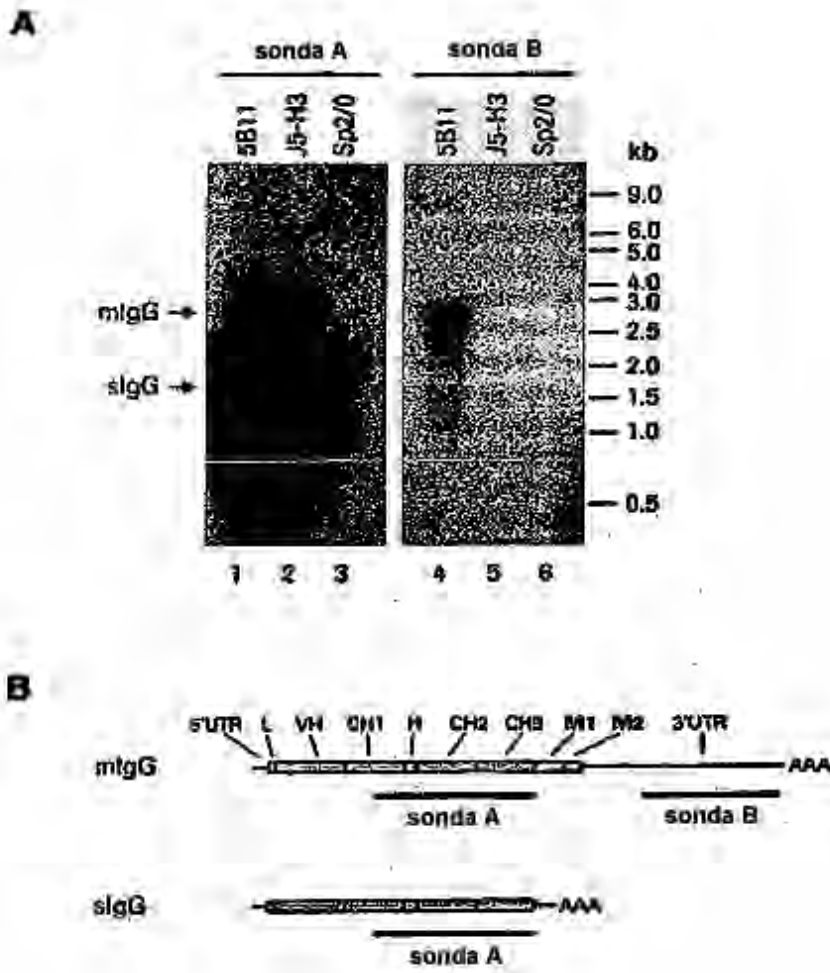


Fig. 8

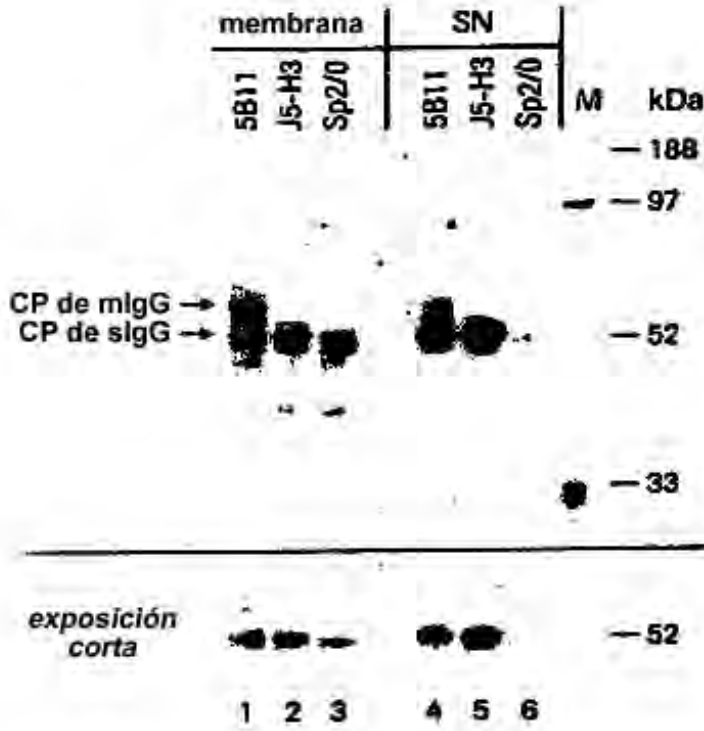


Fig. 9

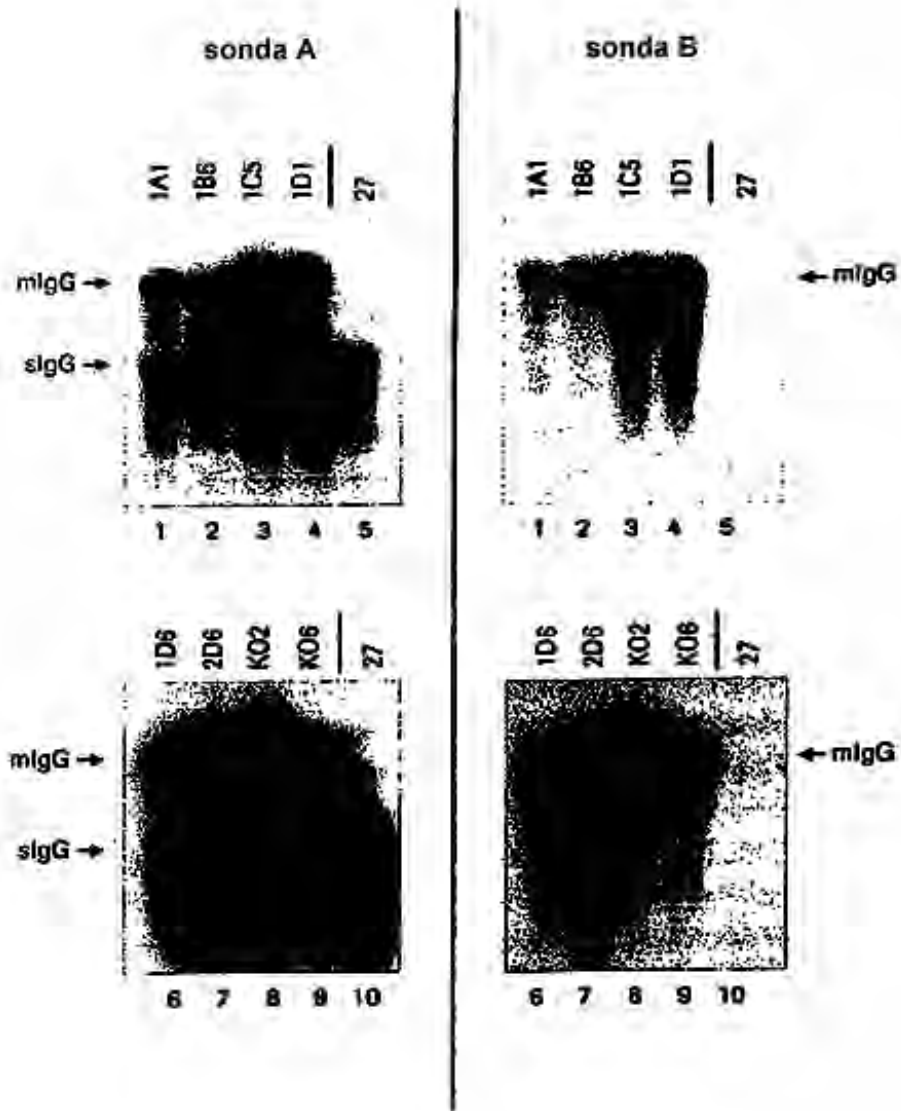


Fig. 10

