

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 298**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2011 PCT/EP2011/052873**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2011 WO11107409**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2011 E 11708221 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 2542683**

54 Título: **Vector de expresión**

30 Prioridad:

02.03.2010 EP 10155115

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

03.07.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BEAUCHAMP, JEREMY;
DREYER, ANITA y
MATILE, HUGUES**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 621 298 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

Vector de expresión

Desde el descubrimiento de los anticuerpos monoclonales, (mAbs), en el año 1975, por parte de Kohler y Milstein, éstos se han convertido en herramientas moleculares, de un valor inestimable. Debido a su alta especificidad, los anticuerpos monoclonales (mAbs), se utilizan para técnicas estándar, de la biología en su totalidad, siendo éstas la clave para la caracterización de la función y la de la distribución de las proteínas. Aparte de su uso en la investigación de base, los mAbs, se utilizan así mismo, también, de una forma muy extensa y generalizada, como agentes de diagnóstico y como agentes terapéuticos. Debido a esta extensa variedad de aplicaciones, la generación de mAbs, se ha convertido en un procedimiento estandarizado. Sin embargo, no obstante, ello puede todavía resultar problemático, debido el hecho de que, para estudios, en escenarios fisiológicos, es importante el que, los mAbs, reconozcan el antígeno, en su configuración o constitución nativa.

De la forma más usual, los mAbs, se postulan contra los péptidos sintéticos derivados de la secuencia pronosticada como la proteína diana. Lamentablemente, estos Abs, a pesar de ser fuertemente reactivos con los péptidos, de una forma frecuente, éstos fallan en la función de reconocer la proteína nativa. Otro procedimiento estándar, para generar mAbs es que utiliza proteína expresada recombinantemente. Los sistemas de expresión procariótica, son los huéspedes de expresión más ampliamente utilizados. Pero, cuando se estudian proteínas de superficie de mamíferos, es a menudo necesario, el utilizar sistemas de expresión de mamíferos, ya que, éstos, son más propensos a producir proteínas funcionales, con los apropiados enlaces de disulfuro, glicosilaciones post-traducción, o modificaciones proteolíticas. La purificación de proteínas recombinantes es, a menudo, una tarea laboriosa y pesada, representando, frecuentemente, una etapa limitativa, en cuanto a lo referente a la obtención de anticuerpos. Si bien, la introducción de marcajes identificativos de identidad, simplifican la purificación, es no obstante a menudo difícil, el obtener una proteína recombinante, en su constitución o estructura nativa, en un rendimiento productivo y una pureza suficientes. Esto se aplica, de la forma más notable, a las proteínas asociadas a membranas, ya que, éstas, son más propensas a perder su estructura nativa, durante los procesos de producción.

Cuando se intenta generar mAbs, los cuales sean capaces de reconocer la proteína, en su contexto nativo, es también crítico, así mismo, el utilizar proteína, en su constitución o estructura nativa, no únicamente en su etapa de inmunización, sino así mismo, también, para el procedimiento de exploración de rastreo. Muchos protocolos de exploración de rastreo de hibridomas, tal como el consistente en la inmovilización de proteínas recombinantes, sobre soportes sólidos, pueden modificar, de una forma significativa, la estructura o constitución o estructura. Por estas razones, los mAbs seleccionados en base a su unión a proteínas recombinantes, pueden no unirse a la misma proteína, cuando ésta se encuentra en su contexto nativo.

El arte anterior de la técnica especializada, incluye, en el trabajo presentado en J. Virol. Methods, vol. 109, 2003, páginas 55 - 61, en donde, se da a conocer un vector de expresión, el posibilita la producción de una proteína NS1, del virus del dengue, en la superficie de células, comprendiendo, el vector en cuestión, como elementos esenciales, en orden, una secuencia líder de cadena de ligera de Ig Kappa, murina, una secuencia que codifica a un porción extracelular de NS1, y una secuencia que codifica a una secuencia de anclaje transmembrana, procedente del PDGF-R.

Existe, por lo tanto, una necesidad, en cuanto a hecho de poder disponer de sistemas de expresión de antígenos, adicionales, los cuales permitan la expresión de antígenos, en su estructura o constitución nativa, sobre la superficie celular de las células. La presente invención, se exponen en las reivindicaciones las cuales se adjuntan a este documento de solicitud de patente.

En un primer objeto de la presente revelación de la invención, ésta proporciona un vector de expresión del ácido nucleico, para la expresión de la superficie celular de proteínas, el cual comprende, en orden, una secuencia polinucleotídica, la cual codifica a un péptido señal de secreción, un sitio de clonación para insertar una secuencia polinucleotídica, la cual codifica a una proteína a ser expresada, y una secuencia polinucleotídica, la cual codifica a dominio transmembranario de glicoforina.

En una forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, de un vector de expresión de ácido nucleico, el dominio transmembranario de glicoforina, es el dominio transmembranario de glicoforina A.

En una forma adicionalmente preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, del vector de expresión de ácido nucleico, el dominio transmembranario de glicoforina A, es la glicoforina A del ratón, o el dominio transmembranario de glicoforina A, del hámster armenio.

En una forma adicionalmente preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, del vector de expresión del ácido nucleico, el dominio transmembranario de glicoforina A del ratón, comprende la secuencia de

aminoácidos la cual se da a conocer encuentra en la Seq. Id. No. 1, y el dominio de glicoforina del Hamster Armenio, comprende la secuencia de aminoácidos la cual se da a conocer en la Seq. Id. No. 12

5 En una forma adicionalmente preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, del vector de expresión de ácido nucleico, el péptido señal de secreción, es el péptido señal de secreción de melitina del veneno de abejas.

10 En una forma adicionalmente preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, del vector de expresión de ácido nucleico, el péptido señal de secreción de melitina del veneno de abejas, comprende la secuencia de aminoácidos la cual se da a conocer en la Seq. Id. No. 2.

15 En una forma adicionalmente preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, el vector de expresión de ácido nucleico, comprende, de una forma adicional, el sitio de clonación, aguas abajo (3') del sitio de clonación para insertar una secuencia polinucleotídica, la cual codifica a una proteína a ser expresada, una secuencia polinucleotídica, la cual codifica a un marcador FAG, el cual comprende la secuencia de aminoácidos de la Seq. Id. No. 3.

20 En una forma adicionalmente preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, el vector de expresión de ácido nucleico, comprende, aguas abajo (3') del sitio de clonación, para insertar una secuencia de aminoácidos la cual codifica a un dominio de glicoforina, una secuencia de ácido nucleico, la cual codifica a un marcador His, de una forma preferible, un marcador His, el cual comprende la secuencia de aminoácidos, la cual se da a conocer en la Seq. Id. No. 4.

25 En una forma adicionalmente preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, del vector de expresión de ácido nucleico, el sitio de clonación, comprende los sitios de segmentación de enzimas de restricción, NheI, KpnI, BamHI, EcoRI, EcoRV y NotI.

30 En una forma adicionalmente preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, el vector de expresión de ácido nucleico, comprende una secuencia polinucleotídica, la cual se selecciona de entre grupo consistente en las Seq. Id. No. 5, Seq. Id. No. 13, Seq. Id. No. 14 , y Seq. Id. No. 15.

En una forma adicionalmente preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, del vector de expresión de ácido nucleico, la proteína a ser expresada, en una proteína asociada a membrana.

35 En una forma adicionalmente preferida de presentación, del vector de expresión de ácido nucleico, la proteína a ser expresada, es un una proteína asociada a membrana.

40 En un segundo objeto, la presente revelación de la invención, proporciona una célula, la cual comprende el vector de la presente invención, comprendiendo, de una forma preferible, una célula de mamífero, y de una forma más preferible, una célula HEK.

En un tercer objeto, la presente revelación de la invención, proporciona un procedimiento, para la generación de anticuerpos monoclonales, contra una proteína específica, el cual comprende las etapas de:

45 a) la inmunización de un animal no humano, mediante células que expresan, en sus superficies celulares, la proteína específica, mediante la utilización del vector de la presente invención,

b) el aislamiento de células esplénicas de los animales no humanos de la etapa a),

50 c) la fusión de las células esplénicas de etapa b), con células de mieloma, para generar hibridomas de células (linfocitos) B, y

d) la identificación de hibridomas de linfocitos B, que expresen anticuerpos dirigidos contra la proteína específica.

55 En una forma preferida de presentación del procedimiento de la presente revelación, en concordancia con la presente invención, el animal no humano, es un ratón, o bien, éste es un hámster armenio.

60 "El vector de expresión de ácido nucleico", se refiere a una formación o conjunto, el cual es capaz de dirigir la expresión de una secuencia o gen de interés. El vector de expresión de ácido nucleico, incluye un promotor, el cual se encuentra vinculado, de una forma susceptible de poderse operar, a las secuencias o gen(es) de interés. El vector de expresión de ácido nucleico, incluye a un promotor, el cual es susceptible de poderse operar, vinculado a las secuencias del gen o de los genes de interés. Pueden también encontrarse presentes, así mismo, también, otros elementos de control. De una forma adicional, el vector, puede también incluir, así mismo, un origen bacteriano de replicación, uno o más marcadores los cuales son susceptibles de poderse seleccionar, una señal, la cual permite el hecho de que, el vector, exista como un DNA de hebra individual, (tal como, por ejemplo, el consistente en un origen

de replicación M 13), un sitio de clonación múltiple, y una replicación de origen “mamífero” (tal como el consistente en un origen de replicación ó adenovirus, SV40). Un “vector”, es capaz de transferir secuencias genéticas, a las células objetivadas como diana (tal como, por ejemplo, los consistentes en los vectores víricos, en los vectores no víricos, en los portadores de partículas, y en los liposomas). El vector en cuestión, se utiliza para transportar el DNA foráneo o heterólogo, en una célula huésped apropiada. Una vez se encuentra en la célula huésped, el vector, puede replicarse de una forma independiente del DNA cromosómico, y pueden generarse diversas copias del vector y de su DNA (foráneo) insertado.

El término “proteína, tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a un polímero de aminoácidos, y no a una longitud específica. Así, de este modo, en el ámbito de la presente invención, en la definición de polipéptidos, se incluyen péptidos, oligopéptidos, y fragmentos de proteínas.

El término “anticuerpo monoclonal”, tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a un anticuerpo, el cual se ha obtenido de procedencia de una población de anticuerpos homogéneos, substancialmente homogéneos, a saber, en donde, los anticuerpos individuales, los cuales comprenden la población en cuestión, son idénticos, para posibles mutaciones de origen natural, las cuales pueden encontrarse presentes en cantidades menores. El modificador “monoclonal”, indica el carácter del anticuerpo, como habiéndose obtenido a partir de una población de anticuerpos, substancialmente homogénea, y ésta no debe considerarse como requiriendo la producción de un anticuerpo, de un procedimiento particular. Así, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a ser utilizados en concordancia con la presente invención, pueden producirse mediante el procedimiento de hibridomas, el cual fue descrito, en primer lugar, por parte de Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495, ó bien, éstos pueden producirse mediante procedimientos de DNA recombinante (véase, a dicho efecto, la patente estadounidense U S nº 4. 816. 567 (Cabilly et al.), y el trabajo de Mage y Lamoyi (1987), en Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, - Técnicas y aplicaciones de la producción de anticuerpos monoclonales -, páginas 79 - 97, Marcel Dekker, Inc., New York). Los anticuerpos monoclonales, pueden también aislarse, así mismo, a partir de bibliotecas de fagos, generadas mediante la utilización de, por ejemplo, las técnicas las cuales se encuentran descritas por parte de McCafferty et al. (1990), en Nature 348: 552 – 554.

Descripción resumida de las figuras

La figura 1 A, muestra la estructura primaria de las proteínas ABCA1 humana (Seq. Id. No. 7), TMEM27 de la rata (Seq. Id. No. 9) y P. falciparum PFF0620c (Seq. Id. No. 11), las cuales se utilizan en los ejemplos. Los dominios utilizados para las construcciones las cuales se encuentran descritas, se encuentran marcadas con las líneas diagonales, con los aminoácidos, en los términos N y C, indicados;

La figura 1 B, muestra diagramas esquemáticos de las construcciones de proteínas expresadas, derivadas de los vectores los cuales se encuentran descritos en los ejemplos. Los dominios extracelulares, son equivalentes de aquéllos los cuales se muestran en la figura 1 A;

La figura 2, muestra una transferencia Western, mediante la utilización de un anticuerpo conjugado anti-FLAG M2-HRP (de procedencia de la firma Sigma), de lisados celulares globales, procedentes de células HEK 293, transfectadas con pANITA2-ABCA1I y pANITA2-TMEM27. Puede verse una fuerte expresión, mediante bandas, a los apropiados pesos moleculares;

La figura 3 A, muestra la expresión de superficie celular de PFF0620C, en células HEK transfectadas. Los micrográficos de contraste por fluorescencia (columna 2 y 3), y de contraste por interferencia diferencial (columna 1) de las células HEK no transfectadas (línea 1), y células HEK que exhiben la PFF0620C (línea 2). Las células, se cultivaron en platinas portaobjetos de cámara, y éstas se marcaron, sin fijación, mediante anticuerpo anti-FLAG, y anticuerpos anti IgG del ratón, marcados con FITC. Los núcleos, se marcaron con DAPI.

La figura 3 B, muestra la localización extracelular de la PFF0620C, en células HEK, transfectadas de una forma estable. Los micrográficos de contraste por fluorescencia (línea 1 y 3), y el micrográfico de contraste por interferencia diferencial (línea 2 y 4) de las células PFF0620C-HEK, después de marcaje con anticuerpos anti-FLAG (columna izquierda), o anticuerpos anti-6xHis (columna derecha) y anticuerpos anti-IgG del ratón, marcados con FITC. Mediante el anticuerpo anti-FLAG, se marcaron células vivas y células fijadas con metanol, mientras que, el anticuerpo anti-His, sólo se marcaron células fijadas en metanol, indicando una localización intracelular del marcador His (His-tag), y la localización extracelular del marcador FLAG (FLAG-tag), conjuntamente con un dominio de proteína derivado del P. falciparum.

La figura 4, muestra el resultado de una exploración de rastreo de anticuerpos, para la unión a células transfectadas. En una segunda etapa, todos pozos positivos para la producción de la IgG, se sometieron a una exploración de rastreo, para la unión de anticuerpos, a las células transfectadas, mediante IFA (ensayo de inmunotransferencia – [IDA, de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a inmuno fluorescence assay] -). Se procedió a marcar las células HEK transfectadas, y no transfectadas, colocadas sobre las platinas portaobjetos de múltiples pozos, con

sobrenadantes de hidridomas individuales, y se procedió a llevar a cabo un análisis de éstas, mediante microscopía de fluorescencia.

La figura 5, muestra un análisis de transferencia western, de la reactividad generada de los anticuerpos monoclonales generados, con las proteínas de *P. falciparum* recombinantes. La especificidad de anticuerpos monoclonales representativos, para las correspondientes proteínas recombinantes, se demuestra mediante un análisis de transferencia Western. Se procedió a probar lisados de PFF0620c- (línea 1), construcciones de pANITA2 de control, con contenido de proteínas no relacionadas (líneas 2 y 3), y células HEK, no transfectadas (línea 4), con anti-6xHis mAb y un anti-PFF0620cmAb, generadas, respectivamente, de la forma la cual se describe.

La figura 6, muestra el hecho de que, los anticuerpos monoclonales PFD1130w-específicos, inhiben los parásitos los cuales se han hecho crecer in vivo (cultivados in vivo).

Ejemplos

Expresión de proteínas sobre la superficie celular de células de mamíferos.

Se procedió a cultivar el *P. falciparum* ORF PFF0620c, el dominio extracelular ABCA1 humano, y el dominio extracelular TMEM27 de la rata, en la superficie celular de células HEK, mediante la utilización de los plásmidos pANITA2-PFF0620C; pANITA2-ABCA1, ó pANITA2-TMEM27, respectivamente. Con objeto de asegurar unos altos niveles de expresión, en la superficie celular, los genes, se modificaron mediante diversas vías (véase, a dicho efecto, la figura 1): i.- las secuencias endógenas, se optimizaron mediante codones, para la expresión de células de mamíferos, y únicamente se utilizaron dominios extracelulares previstos; ii.- las secuencias se señalan de secreción endógena, se reemplazaron mediante una secuencia de señal de secreción, de la melitina del veneno de la abeja; iii.- para el anclaje de la membrana, se utilizó el dominio transmembranario que codifica a la secuencia de la glicoforina A del ratón, en lugar de la secuencia de señal de unión a GPI, pronosticada, o de los dominios transmembranarios pronosticados; iv.- para permitir el análisis de expresión, se procedió a insertar un marcador FLAF (FLAG-tag), de una forma N-terminal del dominio transmembranario, y un marcador 6xHis (6xHis tag), en el término C. Se procedió a posicionar los dos marcadores, inmediatamente antes y después del dominio transmembranario, con objeto de verificar la localización extracelular de los antígenos expresados de una forma recombinante.

Se procedió a establecer las líneas celulares derivadas de las células HEK, las cuales expresan el *P. falciparum* PFF0620c, el dominio extracelular ABCA1, y el dominio extracelular TMEM27 de la rata, mediante una transfección estable.

Con objeto de obtener líneas celulares con un alto valor de expresión, se procedió a separar los transfectantes, en bancos de células de alto valor de expresión, mediante clasificación de células activadas por fluorescencia, después del marcaje de superficie, mediante anticuerpos anti-FLAG. La intensidad media de la fluorescencia de las células cerradas, para la selección, en bancos de alto nivel de expresión, era de un valor 2,1 – 4,3 veces mayor que el correspondiente a la totalidad de los transfectantes.

Las líneas celulares que expresaban el ABCA1, humano, y el TMEM27 de la rata, se sometieron a test de ensayo, mediante análisis de transferencia Western, mostrando un alto nivel de expresión de una proteína, con el peso molecular esperado. (Figura 2) Se mostró la expresión de superficie celular de la proteína *P. falciparum* PFF0620c, mediante análisis de inmunofluorescencia, con anticuerpo anti-FLAG, proporcionando fuertes señales de células vivas. (Figura 3) Como contraste de ello, el marcaje, con anticuerpo anti-6xHis, proporcionó fuertes señales, únicamente, en células fijadas sobre metanol, pero no, en células vivas (Figura 3B). Estos resultados, verificaron el hecho de que, el PFF0620c, se expresa, y se produce su anclaje, en la pared celular, con el marcador FLAG-tag, viviendo de una forma extracelular, y el marcador His, viviendo de una forma intracelular.

Desarrollo de antígenos específicos de la malaria, en ratones inmunizados con células HEK, transfectadas

Se procedió a utilizar los bancos de células de alto nivel de expresión, PFF0620c-HEK, con objeto de inmunizar ratones NMRI. Los ratones en cuestión, recibieron inyecciones intravenosas de 10^6 células en tres días consecutivos, y otra serie de tres inyecciones diarias, dos semanas después. El desarrollo de los títulos de anticuerpo en suero, se analizó, mediante citometría de flujo, procediendo a comparar el marcaje inmune del transfectante, von células HEK, no transfectadas. La intensidad de la fluorescencia observada con el transfectante, era cuatro veces mayor que la correspondiente a las células HEK de control, no transfectadas. Esto indicaba el hecho de que, los ratones, habían montado una respuesta anticuerpo, contra el antígeno de la malaria, expresado en la superficie de las células HEK transfectadas.

Las células esplénicas de ratones inmunizadas con las células HEK transfectadas, se fusionaron con células de mieloma PAI, para generar hibridomas de células B (linfocitos B). Las células fusionadas, se distribuyeron en pozos de una placa de cultivo de microtítulo. Con objeto de identificar las células de hibridoma, las la cuales producían

anticuerpos PFF0620c-específicos, se procedió a utilizar un procedimiento de exploración de rastreo, de dos etapas, el cual obviaba, de una forma completa, el requerimiento para proteínas recombinantes, purificadas. En primer lugar, la totalidad de los pozos de cultivo, se sometieron a test de ensayo, para la producción de IgG, mediante la técnica ELISA. Un porcentaje correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre un 18 % y un 29 %, de los pozos sometidos a test ensayo, eran positivos. En una segunda etapa, la totalidad de los pozos, los cuales eran positivos para la producción de IgG, se sometieron a una exploración de rastreo, para la unión de anticuerpos a las células transfectadas, mediante IFA (ensayo de inmunofluorescencia – [IFA, de sus iniciales, en idioma inglés, correspondientes a immunofluorescence assay] -). Las células HEK transfectadas, y no transfectadas detectadas sobre las platinas portaobjetos de múltiples pozos, se marcaron con sobrenadantes de hibridomas individuales, y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia (véase, a dicho efecto, la figura 4). Las células HEK no transfectadas, servían como control negativo, para cada muestra. Numerosos clones positivos en las células transfectadas, eran también positivos, en células no transfectadas. Sin embargo, no obstante, la fusión, proporcionó así mismo, también, numerosos pozos los cuales contenían anticuerpos fuertemente reactivos con el transfectante, pero que no eran reactivos con las células HEK no transfectadas. La totalidad de los otros anticuerpos, eran específicos para células transfectadas, utilizadas para la inmunización, y no marcaban a los transfectantes de control. A partir de pozos de esta categoría, se derivaron 17 clones de hibridoma, mediante la reclonación a partir de la fusión de PFF0620c.

La especificidad de los anticuerpos monoclonales, se confirmó, de una forma adicional, mediante análisis de transferencia Western (véase, a dicho efecto, la figura 5). 16 de los mAbs, marcaban la proteína recombinante correspondiente, en el lisado del transfectante utilizado para inmunización, pero no, en lisados de células HEK transfectadas o no transfectadas, de control.

Anticuerpos monoclonales PFD1130w-específicos, inhiben el crecimiento parasitario in vivo

Se procedió a evaluar la actividad inhibitoria de parásitos, in vivo, de mAbs, en un modelo de ratón SCID, de *P. falciparum*. Los mAbs anti-PFD1130w, se produjeron mediante la utilización de los mismos procedimientos y los mismos vectores que se utilizaron para la generación de los mAbs, contra *P. falciparum* PFF0620c (véase la sección de procedimientos, la cual se facilita abajo, a continuación). Este modelo, utiliza ratones NODscid IL2Rnull, no mieloagotados, injertados con eritrocitos humanos, con objeto de permitir el crecimiento de *P. falciparum*. Se procedió a injertar grupos de tres ratones, con una parasitemia de $0,58 \pm 0,14$ %, una vez, con 2,5 mg de anti-PFD1130w c12 mAb, 0,5 mg de anti-PFD1130w c12 mAb, ó 2,5 mg de mAb de isotipo / subclase, de control, por ratón, respectivamente. Se procedió a efectuar un control de seguimiento de la parasitemia, para la totalidad de los ratones, para los seis días siguientes. Mientras que, la parasitemia, en los ratones los cuales habían recibido únicamente PBS, o el mAb de control, se incrementaba de una forma continua, alcanzando un valor de $11,3 \pm 0,8$ %, después de seis días, la parasitemia de los ratones los cuales habían recibido 0,5 mg de mAb anti-PFD1130w c12, se incrementaba en una extensión mucho menor, alcanzando un valor de $5,6 \pm 1,3$ %, después de seis días. La parasitemia de los ratones los cuales habían recibido 2,5 mg de mAb anti-PFD1130w c12, permaneció baja, hasta el final del experimento ($1,4 \pm 0,3$ %, en el día 6). La diferencia en la parasitemia, después de un transcurso de tiempo de 6 días, en comparación con el grupo de control negativo, era altamente significativa en la prueba t de dos caras [de dos muestras]: $P < 0,0001$ (Figura 6).

El hecho consistente en que, los mAbs anti-PFD1130w mAbs, inhibían el crecimiento parasitario, in vivo, indica el poder de la tecnología basada íntegramente en células, la cual se describe, para generar mAbs que se une a la proteína endógena, en su contexto nativo.

Procedimientos

Construcción y transformación de plásmidos

Se procedió a ligar un oligonucleótido de doble hebra que codifica la secuencia señal de secreción de la melitina de la abeja, a pcDNA3.1(+) digerida con NheI (de procedencia de la firma Invitrogen), dando como resultado el plásmido pcDNA3.1_BVM, con un sitio individual NheI retenido, 3', de la secuencia señal. Se obtuvo así, de este modo, un cDNA de dominio de glicoforina, citoplásmico y transmembranario, de la secuencia señal, mediante rtPCR (equipo a modo de kit, de la firma Invitrogen, del tipo "SuperScript III First Strand Synthesis kit" y sistema de PCR, de Roche, del tipo "Roche Expand High Fidelity PCR System), mediante la utilización de RNA extraído de la médula ósea, como un molde. Clonándose así, de este modo, el amplicón resultante de la PCR, en un vector de clonación pCR2.1. Los cebadores para la glicoforina contenían un sitio NotI 5' y un marcador de histidina 3', seguido de un codón de parada y sitio EagI. El fragmento de glicoforina-5His, se escindió con EagI, y se ligó a pcDNA3.1_BVM digerido con NotI, dando como resultado un plásmido pcDNA3.1_BVM_GP, con el sitio pcDNA3.1, preservado en el extremo 5' de la secuencia de glicoforina. Para crear el vector de expresión completado (pANITA), se procedió a ligar un oligonucleótido de doble hebra, al pcDNA3.1_BVM_GP digerido con NotI, que codifica a un marcador Flag (Flag-tag), flanqueado por cortas secuencias de engarce, y dando como resultado un único sitio NotI, en el lado 5' del marcador Flag.

- Se procedió a sintetizar las secuencias de cDNA del dominio extracelular TMEM27 de la rata (aa 15 - 130 de la Seq. Id. No. 9); de un dominio extracelular pronosticado del gen *P. falciparum* PFF0620C (aa 21 - 353 de la Seq. Id. No. 11) y de un dominio extracelular ABCA1 humano, N-terminal (aa 43 - 640 de la Seq. Id. No. 7), mediante la automatización del uso de un codón, para proporcionar un alto nivel de expresión, en el cultivo de células de mamíferos. Los genes, se ligaron en los sitios únicos NheI y NotI del vector pANITA2, y la secuencia de los vectores, se confirmó mediante secuenciación de DNA. A los plásmidos resultantes, se les hará referencia, en la parte que sigue de este documento de solicitud de patente, como pANITA2-TMEM27; pANITA2-PFF0620C ó pANITA2-ABCA1, respectivamente.
- En los pANITA3.1 y pANITA3.3, se eliminaron, también, los sitios de pcDNA3.1 XbaI y XhoI, nativos, mediante mutagénesis de sitio dirigido. Las características o rasgos distintivos de las secuencias de los múltiples sitios de clonación y de codificación de proteínas de fusión, se muestran en la Tabla 1, la cual se facilita más abajo, a continuación, mediante la numeración a partir del inicio del inserto.
- La secuencia de la glicoforina del hámster armenio, se determinó mediante clonación por PCR y secuenciación nucleotídica, mediante la utilización de la secuencia de la glicoforina del hámster chino, como una guía para el diseño de cebadores, y el cDNA generado a partir de preparaciones de RNA de la médula ósea del hámster americano. En la Tabla 1, la cual se facilita abajo, a continuación, se encuentran representadas las siguientes secuencias: pANITA2 con secuencia de Kozak = Seq. Id. No. 15 , pANITA3.1 = Seq. Id. No. 13 y pANITA3.3 = Seq. Id. No. 14.

Tabla 1: Comparación de los vectores de expresión

<u>Elemento Vector</u>	<u>pANITA2</u>	<u>pANITA3.1</u>	<u>pANITA3.3</u>
Secuencia de Kozak	1 - 12	1 - 12	1 - 12
Secuencia señal de la melitina de la abeja	9 - 72	9 - 72	9 - 72
Sitio de restricción único NheI	70 - 75	70 - 75	70 - 75
Sitio de restricción único KpnI	82 - 87	82 - 87	82 - 87
Sitio de restricción único BamHI	94 - 99	94 - 99	94 - 99
Sitio de restricción único EcoRI	106 - 111	106 - 111	106 - 111
Sitio de restricción único EcoRV EcoRI	112 - 117	112 - 117	112 - 117
Sitio de restricción único XbaI	-	118 - 123	118 - 123
Sitio de restricción único NotI	124 - 131	124 - 131	124 - 131
Sitio de segmentación de marcador Flag / Enterokinasa	133 - 156	133 - 156	133 - 156
Sitio de restricción único HindIII	-	154 - 159	154 - 159
Anclaje de la membrana de la glicoforina del ratón	172 - 369	163 - 369	-
Anclaje de la membrana de la glicoforina del hámster armenio			178 - 375
6-His tag	382 - 399	382 - 399	388 - 405
Codones de parada	400 - 405	400 - 405	406 - 411

Establecimiento de las líneas celulares HEK 293, que expresan, de una forma estable, los dominios PF0620C, TMEM27 ó ABCA1.

- Las células HEK 293, se transfectaron con pANITA2-TMEM27; pANITA2-PFF0620C ó pANITA2-ABCA1, mediante la utilización del reactivo de transfección Jet-PEI™ (PolyPlus), siguiendo el protocolo del fabricante. La selección del antibiótico, se inició 48 horas después de la transfección. El medio de selección, el cual contenía 500 µg / ml de geneticina (Genetic®, de procedencia de la firma Gibco), se cambió, cada 3 – 4 días. Después de que hubieran muerto las células no resistentes al antibiótico, y que las células resistentes, hubieran comenzado a crecer, normalmente, se generó un banco de alto nivel de expresión, mediante FACS (selección de células activada mediante fluorescencia – [FACS, de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Fluorescence-activated cell sorting] -). Las células, se disociaron mediante un tampón de disociación exento de enzimas (Tampón de disociación de células, exento de enzimas, basado en una solución de Hank, de procedencia de la firma Gibco), éstas se lavaron con tampón de bloqueo (PBS con un contenido del 3 % de BSA). A continuación, las células, se incubaron con 200 µl de mAb anti-Flag, a una concentración de 100 µl / ml = FLAG-27 diluido en tampón de bloqueo, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos, sobre hielo. Se procedió, a continuación, a lavar las células, con tampón de bloqueo, y éstas se incubaron con 200 µl de anticuerpos anti-IgG del ratón, de cabras, conjugados con FITC (RAM/IgG(H+L)/FITC, de procedencia de la firma Nordic Immunological Laboratories), a una concentración de 100 µg / ml, que se diluyeron en tampón de bloqueo, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos, en hielo. Después de haber procedido a un lavado final, se procedió a lavar las células marcadas, y éstas se seleccionaron mediante la utilización de un sistema de software informático, del tipo “BD FACSAria running FACSDiva software”. La totalidad de los análisis, se llevaron a cabo mediante la utilización de barreras de dispersión (scatter gates), para excluir los restos y agregados celulares. Los ajustes de barrera, se ajustaron para recopilar células altamente marcadas.

Después de las selección, las células, se recopilaron en un medio de cultivo, con 20 % FCS, y éstas se colocaron en un pozos de 35 mm.

Marcaje de inmunofluorescencia de células HEK, vivas

5 Para el marcaje de inmunofluorescencia de las células HEK, vivas, se procedió a utilizar platinas portaobjetos compartimentadas (platinas portaobjetos de compartimientos de 4 pozos, de los tipos Lab-Tek™, Nunc™). Los pozos, se recubrieron con 100 mg / l de poli-D-lisina, en H₂O, en una caja húmeda, a la temperatura ambiente, durante el transcurso de toda la noche. Después de haber procedido al lavado de los pozos, tres veces, con H₂O
10 estéril, se sembraron 40.000 células, por pozo. Tres días después, se procedió a llevar a cabo el proceso de inmunomarcaje, procediendo a la incubación de los pozos, con 500 µl de un mAb apropiado, diluido en medio de cultivo exento de suero, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos, en hielo. Después de haber procedido a lavar dos veces, con medio de cultivo exento de suero, se procedió a añadir 500 µl de anticuerpos anti-IgG del ratón, de cabras, conjugados con FITC (RAM/IgG(H+L)/FITC, de procedencia de la firma Nordic Immunological
15 Laboratories), a una concentración de 100 µg / ml, diluidos en medio de cultivo exento de suero, a los pozos, y éstos se incubaron, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos, en hielo. Finalmente, los pozos, se lavaron dos veces, con medio de cultivo exento de suero, y una vez, con DBPD (solución salina tamponada con fosfato, de Dulbecco, con contenido de calcio, de procedencia de la firma Gibco). Las platinas portaobjetos, se ajustaron mediante una solución de que contenía DAPI (reactivo anti-pérdida de color (reactivo anti-pérdida de color, del tipo "ProLong®
20 Gold antifade reagen" con DAPI, de procedencia de la firma Invitrogen), y éstas se cubrieron con un cubreobjetos. Los marcajes, se evaluaron de la forma la cual se describe abajo, a continuación.

Inmunización de ratones

25 Se procedió a inmunizar los ratones NMRI, mediante inyecciones intravenosas de 10⁶ células HEK establemente transfectadas. Las células, se derritieron, y éstas se lavaron y se resuspendieron en 0,9 % NaCl. Las inyecciones, se realizaron en tres días consecutivos, y después de tres semanas, otra vez, en tres días consecutivos. Después de la estimulación, se procedió a recolectar la sangre y, el suero, se sometió a test de ensayo, en cuanto a la presencia de anticuerpos anti-PFF0620C, mediante IFA, con la utilización de células 293 HEK, establemente transfectadas.
30

Los animales con suero fuertemente reactivo con células de expresión, se seleccionaron, para la fusión. Éstos recibieron una inyección final de 10⁶ células, dos días y un día antes de la fusión. Los ratones, se sacrificaron, y se procedió a retirar su bazo. Las células esplénicas, se recolectaron, mediante trituración, bajo unas condiciones estériles, y se fusionaron con su pareja celular de mieloma (células del mieloma del ratón PAI, derivadas de P-3X63-Ag8), mediante la utilización de polietilenglicol 1500 (de procedencia de la firma Roche Diagnostics). La mezcla de fusión, se colocó en placas de múltiples pozos, y se procedió a seleccionar hibridomas, mediante el cultivo en medio HAT, suplementado con un sobrenadante de cultivo de macrófagos de ratón P388. Los pozos, se exploraron para la producción de IgG específica, entre las 2 – 3 semanas post-fusión, mediante ensayos de detección ELISA e IFA, de la forma la cual se describe abajo, a continuación.
35

40

Test de ensayo de detección ELISA

Se procedió a cubrir placas del tipo Maxisorp™ (Nunc), durante el transcurso de toda la noche, a una temperatura de 4 °C, en una caja húmeda, con 100 µl de mAb anti-IgG del ratón (específica de la cadena γ) de la cabra (de procedencia de la firma Sigma), a una concentración de 5 µg / ml, diluida en PBS. Después de haber procedido a dos lavados, con PBS, con un contenido de 0,05 % Tween-20, se procedió a bloquear los pozos, con un tapón de bloqueo (50 mM Tris, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,05 % NONidet P40, 0,25 % gelatina, 1% BSA), durante un transcurso de tiempo de 1 hora, a una temperatura de 37 °C y, procediéndose, posteriormente, a un proceso de lavado, dos veces. Se procedió, a continuación, a añadir 50 µl de sobrenadantes de hibridoma, a los pozos, y a una incubación, durante un transcurso de tiempo de 1 hora, a una temperatura de 37 °C. Después de haber procedido a un proceso de lavado, 4 veces, las placas, se incubaron con 50 µl de anti-IgG del ratón (específica de la cadena γ) de la cabra, conjugada con peroxidasa del rábano picante (de procedencia de la firma Sigma), diluida a un valor de 1 : 1000, en tampón de bloqueo, durante un transcurso de tiempo de 1 hora, a la temperatura ambiente, en una caja húmeda, en un entorno medioambiental de oscuridad. Después de haber procedido a un proceso de 4 lavados, se
50 procedió a la adición de una solución del sustrato de peroxidasa, y se controló el cambio de color.
55

Producción y caracterización de los anticuerpos

60 La identificación de los isótopos de anticuerpos, se llevó a cabo mediante la utilización de un equipo, a modo de "kit", para la realización de la especificación de los isotipos de anticuerpos monoclonales del ratón, del tipo "Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit ISO2", (de procedencia de la firma Sigma). Para la producción a gran escala de los mAb, se procedió cultivar líneas celulares, en frascos o botellas giratorias de 500 ml de capacidad útil (de procedencia de la firma Corning). Los mAbs, se purificaron mediante cromatografía de afinidad, mediante la utilización de proteína A sefarosa, o proteína G sefarosa.
65

Secuencias de DNA y de proteínas

5

Gen / nombre la proteína	Especie	Descripción	Seq. No.	Id.
Glicoforina A	Ratón	Dominio transmembranario + citoplásmico de la glicoforina A	1	
Melitina	Abeja	Señal de secreción de la melitina del veneno de la abeja	2	
Marcador Flag	-	Marcador Flag	3	
Marcador His	-	Marcador His	4	
Vector de expresión pANITA2 (sin secuencia de Kozak)	-	Secuencia del vector de expresión, el cual comprende la señal de secreción de la melitina del veneno de la abeja, sitio de clonación para una proteína a ser expresada, y dominio transmembranario de la glicoforina A del ratón	5	
ABCA1	Humana	DNA que codifica a la proteína ABCA1, humana	6	
ABCA1	Humana	Proteína ABCA1	7	
TMEM27	Rata	DNA que codifica a la TMEM27 de la rata	8	
TMEM27	Rata	Proteína TMEM27	9	
PFF0620C	Plasmodium falciparum	DNA que codifica a la proteína 3D7	10	
PFF0620C	Plasmodium falciparum	Proteína 3D7	11	
Glicoforina A	Hamster armenio	Dominio transmembranario + citoplasmático de la glicoforina A	12	
Vector de expresión pANITA3.1	-	Secuencia del vector de expresión, el cual comprende la señal de secreción de la melitina del veneno de la abeja, sitio de clonación para una proteína a ser expresada, y dominio transmembranario de la glicoforina A del ratón	13	
Vector de expresión pANITA3.3	-	Secuencia del vector de expresión, el cual comprende la señal de secreción de la melitina del veneno de la abeja, sitio de clonación para una proteína a ser expresada, y dominio transmembranario de la glicoforina A del ratón	14	
Vector de expresión pANITA2 con secuencia de Kozak (nt 1 – 12)	-	Secuencia del vector de expresión, el cual comprende la señal de secreción de la melitina del veneno de la abeja, sitio de clonación para una proteína a ser expresada, y dominio transmembranario de la glicoforina A del ratón	15	

10 Si bien la invención anteriormente presentada, en este documento de solicitud de patente, se describió, en cierto detalle, por vía de ilustración y de ejemplos, para los propósitos de claridad y entendimiento, las descripciones y los ejemplos facilitados, no deben no obstante interpretarse como siendo limitativos del ámbito de la invención.

15

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 < 110 > F. Hoffmann-La Roche AG
 < 120 > Vector de expresión de proteína
- 10 < 130 > 26501 WO
 < 150 > EP10155115.8
 < 151 > 2010-03-02
- 15 < 160 > 15
 < 170 > PatentIn versión 3.5
- < 210 > 1
 20 < 211 > 66
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus
- 25 < 400 > 1

30 His Asp Phe Pro Ala Leu Val Met Ile Leu Ile Ile Leu Gly Val Met
 1 5 10 15

Ala Gly Ile Ile Gly Thr Ile Leu Leu Ile Ser Tyr Cys Ile Ser Arg
 20 25 30

35 Met Thr Lys Lys Ser Ser Val Asp Ile Gln Ser Pro Glu Gly Gly Asp
 35 40 45

40 Asn Ser Val Pro Leu Ser Ser Ile Glu Gln Thr Pro Asn Glu Glu Ser
 50 55 60

45 Ser Asn
 65

- 50 < 210 > 2
 < 211 > 21
 < 212 > PRT
 < 213 > Apis mellifera
- 55 < 400 > 2

60 Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
 1 5 10 15

Ser Phe Ile Tyr Ala
 20

65

ES 2 621 298 T3

< 210 > 3
 < 211 > 8
 < 212 > PRT
 < 213 > Secuencia Artificial
 5 < 220 >
 < 223 > Marcador FLAG
 < 400 > 3
 10 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5
 < 210 > 4
 < 211 > 10
 < 212 > PRT
 15 < 213 > Secuencia Artificial
 < 223 > Marcador His
 < 400 > 4
 20 Val Ser Gly Gly His His His His His His
 1 5 10
 < 210 > 5
 < 211 > 390
 25 < 212 > DNA
 < 213 > Secuencia Artificial
 < 220 >
 < 223 > Construcción de expresión
 30 < 400 > 5
 atgaagttcc tggatgaatgt ggccttggtg ttcattggtgg tgtacatcag ctccatctac 60
 35 gctagcctta agggataccga gctcggatcc actagtgaat tcgatatcga cgtcgcggcc 120
 gctgactaca aagacgatga cgacaagagc cctagggccg cacacgattt tcctgacta 180
 gtgatgatac tcataatttt gggcgtgatg gcagggatta tcggaactat ccttcttacc 240
 40 tcttactgta tcagccgaat gacaaagaaa agttcagttg acatccaatc tcctgagggt 300
 ggtgacaaca gtgtgccttt gagttctatt gagcagactc ctaatgaaga gtccctccaat 360
 gttagcggcg gccatcacca tcaccatcac 390
 45 < 210 > 6
 < 211 > 7140
 < 212 > DNA
 < 213 > Homo sapiens
 50 < 220 >
 < 221 > CDS
 < 222 > (314)..(7099)
 55 < 400 > 6
 gtaattgcga gcgagagtga gtggggcccg gaccgcgaga gccgagccga cccttctctc 60
 ccgggctgcg gcagggcagg gcggggagct ccgcgcacca acagagccgg ttctcagggc 120
 60 gctttgctcc ttgttttttc cccggttctg ttttctcccc ttctccggaa ggcttgtcaa 180
 ggggtaggag aaagagacgc aaacacaaaa gtggaaaaca gttaatgacc agccacggcg 240
 65 tcctgctgt gagctctggc cgctgccttc cagggctccc gagccacacg ctgggggtgc 300

ES 2 621 298 T3

tggctgaggg aac atg gct tgt tgg cct cag ctg agg ttg ctg ctg tgg	349
Met Ala Cys Trp Pro Gln Leu Arg Leu Leu Leu Trp	
1 5 10	
aag aac ctc act ttc aga aga aga caa aca tgt cag ctg ctg ctg gaa	397
Lys Asn Leu Thr Phe Arg Arg Arg Gln Thr Cys Gln Leu Leu Leu Glu	
15 20 25	
gtg gcc tgg cct cta ttt atc ttc ctg atc ctg atc tct gtt cgg ctg	445
Val Ala Trp Pro Leu Phe Ile Phe Leu Ile Leu Ile Ser Val Arg Leu	
30 35 40	
agc tac cca ccc tat gaa caa cat gaa tgc cat ttt cca aat aaa gcc	493
Ser Tyr Pro Pro Tyr Glu Gln His Glu Cys His Phe Pro Asn Lys Ala	
45 50 55 60	
atg ccc tct gca gga aca ctt cct tgg gtt cag ggg att atc tgt aat	541
Met Pro Ser Ala Gly Thr Leu Pro Trp Val Gln Gly Ile Ile Cys Asn	
65 70 75	
gcc aac aac ccc tgt ttc cgt tac ccg act cct ggg gag gct ccc gga	589
Ala Asn Asn Pro Cys Phe Arg Tyr Pro Thr Pro Gly Glu Ala Pro Gly	
80 85 90	
gtt gtt gga aac ttt aac aaa tcc att gtg gct cgc ctg ttc tca gat	637
Val Val Gly Asn Phe Asn Lys Ser Ile Val Ala Arg Leu Phe Ser Asp	
95 100 105	
gct cgg agg ctt ctt tta tac agc cag aaa gac acc agc atg aag gac	685
Ala Arg Arg Leu Leu Leu Tyr Ser Gln Lys Asp Thr Ser Met Lys Asp	
110 115 120	
atg cgc aaa gtt ctg aga aca tta cag cag atc aag aaa tcc agc tca	733
Met Arg Lys Val Leu Arg Thr Leu Gln Gln Ile Lys Lys Ser Ser Ser	
125 130 135 140	
aac ttg aag ctt caa gat ttc ctg gtg gac aat gaa acc ttc tct ggg	781
Asn Leu Lys Leu Gln Asp Phe Leu Val Asp Asn Glu Thr Phe Ser Gly	
145 150 155	
ttc ctg tat cac aac ctc tct ctc cca aag tct act gtg gac aag atg	829
Phe Leu Tyr His Asn Leu Ser Leu Pro Lys Ser Thr Val Asp Lys Met	
160 165 170	
ctg agg gct gat gtc att ctc cac aag gta ttt ttg caa ggc tac cag	877
Leu Arg Ala Asp Val Ile Leu His Lys Val Phe Leu Gln Gly Tyr Gln	
175 180 185	
tta cat ttg aca agt ctg tgc aat gga tca aaa tca gaa gag atg att	925
Leu His Leu Thr Ser Leu Cys Asn Gly Ser Lys Ser Glu Glu Met Ile	
190 195 200	
caa ctt ggt gac caa gaa gtt tct gag ctt tgt ggc cta cca agg gag	973
Gln Leu Gly Asp Gln Glu Val Ser Glu Leu Cys Gly Leu Pro Arg Glu	
205 210 215 220	
aaa ctg gct gca gca gag cga gta ctt cgt tcc aac atg gac atc ctg	1021
Lys Leu Ala Ala Ala Glu Arg Val Leu Arg Ser Asn Met Asp Ile Leu	
225 230 235	
aag cca atc ctg aga aca cta aac tct aca tct ccc ttc ccg agc aag	1069
Lys Pro Ile Leu Arg Thr Leu Asn Ser Thr Ser Pro Phe Pro Ser Lys	
240 245 250	
gag ctg gct gaa gcc aca aaa aca ttg ctg cat agt ctt ggg act ctg	1117

ES 2 621 298 T3

510		515		520		
gag ctg ctg gat gag agg aag ttc tgg gct ggt att gtg ttc act gga						1933
Glu Leu Leu Asp Glu Arg Lys Phe Trp Ala Gly Ile Val Phe Thr Gly						
525		530		535		540
att act cca ggc agc att gag ctg ccc cat cat gtc aag tac aag atc						1981
Ile Thr Pro Gly Ser Ile Glu Leu Pro His His Val Lys Tyr Lys Ile						
		545		550		555
cga atg gac att gac aat gtg gag agg aca aat aaa atc aag gat ggg						2029
Arg Met Asp Ile Asp Asn Val Glu Arg Thr Asn Lys Ile Lys Asp Gly						
		560		565		570
tac tgg gac cct ggt cct cga gct gac ccc ttt gag gac atg cgg tac						2077
Tyr Trp Asp Pro Gly Pro Arg Ala Asp Pro Phe Glu Asp Met Arg Tyr						
		575		580		585
gtc tgg ggg ggc ttc gcc tac ttg cag gat gtg gtg gag cag gca atc						2125
Val Trp Gly Gly Phe Ala Tyr Leu Gln Asp Val Val Glu Gln Ala Ile						
		590		595		600
atc agg gtg ctg acg ggc acc gag aag aaa act ggt gtc tat atg caa						2173
Ile Arg Val Leu Thr Gly Thr Glu Lys Lys Thr Gly Val Tyr Met Gln						
		605		610		615
cag atg ccc tat ccc tgt tac gtt gat gac atc ttt ctg cgg gtg atg						2221
Gln Met Pro Tyr Pro Cys Tyr Val Asp Asp Ile Phe Leu Arg Val Met						
		625		630		635
agc cgg tca atg ccc ctc ttc atg acg ctg gcc tgg att tac tca gtg						2269
Ser Arg Ser Met Pro Leu Phe Met Thr Leu Ala Trp Ile Tyr Ser Val						
		640		645		650
gct gtg atc atc aag ggc atc gtg tat gag aag gag gca cgg ctg aaa						2317
Ala Val Ile Ile Lys Gly Ile Val Tyr Glu Lys Glu Ala Arg Leu Lys						
		655		660		665
gag acc atg cgg atc atg ggc ctg gac aac agc atc ctc tgg ttt agc						2365
Glu Thr Met Arg Ile Met Gly Leu Asp Asn Ser Ile Leu Trp Phe Ser						
		670		675		680
tgg ttc att agt agc ctc att cct ctt ctt gtg agc gct ggc ctg cta						2413
Trp Phe Ile Ser Ser Leu Ile Pro Leu Leu Val Ser Ala Gly Leu Leu						
		685		690		700
gtg gtc atc ctg aag tta gga aac ctg ctg ccc tac agt gat ccc agc						2461
Val Val Ile Leu Lys Leu Gly Asn Leu Leu Pro Tyr Ser Asp Pro Ser						
		705		710		715
gtg gtg ttt gtc ttc ctg tcc gtg ttt gct gtg gtg aca atc ctg cag						2509
Val Val Phe Val Phe Leu Ser Val Phe Ala Val Val Thr Ile Leu Gln						
		720		725		730
tgc ttc ctg att agc aca ctc ttc tcc aga gcc aac ctg gca gca gcc						2557
Cys Phe Leu Ile Ser Thr Leu Phe Ser Arg Ala Asn Leu Ala Ala Ala						
		735		740		745
tgt ggg ggc atc atc tac ttc acg ctg tac ctg ccc tac gtc ctg tgt						2605
Cys Gly Gly Ile Ile Tyr Phe Thr Leu Tyr Leu Pro Tyr Val Leu Cys						
		750		755		760
gtg gca tgg cag gac tac gtg ggc ttc aca ctc aag atc ttc gct agc						2653
Val Ala Trp Gln Asp Tyr Val Gly Phe Thr Leu Lys Ile Phe Ala Ser						
		765		770		775
						780

ES 2 621 298 T3

ctg ctg tct cct gtg gct ttt ggg ttt ggc tgt gag tac ttt gcc ctt Leu Leu Ser Pro Val Ala Phe Gly Phe Gly Cys Glu Tyr Phe Ala Leu 785 790 795	2701
ttt gag gag cag ggc att gga gtg cag tgg gac aac ctg ttt gag agt Phe Glu Glu Gln Gly Ile Gly Val Gln Trp Asp Asn Leu Phe Glu Ser 800 805 810	2749
cct gtg gag gaa gat ggc ttc aat ctc acc act tcg gtc tcc atg atg Pro Val Glu Glu Asp Gly Phe Asn Leu Thr Thr Ser Val Ser Met Met 815 820 825	2797
ctg ttt gac acc ttc ctc tat ggg gtg atg acc tgg tac att gag gct Leu Phe Asp Thr Phe Leu Tyr Gly Val Met Thr Trp Tyr Ile Glu Ala 830 835 840	2845
gtc ttt cca ggc cag tac gga att ccc agg ccc tgg tat ttt cct tgc Val Phe Pro Gly Gln Tyr Gly Ile Pro Arg Pro Trp Tyr Phe Pro Cys 845 850 855 860	2893
acc aag tcc tac tgg ttt ggc gag gaa agt gat gag aag agc cac cct Thr Lys Ser Tyr Trp Phe Gly Glu Glu Ser Asp Glu Lys Ser His Pro 865 870 875	2941
ggt tcc aac cag aag aga ata tca gaa atc tgc atg gag gag gaa ccc Gly Ser Asn Gln Lys Arg Ile Ser Glu Ile Cys Met Glu Glu Glu Pro 880 885 890	2989
acc cac ttg aag ctg ggc gtg tcc att cag aac ctg gta aaa gtc tac Thr His Leu Lys Leu Gly Val Ser Ile Gln Asn Leu Val Lys Val Tyr 895 900 905	3037
cga gat ggg atg aag gtg gct gtc gat ggc ctg gca ctg aat ttt tat Arg Asp Gly Met Lys Val Ala Val Asp Gly Leu Ala Leu Asn Phe Tyr 910 915 920	3085
gag ggc cag atc acc tcc ttc ctg ggc cac aat gga gcg ggg aag acg Glu Gly Gln Ile Thr Ser Phe Leu Gly His Asn Gly Ala Gly Lys Thr 925 930 935 940	3133
acc acc atg tca atc ctg acc ggg ttg ttc ccc ccg acc tcg ggc acc Thr Thr Met Ser Ile Leu Thr Gly Leu Phe Pro Pro Thr Ser Gly Thr 945 950 955	3181
gcc tac atc ctg gga aaa gac att cgc tct gag atg agc acc atc cgg Ala Tyr Ile Leu Gly Lys Asp Ile Arg Ser Glu Met Ser Thr Ile Arg 960 965 970	3229
cag aac ctg ggg gtc tgt ccc cag cat aac gtg ctg ttt gac atg ctg Gln Asn Leu Gly Val Cys Pro Gln His Asn Val Leu Phe Asp Met Leu 975 980 985	3277
act gtc gaa gaa cac atc tgg ttc tat gcc cgc ttg aaa ggg ctc tct Thr Val Glu Glu His Ile Trp Phe Tyr Ala Arg Leu Lys Gly Leu Ser 990 995 1000	3325
gag aag cac gtg aag gcg gag atg gag cag atg gcc ctg gat gtt Glu Lys His Val Lys Ala Glu Met Glu Gln Met Ala Leu Asp Val 1005 1010 1015	3370
ggt ttg cca tca agc aag ctg aaa agc aaa aca agc cag ctg tca Gly Leu Pro Ser Ser Lys Leu Lys Ser Lys Thr Ser Gln Leu Ser 1020 1025 1030	3415

ES 2 621 298 T3

ggt Gly 1035	gga atg cag aga aag Gly Met Gln Arg Lys 1040	cta tct gtg gcc ttg Leu Ser Val Ala Leu 1045	gcc ttt gtc ggg Ala Phe Val Gly	3460
gga Gly 1050	tct aag gtt gtc att Ser Lys Val Val Ile 1055	ctg gat gaa ccc aca Leu Asp Glu Pro Thr 1060	gct ggt gtg gac Ala Gly Val Asp	3505
cct Pro 1065	tac tcc cgc agg gga Tyr Ser Arg Arg Gly 1070	ata tgg gag ctg ctg Ile Trp Glu Leu Leu 1075	ctg aaa tac cga Leu Lys Tyr Arg	3550
caa Gln 1080	ggc cgc acc att att Gly Arg Thr Ile Ile 1085	ctc tct aca cac cac Leu Ser Thr His His 1090	atg gat gaa gcg Met Asp Glu Ala	3595
gac Asp 1095	gtc ctg ggg gac agg Val Leu Gly Asp Arg 1100	att gcc atc atc tcc Ile Ala Ile Ile Ser 1105	cat ggg aag ctg His Gly Lys Leu	3640
tgc Cys 1110	tgt gtg ggc tcc tcc Cys Val Gly Ser Ser 1115	ctg ttt ctg aag aac Leu Phe Leu Lys Asn 1120	cag ctg gga aca Gln Leu Gly Thr	3685
ggc Gly 1125	tac tac ctg acc ttg Tyr Tyr Leu Thr Leu 1130	gtc aag aaa gat gtg Val Lys Lys Asp Val 1135	gaa tcc tcc ctc Glu Ser Ser Leu	3730
agt Ser 1140	tcc tgc aga aac agt Ser Cys Arg Asn Ser 1145	agt agc act gtg tca Ser Ser Thr Val Ser 1150	tac ctg aaa aag Tyr Leu Lys Lys	3775
gag Glu 1155	gac agt gtt tct cag Asp Ser Val Ser Gln 1160	agc agt tct gat gct Ser Ser Ser Asp Ala 1165	ggc ctg ggc agc Gly Leu Gly Ser	3820
gac Asp 1170	cat gag agt gac acg His Glu Ser Asp Thr 1175	ctg acc atc gat gtc Leu Thr Ile Asp Val 1180	tct gct atc tcc Ser Ala Ile Ser	3865
aac Asn 1185	ctc atc agg aag cat Leu Ile Arg Lys His 1190	gtg tct gaa gcc cgg Val Ser Glu Ala Arg 1195	ctg gtg gaa gac Leu Val Glu Asp	3910
ata Ile 1200	ggg cat gag ctg acc Gly His Glu Leu Thr 1205	tat gtg ctg cca tat Tyr Val Leu Pro Tyr 1210	gaa gct gct aag Glu Ala Ala Lys	3955
gag Glu 1215	gga gcc ttt gtg gaa Gly Ala Phe Val Glu 1220	ctc ttt cat gag att Leu Phe His Glu Ile 1225	gat gac cgg ctc Asp Asp Arg Leu	4000
tca Ser 1230	gac ctg ggc att tct Asp Leu Gly Ile Ser 1235	agt tat ggc atc tca Ser Tyr Gly Ile Ser 1240	gag acg acc ctg Glu Thr Thr Leu	4045
gaa Glu 1245	gaa ata ttc ctc aag Glu Ile Phe Leu Lys 1250	gtg gcc gaa gag agt Val Ala Glu Glu Ser 1255	ggg gtg gat gct Gly Val Asp Ala	4090
gag Glu 1260	acc tca gat ggt acc Thr Ser Asp Gly Thr 1265	ttg cca gca aga cga Leu Pro Ala Arg Arg 1270	aac agg cgg gcc Asn Arg Arg Ala	4135
ttc	ggg gac aag cag agc	tgt ctt cgc ccg ttc	act gaa gat gat	4180

ES 2 621 298 T3

Phe 1275	Gly	Asp	Lys	Gln	Ser 1280	Cys	Leu	Arg	Pro	Phe 1285	Thr	Glu	Asp	Asp		
	gct	gct	gat	cca	aat	gat	tct	gac	ata	gac	cca	gaa	tcc	aga	gag	4225
Ala 1290	Ala	Asp	Pro	Asn	Asp 1295	Ser	Asp	Ile	Asp	Pro 1300	Glu	Ser	Arg	Glu		
	aca	gac	ttg	ctc	agt	ggg	atg	gat	ggc	aaa	ggg	tcc	tac	cag	gtg	4270
Thr 1305	Asp	Leu	Leu	Ser	Gly 1310	Met	Asp	Gly	Lys	Gly 1315	Ser	Tyr	Gln	Val		
	aaa	ggc	tgg	aaa	ctt	aca	cag	caa	cag	ttt	gtg	gcc	ctt	ttg	tgg	4315
Lys 1320	Gly	Trp	Lys	Leu	Thr 1325	Gln	Gln	Gln	Phe	Val 1330	Ala	Leu	Leu	Trp		
	aag	aga	ctg	cta	att	gcc	aga	cgg	agt	cgg	aaa	gga	ttt	ttt	gct	4360
Lys 1335	Arg	Leu	Leu	Ile	Ala 1340	Arg	Arg	Ser	Arg	Lys 1345	Gly	Phe	Phe	Ala		
	cag	att	gtc	ttg	cca	gct	gtg	ttt	gtc	tgc	att	gcc	ctt	gtg	ttc	4405
Gln 1350	Ile	Val	Leu	Pro	Ala 1355	Val	Phe	Val	Cys	Ile 1360	Ala	Leu	Val	Phe		
	agc	ctg	atc	gtg	cca	ccc	ttt	ggc	aag	tac	ccc	agc	ctg	gaa	ctt	4450
Ser 1365	Leu	Ile	Val	Pro	Pro 1370	Phe	Gly	Lys	Tyr	Pro 1375	Ser	Leu	Glu	Leu		
	cag	ccc	tgg	atg	tac	aac	gaa	cag	tac	aca	ttt	gtc	agc	aat	gat	4495
Gln 1380	Pro	Trp	Met	Tyr	Asn 1385	Glu	Gln	Tyr	Thr	Phe 1390	Val	Ser	Asn	Asp		
	gct	cct	gag	gac	acg	gga	acc	ctg	gaa	ctc	tta	aac	gcc	ctc	acc	4540
Ala 1395	Pro	Glu	Asp	Thr	Gly 1400	Thr	Leu	Glu	Leu	Leu 1405	Asn	Ala	Leu	Thr		
	aaa	gac	cct	ggc	ttc	ggg	acc	cgc	tgt	atg	gaa	gga	aac	cca	atc	4585
Lys 1410	Asp	Pro	Gly	Phe	Gly 1415	Thr	Arg	Cys	Met	Glu 1420	Gly	Asn	Pro	Ile		
	cca	gac	acg	ccc	tgc	cag	gca	ggg	gag	gaa	gag	tgg	acc	act	gcc	4630
Pro 1425	Asp	Thr	Pro	Cys	Gln 1430	Ala	Gly	Glu	Glu	Glu 1435	Trp	Thr	Thr	Ala		
	cca	gtt	ccc	cag	acc	atc	atg	gac	ctc	ttc	cag	aat	ggg	aac	tgg	4675
Pro 1440	Val	Pro	Gln	Thr	Ile 1445	Met	Asp	Leu	Phe	Gln 1450	Asn	Gly	Asn	Trp		
	aca	atg	cag	aac	cct	tca	cct	gca	tgc	cag	tgt	agc	agc	gac	aaa	4720
Thr 1455	Met	Gln	Asn	Pro	Ser 1460	Pro	Ala	Cys	Gln	Cys 1465	Ser	Ser	Asp	Lys		
	atc	aag	aag	atg	ctg	cct	gtg	tgt	ccc	cca	ggg	gca	ggg	ggg	ctg	4765
Ile 1470	Lys	Lys	Met	Leu	Pro 1475	Val	Cys	Pro	Pro	Gly 1480	Ala	Gly	Gly	Leu		
	cct	cct	cca	caa	aga	aaa	caa	aac	act	gca	gat	atc	ctt	cag	gac	4810
Pro 1485	Pro	Pro	Gln	Arg	Lys 1490	Gln	Asn	Thr	Ala	Asp 1495	Ile	Leu	Gln	Asp		
	ctg	aca	gga	aga	aac	att	tcg	gat	tat	ctg	gtg	aag	acg	tat	gtg	4855
Leu 1500	Thr	Gly	Arg	Asn	Ile 1505	Ser	Asp	Tyr	Leu	Val 1510	Lys	Thr	Tyr	Val		
	cag	atc	ata	gcc	aaa	agc	tta	aag	aac	aag	atc	tgg	gtg	aat	gag	4900
Gln	Ile	Ile	Ala	Lys	Ser	Leu	Lys	Asn	Lys	Ile	Trp	Val	Asn	Glu		

ES 2 621 298 T3

ctc	acc	agc	gtg	aac	ctc	ttc	att	ggc	att	aat	ggc	agc	gtg	gcc	5665
Leu	Thr	Ser	Val	Asn	Leu	Phe	Ile	Gly	Ile	Asn	Gly	Ser	Val	Ala	
1770					1775					1780					
acc	ttt	gtg	ctg	gag	ctg	ttc	acc	gac	aat	aag	ctg	aat	aat	atc	5710
Thr	Phe	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Thr	Asp	Asn	Lys	Leu	Asn	Asn	Ile	
1785					1790					1795					
aat	gat	atc	ctg	aag	tcc	gtg	ttc	ttg	atc	ttc	cca	cat	ttt	tgc	5755
Asn	Asp	Ile	Leu	Lys	Ser	Val	Phe	Leu	Ile	Phe	Pro	His	Phe	Cys	
1800					1805					1810					
ctg	gga	cga	ggg	ctc	atc	gac	atg	gtg	aaa	aac	cag	gca	atg	gct	5800
Leu	Gly	Arg	Gly	Leu	Ile	Asp	Met	Val	Lys	Asn	Gln	Ala	Met	Ala	
1815					1820					1825					
gat	gcc	ctg	gaa	agg	ttt	ggg	gag	aat	cgc	ttt	gtg	tca	cca	tta	5845
Asp	Ala	Leu	Glu	Arg	Phe	Gly	Glu	Asn	Arg	Phe	Val	Ser	Pro	Leu	
1830					1835					1840					
tct	tgg	gac	ttg	gtg	gga	cga	aac	ctc	ttc	gcc	atg	gcc	gtg	gaa	5890
Ser	Trp	Asp	Leu	Val	Gly	Arg	Asn	Leu	Phe	Ala	Met	Ala	Val	Glu	
1845					1850					1855					
ggg	gtg	gtg	ttc	ttc	ctc	att	act	gtt	ctg	atc	cag	tac	aga	ttc	5935
Gly	Val	Val	Phe	Phe	Leu	Ile	Thr	Val	Leu	Ile	Gln	Tyr	Arg	Phe	
1860					1865					1870					
ttc	atc	agg	ccc	aga	cct	gta	aat	gca	aag	cta	tct	cct	ctg	aat	5980
Phe	Ile	Arg	Pro	Arg	Pro	Val	Asn	Ala	Lys	Leu	Ser	Pro	Leu	Asn	
1875					1880					1885					
gat	gaa	gat	gaa	gat	gtg	agg	cgg	gaa	aga	cag	aga	att	ctt	gat	6025
Asp	Glu	Asp	Glu	Asp	Val	Arg	Arg	Glu	Arg	Gln	Arg	Ile	Leu	Asp	
1890					1895					1900					
ggt	gga	ggc	cag	aat	gac	atc	tta	gaa	atc	aag	gag	ttg	acg	aag	6070
Gly	Gly	Gly	Gln	Asn	Asp	Ile	Leu	Glu	Ile	Lys	Glu	Leu	Thr	Lys	
1905					1910					1915					
ata	tat	aga	agg	aag	cgg	aag	cct	gct	gtt	gac	agg	att	tgc	gtg	6115
Ile	Tyr	Arg	Arg	Lys	Arg	Lys	Pro	Ala	Val	Asp	Arg	Ile	Cys	Val	
1920					1925					1930					
ggc	att	cct	cct	ggt	gag	tgc	ttt	ggg	ctc	ctg	gga	gtt	aat	ggg	6160
Gly	Ile	Pro	Pro	Gly	Glu	Cys	Phe	Gly	Leu	Leu	Gly	Val	Asn	Gly	
1935					1940					1945					
gct	gga	aaa	tca	tca	act	ttc	aag	atg	tta	aca	gga	gat	acc	act	6205
Ala	Gly	Lys	Ser	Ser	Thr	Phe	Lys	Met	Leu	Thr	Gly	Asp	Thr	Thr	
1950					1955					1960					
gtt	acc	aga	gga	gat	gct	ttc	ctt	aac	aaa	aat	agt	atc	tta	tca	6250
Val	Thr	Arg	Gly	Asp	Ala	Phe	Leu	Asn	Lys	Asn	Ser	Ile	Leu	Ser	
1965					1970					1975					
aac	atc	cat	gaa	gta	cat	cag	aac	atg	ggc	tac	tgc	cct	cag	ttt	6295
Asn	Ile	His	Glu	Val	His	Gln	Asn	Met	Gly	Tyr	Cys	Pro	Gln	Phe	
1980					1985					1990					
gat	gcc	atc	aca	gag	ctg	ttg	act	ggg	aga	gaa	cac	gtg	gag	ttc	6340
Asp	Ala	Ile	Thr	Glu	Leu	Leu	Thr	Gly	Arg	Glu	His	Val	Glu	Phe	
1995					2000					2005					

ES 2 621 298 T3

ttt Phe 2010	gcc Ala 2015	ctt Leu 2015	ttg Leu 2015	aga Arg 2015	gga Gly 2015	gtc Val 2015	cca Pro 2015	gag Glu 2015	aaa Lys 2015	gaa Glu 2020	ggt Val 2020	ggc Gly 2020	aag Lys 2020	gtt Val 2020	6385
ggt Gly 2025	gag Glu 2025	tgg Trp 2025	gcg Ala 2025	att Ile 2025	cgg Arg 2030	aaa Lys 2030	ctg Leu 2030	ggc Gly 2030	ctc Leu 2030	gtg Val 2035	aag Lys 2035	tat Tyr 2035	gga Gly 2035	gaa Glu 2035	6430
aaa Lys 2040	tat Tyr 2040	gct Ala 2040	ggt Gly 2040	aac Asn 2040	tat Tyr 2045	agt Ser 2045	gga Gly 2045	ggc Gly 2045	aac Asn 2045	aaa Lys 2050	cgc Arg 2050	aag Lys 2050	ctc Leu 2050	tct Ser 2050	6475
aca Thr 2055	gcc Ala 2055	atg Met 2055	gct Ala 2055	ttg Leu 2055	atc Ile 2060	ggc Gly 2060	ggg Gly 2060	cct Pro 2060	cct Pro 2060	gtg Val 2065	gtg Val 2065	ttt Phe 2065	ctg Leu 2065	gat Asp 2065	6520
gaa Glu 2070	ccc Pro 2070	acc Thr 2070	aca Thr 2070	ggc Gly 2070	atg Met 2075	gat Asp 2075	ccc Pro 2075	aaa Lys 2075	gcc Ala 2075	cgg Arg 2080	cgg Arg 2080	ttc Phe 2080	ttg Leu 2080	tgg Trp 2080	6565
aat Asn 2085	tgt Cys 2085	gcc Ala 2085	cta Leu 2085	agt Ser 2085	gtt Val 2090	gtc Val 2090	aag Lys 2090	gag Glu 2090	ggg Gly 2090	aga Arg 2095	tca Ser 2095	gta Val 2095	gtg Val 2095	ctt Leu 2095	6610
aca Thr 2100	tct Ser 2100	cat His 2100	agt Ser 2100	atg Met 2100	gaa Gly 2105	gaa Glu 2105	tgt Cys 2105	gaa Glu 2105	gct Ala 2105	ctt Leu 2110	tgc Cys 2110	act Thr 2110	agg Arg 2110	atg Met 2110	6655
gca Ala 2115	atc Ile 2115	atg Met 2115	gtc Val 2115	aat Asn 2115	gga Gly 2120	agg Arg 2120	ttc Phe 2120	agg Arg 2120	tgc Cys 2120	ctt Leu 2125	ggc Gly 2125	agt Ser 2125	gtc Val 2125	cag Gln 2125	6700
cat His 2130	cta Leu 2130	aaa Lys 2130	aat Asn 2130	agg Arg 2130	ttt Phe 2135	gga Gly 2135	gat Asp 2135	ggt Gly 2135	tat Tyr 2135	aca Thr 2140	ata Ile 2140	gtt Val 2140	gta Val 2140	cga Arg 2140	6745
ata Ile 2145	gca Ala 2145	ggg Gly 2145	tcc Ser 2145	aac Asn 2145	ccg Pro 2150	gac Asp 2150	ctg Leu 2150	aag Lys 2150	cct Pro 2150	gtc Val 2155	cag Gln 2155	gat Asp 2155	ttc Phe 2155	ttt Phe 2155	6790
gga Gly 2160	ctt Leu 2160	gca Ala 2160	ttt Phe 2160	cct Pro 2160	gga Gly 2165	agt Ser 2165	gtt Val 2165	cta Leu 2165	aaa Lys 2165	gag Glu 2170	aaa Lys 2170	cac His 2170	cgg Arg 2170	aac Asn 2170	6835
atg Met 2175	cta Leu 2175	caa Gln 2175	tac Tyr 2175	cag Gln 2175	ctt Leu 2180	cca Pro 2180	tct Ser 2180	tca Ser 2180	tta Leu 2180	tct Ser 2185	tct Ser 2185	ctg Leu 2185	gcc Ala 2185	agg Arg 2185	6880
ata Ile 2190	ttc Phe 2190	agc Ser 2190	atc Ile 2190	ctc Leu 2190	tcc Ser 2195	cag Gln 2195	agc Ser 2195	aaa Lys 2195	aag Lys 2195	cga Arg 2200	ctc Leu 2200	cac His 2200	ata Ile 2200	gaa Glu 2200	6925
gac Asp 2205	tac Tyr 2205	tct Ser 2205	ggt Val 2205	tct Ser 2205	cag Gln 2210	aca Thr 2210	aca Thr 2210	ctt Leu 2210	gac Asp 2210	caa Gln 2215	gta Val 2215	ttt Phe 2215	gtg Val 2215	aac Asn 2215	6970
ttt Phe 2220	gcc Ala 2220	aag Lys 2220	gac Asp 2220	caa Gln 2220	agt Ser 2225	gat Asp 2225	gat Asp 2225	gac Asp 2225	cac His 2225	tta Leu 2230	aaa Lys 2230	gac Asp 2230	ctc Leu 2230	tca Ser 2230	7015
tta Leu 2235	cac His 2235	aaa Lys 2235	aac Asn 2235	cag Gln 2235	aca Thr 2240	gta Val 2240	gtg Val 2240	gac Asp 2240	gtt Val 2240	gca Ala 2245	gtt Val 2245	ctc Leu 2245	aca Thr 2245	tct Ser 2245	7060
ttt 2245	cta 2245	cag 2245	gat 2245	gag 2245	aaa 2245	gtg 2245	aaa 2245	gaa 2245	agc 2245	tat 2245	gta 2245	tga 2245	agaatcctgt 2245	7109	

ES 2 621 298 T3

Phe Leu Gln Asp Glu Lys Val Lys Glu Ser Tyr Val
2250 2255 2260

5 tcatacggggg tggctgaaag taaagaggaa c 7140

< 210 > 7

< 211 > 2261

10 < 212 > PRT

< 213 > Homo sapiens

< 400 > 7

15

20

ES 2 621 298 T3

Met Ala Cys Trp Pro Gln Leu Arg Leu Leu Leu Trp Lys Asn Leu Thr
1 5 10 15

Phe Arg Arg Arg Gln Thr Cys Gln Leu Leu Leu Glu Val Ala Trp Pro
20 25 30

Leu Phe Ile Phe Leu Ile Leu Ile Ser Val Arg Leu Ser Tyr Pro Pro
35 40 45

Tyr Glu Gln His Glu Cys His Phe Pro Asn Lys Ala Met Pro Ser Ala
50 55 60

Gly Thr Leu Pro Trp Val Gln Gly Ile Ile Cys Asn Ala Asn Asn Pro
65 70 75 80

Cys Phe Arg Tyr Pro Thr Pro Gly Glu Ala Pro Gly Val Val Gly Asn
85 90 95

Phe Asn Lys Ser Ile Val Ala Arg Leu Phe Ser Asp Ala Arg Arg Leu
100 105 110

Leu Leu Tyr Ser Gln Lys Asp Thr Ser Met Lys Asp Met Arg Lys Val
115 120 125

Leu Arg Thr Leu Gln Gln Ile Lys Lys Ser Ser Ser Asn Leu Lys Leu
130 135 140

Gln Asp Phe Leu Val Asp Asn Glu Thr Phe Ser Gly Phe Leu Tyr His
145 150 155 160

Asn Leu Ser Leu Pro Lys Ser Thr Val Asp Lys Met Leu Arg Ala Asp
165 170 175

Val Ile Leu His Lys Val Phe Leu Gln Gly Tyr Gln Leu His Leu Thr
180 185 190

Ser Leu Cys Asn Gly Ser Lys Ser Glu Glu Met Ile Gln Leu Gly Asp
195 200 205

ES 2 621 298 T3

Gln Glu Val Ser Glu Leu Cys Gly Leu Pro Arg Glu Lys Leu Ala Ala
 210 215 220

Ala Glu Arg Val Leu Arg Ser Asn Met Asp Ile Leu Lys Pro Ile Leu
 225 230 235 240

Arg Thr Leu Asn Ser Thr Ser Pro Phe Pro Ser Lys Glu Leu Ala Glu
 245 250 255

Ala Thr Lys Thr Leu Leu His Ser Leu Gly Thr Leu Ala Gln Glu Leu
 260 265 270

Phe Ser Met Arg Ser Trp Ser Asp Met Arg Gln Glu Val Met Phe Leu
 275 280 285

Thr Asn Val Asn Ser Ser Ser Ser Ser Thr Gln Ile Tyr Gln Ala Val
 290 295 300

Ser Arg Ile Val Cys Gly His Pro Glu Gly Gly Gly Leu Lys Ile Lys
 305 310 315 320

Ser Leu Asn Trp Tyr Glu Asp Asn Asn Tyr Lys Ala Leu Phe Gly Gly
 325 330 335

Asn Gly Thr Glu Glu Asp Ala Glu Thr Phe Tyr Asp Asn Ser Thr Thr
 340 345 350

Pro Tyr Cys Asn Asp Leu Met Lys Asn Leu Glu Ser Ser Pro Leu Ser
 355 360 365

Arg Ile Ile Trp Lys Ala Leu Lys Pro Leu Leu Val Gly Lys Ile Leu
 370 375 380

Tyr Thr Pro Asp Thr Pro Ala Thr Arg Gln Val Met Ala Glu Val Asn
 385 390 395 400

Lys Thr Phe Gln Glu Leu Ala Val Phe His Asp Leu Glu Gly Met Trp
 405 410 415

Glu Glu Leu Ser Pro Lys Ile Trp Thr Phe Met Glu Asn Ser Gln Glu
 420 425 430

Met Asp Leu Val Arg Met Leu Leu Asp Ser Arg Asp Asn Asp His Phe
 435 440 445

Trp Glu Gln Gln Leu Asp Gly Leu Asp Trp Thr Ala Gln Asp Ile Val
 450 455 460

Ala Phe Leu Ala Lys His Pro Glu Asp Val Gln Ser Ser Asn Gly Ser

ES 2 621 298 T3

Ser Thr Leu Phe Ser Arg Ala Asn Leu Ala Ala Ala Cys Gly Gly Ile
740 745 750

Ile Tyr Phe Thr Leu Tyr Leu Pro Tyr Val Leu Cys Val Ala Trp Gln
755 760 765

Asp Tyr Val Gly Phe Thr Leu Lys Ile Phe Ala Ser Leu Leu Ser Pro
770 775 780

Val Ala Phe Gly Phe Gly Cys Glu Tyr Phe Ala Leu Phe Glu Glu Gln
785 790 795 800

Gly Ile Gly Val Gln Trp Asp Asn Leu Phe Glu Ser Pro Val Glu Glu
805 810 815

Asp Gly Phe Asn Leu Thr Thr Ser Val Ser Met Met Leu Phe Asp Thr
820 825 830

Phe Leu Tyr Gly Val Met Thr Trp Tyr Ile Glu Ala Val Phe Pro Gly
835 840 845

Gln Tyr Gly Ile Pro Arg Pro Trp Tyr Phe Pro Cys Thr Lys Ser Tyr
850 855 860

Trp Phe Gly Glu Glu Ser Asp Glu Lys Ser His Pro Gly Ser Asn Gln
865 870 875 880

Lys Arg Ile Ser Glu Ile Cys Met Glu Glu Glu Pro Thr His Leu Lys
885 890 895

Leu Gly Val Ser Ile Gln Asn Leu Val Lys Val Tyr Arg Asp Gly Met
900 905 910

Lys Val Ala Val Asp Gly Leu Ala Leu Asn Phe Tyr Glu Gly Gln Ile
915 920 925

Thr Ser Phe Leu Gly His Asn Gly Ala Gly Lys Thr Thr Thr Met Ser
930 935 940

Ile Leu Thr Gly Leu Phe Pro Pro Thr Ser Gly Thr Ala Tyr Ile Leu
945 950 955 960

Gly Lys Asp Ile Arg Ser Glu Met Ser Thr Ile Arg Gln Asn Leu Gly
965 970 975

Val Cys Pro Gln His Asn Val Leu Phe Asp Met Leu Thr Val Glu Glu
980 985 990

ES 2 621 298 T3

His Ile Trp Phe Tyr Ala Arg Leu Lys Gly Leu Ser Glu Lys His Val
 995 1000 1005

Lys Ala Glu Met Glu Gln Met Ala Leu Asp Val Gly Leu Pro Ser
 1010 1015 1020

Ser Lys Leu Lys Ser Lys Thr Ser Gln Leu Ser Gly Gly Met Gln
 1025 1030 1035

Arg Lys Leu Ser Val Ala Leu Ala Phe Val Gly Gly Ser Lys Val
 1040 1045 1050

Val Ile Leu Asp Glu Pro Thr Ala Gly Val Asp Pro Tyr Ser Arg
 1055 1060 1065

Arg Gly Ile Trp Glu Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Gln Gly Arg Thr
 1070 1075 1080

Ile Ile Leu Ser Thr His His Met Asp Glu Ala Asp Val Leu Gly
 1085 1090 1095

Asp Arg Ile Ala Ile Ile Ser His Gly Lys Leu Cys Cys Val Gly
 1100 1105 1110

Ser Ser Leu Phe Leu Lys Asn Gln Leu Gly Thr Gly Tyr Tyr Leu
 1115 1120 1125

Thr Leu Val Lys Lys Asp Val Glu Ser Ser Leu Ser Ser Cys Arg
 1130 1135 1140

Asn Ser Ser Ser Thr Val Ser Tyr Leu Lys Lys Glu Asp Ser Val
 1145 1150 1155

Ser Gln Ser Ser Ser Asp Ala Gly Leu Gly Ser Asp His Glu Ser
 1160 1165 1170

Asp Thr Leu Thr Ile Asp Val Ser Ala Ile Ser Asn Leu Ile Arg
 1175 1180 1185

Lys His Val Ser Glu Ala Arg Leu Val Glu Asp Ile Gly His Glu
 1190 1195 1200

Leu Thr Tyr Val Leu Pro Tyr Glu Ala Ala Lys Glu Gly Ala Phe
 1205 1210 1215

Val Glu Leu Phe His Glu Ile Asp Asp Arg Leu Ser Asp Leu Gly
 1220 1225 1230

ES 2 621 298 T3

Ile Ser Ser Tyr Gly Ile Ser Glu Thr Thr Leu Glu Glu Ile Phe
1235 1240 1245

Leu Lys Val Ala Glu Glu Ser Gly Val Asp Ala Glu Thr Ser Asp
1250 1255 1260

Gly Thr Leu Pro Ala Arg Arg Asn Arg Arg Ala Phe Gly Asp Lys
1265 1270 1275

Gln Ser Cys Leu Arg Pro Phe Thr Glu Asp Asp Ala Ala Asp Pro
1280 1285 1290

Asn Asp Ser Asp Ile Asp Pro Glu Ser Arg Glu Thr Asp Leu Leu
1295 1300 1305

Ser Gly Met Asp Gly Lys Gly Ser Tyr Gln Val Lys Gly Trp Lys
1310 1315 1320

Leu Thr Gln Gln Gln Phe Val Ala Leu Leu Trp Lys Arg Leu Leu
1325 1330 1335

Ile Ala Arg Arg Ser Arg Lys Gly Phe Phe Ala Gln Ile Val Leu
1340 1345 1350

Pro Ala Val Phe Val Cys Ile Ala Leu Val Phe Ser Leu Ile Val
1355 1360 1365

Pro Pro Phe Gly Lys Tyr Pro Ser Leu Glu Leu Gln Pro Trp Met
1370 1375 1380

Tyr Asn Glu Gln Tyr Thr Phe Val Ser Asn Asp Ala Pro Glu Asp
1385 1390 1395

Thr Gly Thr Leu Glu Leu Leu Asn Ala Leu Thr Lys Asp Pro Gly
1400 1405 1410

Phe Gly Thr Arg Cys Met Glu Gly Asn Pro Ile Pro Asp Thr Pro
1415 1420 1425

Cys Gln Ala Gly Glu Glu Glu Trp Thr Thr Ala Pro Val Pro Gln
1430 1435 1440

Thr Ile Met Asp Leu Phe Gln Asn Gly Asn Trp Thr Met Gln Asn
1445 1450 1455

Pro Ser Pro Ala Cys Gln Cys Ser Ser Asp Lys Ile Lys Lys Met
1460 1465 1470

Leu Pro Val Cys Pro Pro Gly Ala Gly Gly Leu Pro Pro Pro Gln

ES 2 621 298 T3

1475		1480		1485
Arg Lys Gln Asn Thr Ala Asp Ile Leu Gln Asp Leu Thr Gly Arg	1490	1495		1500
Asn Ile Ser Asp Tyr Leu Val Lys Thr Tyr Val Gln Ile Ile Ala	1505	1510		1515
Lys Ser Leu Lys Asn Lys Ile Trp Val Asn Glu Phe Arg Tyr Gly	1520	1525		1530
Gly Phe Ser Leu Gly Val Ser Asn Thr Gln Ala Leu Pro Pro Ser	1535	1540		1545
Gln Glu Val Asn Asp Ala Ile Lys Gln Met Lys Lys His Leu Lys	1550	1555		1560
Leu Ala Lys Asp Ser Ser Ala Asp Arg Phe Leu Asn Ser Leu Gly	1565	1570		1575
Arg Phe Met Thr Gly Leu Asp Thr Lys Asn Asn Val Lys Val Trp	1580	1585		1590
Phe Asn Asn Lys Gly Trp His Ala Ile Ser Ser Phe Leu Asn Val	1595	1600		1605
Ile Asn Asn Ala Ile Leu Arg Ala Asn Leu Gln Lys Gly Glu Asn	1610	1615		1620
Pro Ser His Tyr Gly Ile Thr Ala Phe Asn His Pro Leu Asn Leu	1625	1630		1635
Thr Lys Gln Gln Leu Ser Glu Val Ala Leu Met Thr Thr Ser Val	1640	1645		1650
Asp Val Leu Val Ser Ile Cys Val Ile Phe Ala Met Ser Phe Val	1655	1660		1665
Pro Ala Ser Phe Val Val Phe Leu Ile Gln Glu Arg Val Ser Lys	1670	1675		1680
Ala Lys His Leu Gln Phe Ile Ser Gly Val Lys Pro Val Ile Tyr	1685	1690		1695
Trp Leu Ser Asn Phe Val Trp Asp Met Cys Asn Tyr Val Val Pro	1700	1705		1710
Ala Thr Leu Val Ile Ile Ile Phe Ile Cys Phe Gln Gln Lys Ser	1715	1720		1725

ES 2 621 298 T3

Tyr Val Ser Ser Thr Asn Leu Pro Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu
 1730 1735 1740

Leu Tyr Gly Trp Ser Ile Thr Pro Leu Met Tyr Pro Ala Ser Phe
 1745 1750 1755

Val Phe Lys Ile Pro Ser Thr Ala Tyr Val Val Leu Thr Ser Val
 1760 1765 1770

Asn Leu Phe Ile Gly Ile Asn Gly Ser Val Ala Thr Phe Val Leu
 1775 1780 1785

Glu Leu Phe Thr Asp Asn Lys Leu Asn Asn Ile Asn Asp Ile Leu
 1790 1795 1800

Lys Ser Val Phe Leu Ile Phe Pro His Phe Cys Leu Gly Arg Gly
 1805 1810 1815

Leu Ile Asp Met Val Lys Asn Gln Ala Met Ala Asp Ala Leu Glu
 1820 1825 1830

Arg Phe Gly Glu Asn Arg Phe Val Ser Pro Leu Ser Trp Asp Leu
 1835 1840 1845

Val Gly Arg Asn Leu Phe Ala Met Ala Val Glu Gly Val Val Phe
 1850 1855 1860

Phe Leu Ile Thr Val Leu Ile Gln Tyr Arg Phe Phe Ile Arg Pro
 1865 1870 1875

Arg Pro Val Asn Ala Lys Leu Ser Pro Leu Asn Asp Glu Asp Glu
 1880 1885 1890

Asp Val Arg Arg Glu Arg Gln Arg Ile Leu Asp Gly Gly Gly Gln
 1895 1900 1905

Asn Asp Ile Leu Glu Ile Lys Glu Leu Thr Lys Ile Tyr Arg Arg
 1910 1915 1920

Lys Arg Lys Pro Ala Val Asp Arg Ile Cys Val Gly Ile Pro Pro
 1925 1930 1935

Gly Glu Cys Phe Gly Leu Leu Gly Val Asn Gly Ala Gly Lys Ser
 1940 1945 1950

Ser Thr Phe Lys Met Leu Thr Gly Asp Thr Thr Val Thr Arg Gly
 1955 1960 1965

ES 2 621 298 T3

Asp Ala Phe Leu Asn Lys Asn Ser Ile Leu Ser Asn Ile His Glu
 1970 1975 1980

Val His Gln Asn Met Gly Tyr Cys Pro Gln Phe Asp Ala Ile Thr
 1985 1990 1995

Glu Leu Leu Thr Gly Arg Glu His Val Glu Phe Phe Ala Leu Leu
 2000 2005 2010

Arg Gly Val Pro Glu Lys Glu Val Gly Lys Val Gly Glu Trp Ala
 2015 2020 2025

Ile Arg Lys Leu Gly Leu Val Lys Tyr Gly Glu Lys Tyr Ala Gly
 2030 2035 2040

Asn Tyr Ser Gly Gly Asn Lys Arg Lys Leu Ser Thr Ala Met Ala
 2045 2050 2055

Leu Ile Gly Gly Pro Pro Val Val Phe Leu Asp Glu Pro Thr Thr
 2060 2065 2070

Gly Met Asp Pro Lys Ala Arg Arg Phe Leu Trp Asn Cys Ala Leu
 2075 2080 2085

Ser Val Val Lys Glu Gly Arg Ser Val Val Leu Thr Ser His Ser
 2090 2095 2100

Met Glu Glu Cys Glu Ala Leu Cys Thr Arg Met Ala Ile Met Val
 2105 2110 2115

Asn Gly Arg Phe Arg Cys Leu Gly Ser Val Gln His Leu Lys Asn
 2120 2125 2130

Arg Phe Gly Asp Gly Tyr Thr Ile Val Val Arg Ile Ala Gly Ser
 2135 2140 2145

Asn Pro Asp Leu Lys Pro Val Gln Asp Phe Phe Gly Leu Ala Phe
 2150 2155 2160

Pro Gly Ser Val Leu Lys Glu Lys His Arg Asn Met Leu Gln Tyr
 2165 2170 2175

Gln Leu Pro Ser Ser Leu Ser Ser Leu Ala Arg Ile Phe Ser Ile
 2180 2185 2190

Leu Ser Gln Ser Lys Lys Arg Leu His Ile Glu Asp Tyr Ser Val
 2195 2200 2205

ES 2 621 298 T3

5 Ser Gln Thr Thr Leu Asp Gln Val Phe Val Asn Phe Ala Lys Asp
2210 2215 2220

Gln Ser Asp Asp Asp His Leu Lys Asp Leu Ser Leu His Lys Asn
2225 2230 2235

10 Gln Thr Val Val Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Phe Leu Gln Asp
2240 2245 2250

15 Glu Lys Val Lys Glu Ser Tyr Val
2255 2260

< 210 > 8
20 < 211 > 780
< 212 > DNA
< 213 > Rattus norvegicus

< 220 >
25 < 221 > CDS
< 222 > (63)..(731)

< 400 > 8

30

gcagctttaa gtagagagtg gatttttgtc tcagtttgtc ttctgtttgc gactctgaaa 60

ga atg ctg tgg gca ctc ttt ttc ctg gtg act act att cac gct gaa 107
 Met Leu Trp Ala Leu Phe Phe Leu Val Thr Thr Ile His Ala Glu
 1 5 10 15

ctc tgc cgt cca gat gca gaa aat gcc ttt aaa gta aga ctt agc atc 155
 Leu Cys Arg Pro Asp Ala Glu Asn Ala Phe Lys Val Arg Leu Ser Ile
 20 25 30

aaa gca gct ctt gga gat aaa gcg tat gtc tgg gac aca gat gaa gaa 203
 Lys Ala Ala Leu Gly Asp Lys Ala Tyr Val Trp Asp Thr Asp Glu Glu
 35 40 45

tat ctc ttc aga gca atg gtg gca ttc tcc atg aga aaa gtt ccc aac 251
 Tyr Leu Phe Arg Ala Met Val Ala Phe Ser Met Arg Lys Val Pro Asn
 50 55 60

aga gaa gga aca gaa att tcc cac gtc ctg ctt tgc aat gta acc cag 299
 Arg Glu Gly Thr Glu Ile Ser His Val Leu Leu Cys Asn Val Thr Gln
 65 70 75

aga gtg tca ttc tgg ttt gtg gtc aca gac cct ttg aaa aac cat act 347
 Arg Val Ser Phe Trp Phe Val Val Thr Asp Pro Leu Lys Asn His Thr
 80 85 90 95

ctt cct gca gct gaa gta cag tca gcc ata aga atg aac agg aac cgg 395
 Leu Pro Ala Ala Glu Val Gln Ser Ala Ile Arg Met Asn Arg Asn Arg
 100 105 110

atc aac agt gca ttc ttt ttg gat gat cat act ctg gaa ttt tta aaa 443
 Ile Asn Ser Ala Phe Phe Leu Asp Asp His Thr Leu Glu Phe Leu Lys
 115 120 125

att cct tcc act ctt gct ccc ccg atg gat cca tct gtg ccc gtc tgg 491
 Ile Pro Ser Thr Leu Ala Pro Pro Met Asp Pro Ser Val Pro Val Trp
 130 135 140

att att gta ttt ggt gtg ata ttt tgc att gtt aca gtt gca att gca 539
 Ile Ile Val Phe Gly Val Ile Phe Cys Ile Val Thr Val Ala Ile Ala
 145 150 155

cta ctg gtt tta tcc gga atc cgg caa cga aga agg aac aag aaa gga 587
 Leu Leu Val Leu Ser Gly Ile Arg Gln Arg Arg Asn Lys Lys Gly
 160 165 170 175

cca cct gga gtg gag gat gca gaa gac aag tgt gaa aac atc atc aca 635
 Pro Pro Gly Val Glu Asp Ala Glu Asp Lys Cys Glu Asn Ile Ile Thr
 180 185 190

att gaa aat ggc atc cct tgt gat ccc ttg gac atg aag gga ggg cac 683
 Ile Glu Asn Gly Ile Pro Cys Asp Pro Leu Asp Met Lys Gly Gly His
 195 200 205

att aat gat ggc ttc ttg aca gag gat gag cgt ctc acc cct ctc tga 731
 Ile Asn Asp Gly Phe Leu Thr Glu Asp Glu Arg Leu Thr Pro Leu
 210 215 220

gagttacagt cttgtaagaa aatttcaaga tgcttgaatg tgatagaca 780

ES 2 621 298 T3

< 211 > 222
 < 212 > PRT
 < 213 > Rattus norvegicus

5
 < 400 > 9

10 Met Leu Trp Ala Leu Phe Phe Leu Val Thr Thr Ile His Ala Glu Leu
 1 5 10 15

15 Cys Arg Pro Asp Ala Glu Asn Ala Phe Lys Val Arg Leu Ser Ile Lys
 20 25 30

20 Ala Ala Leu Gly Asp Lys Ala Tyr Val Trp Asp Thr Asp Glu Glu Tyr
 35 40 45

25 Leu Phe Arg Ala Met Val Ala Phe Ser Met Arg Lys Val Pro Asn Arg
 50 55 60

30 Glu Gly Thr Glu Ile Ser His Val Leu Leu Cys Asn Val Thr Gln Arg
 65 70 75 80

35 Val Ser Phe Trp Phe Val Val Thr Asp Pro Leu Lys Asn His Thr Leu
 85 90 95

40 Pro Ala Ala Glu Val Gln Ser Ala Ile Arg Met Asn Arg Asn Arg Ile
 100 105 110

45 Asn Ser Ala Phe Phe Leu Asp Asp His Thr Leu Glu Phe Leu Lys Ile
 115 120 125

50 Pro Ser Thr Leu Ala Pro Pro Met Asp Pro Ser Val Pro Val Trp Ile
 130 135 140

55 Ile Val Phe Gly Val Ile Phe Cys Ile Val Thr Val Ala Ile Ala Leu
 145 150 155 160

60 Leu Val Leu Ser Gly Ile Arg Gln Arg Arg Arg Asn Lys Lys Gly Pro
 165 170 175

65 Pro Gly Val Glu Asp Ala Glu Asp Lys Cys Glu Asn Ile Ile Thr Ile
 180 185 190

Glu Asn Gly Ile Pro Cys Asp Pro Leu Asp Met Lys Gly Gly His Ile
 195 200 205

Asn Asp Gly Phe Leu Thr Glu Asp Glu Arg Leu Thr Pro Leu
 210 215 220

< 210 > 10
 < 211 > 1116

ES 2 621 298 T3

< 212 > DNA
 < 213 > Plasmodium falciparum

< 220 >
 < 221 > CDS
 < 222 > (1)..(1116)

< 400 > 10

10	atg cat ata gtg agc ttt att att ttt ttc ttt gca tta ttt ttt cca	48
	Met His Ile Val Ser Phe Ile Ile Phe Phe Phe Ala Leu Phe Phe Pro	
	1 5 10 15	
15	att tcc atc tgt tat aaa ata aat ggg gta tgt gat ttt tcg agc gaa	96
	Ile Ser Ile Cys Tyr Lys Ile Asn Gly Val Cys Asp Phe Ser Ser Glu	
	20 25 30	
20	ggg cta agt ttg ttg cca gaa gaa aag tta gat ttt tct gta tca agg	144
	Gly Leu Ser Leu Leu Pro Glu Glu Lys Leu Asp Phe Ser Val Ser Arg	
	35 40 45	
25	aat gta gat aaa tta tct gat gaa aac aat gta aga cat tgt gta cat	192
	Asn Val Asp Lys Leu Ser Asp Glu Asn Asn Val Arg His Cys Val His	
	50 55 60	
30	ttt agt aag ggt ttt gaa tat tta cgt ttt ata tgt cca atg aga aaa	240
	Phe Ser Lys Gly Phe Glu Tyr Leu Arg Phe Ile Cys Pro Met Arg Lys	
	65 70 75 80	
35	gat aat tat gaa gga att gaa att cgt cct gtt gaa tgt ttt gaa tat	288
	Asp Asn Tyr Glu Gly Ile Glu Ile Arg Pro Val Glu Cys Phe Glu Tyr	
	85 90 95	
40	att cat att gaa gga aga gaa cac aaa tta agc gag ata tta aaa ggt	336
	Ile His Ile Glu Gly Arg Glu His Lys Leu Ser Glu Ile Leu Lys Gly	
	100 105 110	
45	agt tta tat gaa aaa agt ata aat gat aat ata atg acg aga gat gtt	384
	Ser Leu Tyr Glu Lys Ser Ile Asn Asp Asn Ile Met Thr Arg Asp Val	
	115 120 125	
50	ttt att cct cca act att tat gaa gat atg ttt ttt gaa tgt aca tgt	432

45

50

55

60

65

ES 2 621 298 T3

Phe	Ile	Pro	Pro	Thr	Ile	Tyr	Glu	Asp	Met	Phe	Phe	Glu	Cys	Thr	Cys		
	130					135					140						
gat	aat	agt	tta	acc	ttt	aaa	aat	aat	atg	att	ggt	ata	aga	ggt	ata		480
Asp	Asn	Ser	Leu	Thr	Phe	Lys	Asn	Asn	Met	Ile	Gly	Ile	Arg	Gly	Ile		
145					150					155					160		
atg	aaa	atc	cat	tta	aaa	aaa	aat	att	tta	tat	gga	tgt	gat	ttt	gat		528
Met	Lys	Ile	His	Leu	Lys	Lys	Asn	Ile	Leu	Tyr	Gly	Cys	Asp	Phe	Asp		
				165					170					175			
cat	gat	gaa	aaa	tta	atg	aaa	aat	aaa	aca	gca	ttt	aca	aat	ttt	tat		576
His	Asp	Glu	Lys	Leu	Met	Lys	Asn	Lys	Thr	Ala	Phe	Thr	Asn	Phe	Tyr		
			180					185					190				
gat	aaa	caa	aaa	att	tta	cca	tta	ata	ggt	aat	aat	aat	aat	gat	gat		624
Asp	Lys	Gln	Lys	Ile	Leu	Pro	Leu	Ile	Gly	Asn	Asn	Asn	Asn	Asp	Asp		
		195					200						205				
gat	aat	aat	gat	gat	gat	aat	aat	aat	gat	aat	aat	aat	aat	gat	aat		672
Asp	Asn	Asn	Asp	Asp	Asp	Asn	Asn	Asn	Asp	Asn	Asn	Asn	Asn	Asp	Asn		
	210					215						220					
aat		720															
Asn																	
225					230						235				240		
aat	aat	att	act	tgt	aat	gtt	act	att	aaa	aaa	tct	caa	gtt	tat	tta		768
Asn	Asn	Ile	Thr	Cys	Asn	Val	Thr	Ile	Lys	Lys	Ser	Gln	Val	Tyr	Leu		
			245						250					255			
gga	att	ata	tgc	cca	gat	gga	tat	act	tta	tat	cca	aat	gat	tgt	ttt		816
Gly	Ile	Ile	Cys	Pro	Asp	Gly	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Pro	Asn	Asp	Cys	Phe		
			260					265					270				
aaa	aat	gtt	ata	tat	gat	aat	aat	att	att	ata	cca	tta	aaa	aaa	att		864
Lys	Asn	Val	Ile	Tyr	Asp	Asn	Asn	Ile	Ile	Ile	Pro	Leu	Lys	Lys	Ile		
		275					280					285					
ata	cca	cat	gat	att	tta	tat	cat	caa	gac	aaa	aac	aaa	aga	att	act		912
Ile	Pro	His	Asp	Ile	Leu	Tyr	His	Gln	Asp	Lys	Asn	Lys	Arg	Ile	Thr		
	290					295						300					
ttt	gct	tca	ttt	aca	tta	aat	ata	aat	gaa	aat	cca	cca	gga	ttc	aca		960
Phe	Ala	Ser	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	Asn	Glu	Asn	Pro	Pro	Gly	Phe	Thr		
305					310					315					320		
tgt	tat	tgt	att	aaa	gat	caa	aca	aat	att	aat	aac	cca	ctt	atc	gta		1008
Cys	Tyr	Cys	Ile	Lys	Asp	Gln	Thr	Asn	Ile	Asn	Asn	Pro	Leu	Ile	Val		
				325					330					335			
aac	ttc	cat	ttt	tca	aat	caa	gaa	aca	tca	tat	gca	aca	aaa	aat	aaa		1056
Asn	Phe	His	Phe	Ser	Asn	Gln	Glu	Thr	Ser	Tyr	Ala	Thr	Lys	Asn	Lys		
			340					345					350				
aat	ctc	ttc	ttt	tat	ttt	att	ttc	atc	ttc	cct	ttt	ctt	tat	gtt	att		1104
Asn	Leu	Phe	Phe	Tyr	Phe	Ile	Phe	Ile	Phe	Pro	Phe	Leu	Tyr	Val	Ile		
		355					360					365					
ttg	tta	tta	taa														1116
Leu	Leu	Leu															
		370															

< 210 > 11

< 211 > 371

< 212 > PRT

5 < 213 > Plasmodium falciparum

< 400 > 11

10

15

ES 2 621 298 T3

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

Ile Ser Ile Cys Tyr Lys Ile Asn Gly Val Cys Asp Phe Ser Ser Glu
20 25 30

Gly Leu Ser Leu Leu Pro Glu Glu Lys Leu Asp Phe Ser Val Ser Arg
35 40 45

Asn Val Asp Lys Leu Ser Asp Glu Asn Asn Val Arg His Cys Val His
50 55 60

Phe Ser Lys Gly Phe Glu Tyr Leu Arg Phe Ile Cys Pro Met Arg Lys
65 70 75 80

Asp Asn Tyr Glu Gly Ile Glu Ile Arg Pro Val Glu Cys Phe Glu Tyr
85 90 95

Ile His Ile Glu Gly Arg Glu His Lys Leu Ser Glu Ile Leu Lys Gly
100 105 110

Ser Leu Tyr Glu Lys Ser Ile Asn Asp Asn Ile Met Thr Arg Asp Val
115 120 125

Phe Ile Pro Pro Thr Ile Tyr Glu Asp Met Phe Phe Glu Cys Thr Cys
130 135 140

Asp Asn Ser Leu Thr Phe Lys Asn Asn Met Ile Gly Ile Arg Gly Ile
145 150 155 160

Met Lys Ile His Leu Lys Lys Asn Ile Leu Tyr Gly Cys Asp Phe Asp
165 170 175

His Asp Glu Lys Leu Met Lys Asn Lys Thr Ala Phe Thr Asn Phe Tyr
180 185 190

Asp Lys Gln Lys Ile Leu Pro Leu Ile Gly Asn Asn Asn Asn Asp Asp
195 200 205

Asp Asn Asn Asp Asp Asp Asn Asn Asn Asp Asn Asn Asn Asn Asp Asn
210 215 220

Asn
225 230 235 240

ES 2 621 298 T3

5 Asn Asn Ile Thr Cys Asn Val Thr Ile Lys Lys Ser Gln Val Tyr Leu
 245 250 255
 Gly Ile Ile Cys Pro Asp Gly Tyr Thr Leu Tyr Pro Asn Asp Cys Phe
 260 265 270
 10 Lys Asn Val Ile Tyr Asp Asn Asn Ile Ile Ile Pro Leu Lys Lys Ile
 275 280 285
 15 Ile Pro His Asp Ile Leu Tyr His Gln Asp Lys Asn Lys Arg Ile Thr
 290 295 300
 20 Phe Ala Ser Phe Thr Leu Asn Ile Asn Glu Asn Pro Pro Gly Phe Thr
 305 310 315 320
 25 Cys Tyr Cys Ile Lys Asp Gln Thr Asn Ile Asn Asn Pro Leu Ile Val
 325 330 335
 30 Asn Phe His Phe Ser Asn Gln Glu Thr Ser Tyr Ala Thr Lys Asn Lys
 340 345 350
 35 Asn Leu Phe Phe Tyr Phe Ile Phe Ile Phe Pro Phe Leu Tyr Val Ile
 355 360 365
 40 Leu Leu Leu
 370
 < 210 > 12
 < 211 > 73
 < 212 > PRT
 < 213 > *Cricetulus migratorius*
 45 < 400 > 12
 Gln Arg Val Asp His His Phe Asn Glu Pro Val Thr Ile Ala Ile Ile
 1 5 10 15
 50 Leu Gly Met Ile Ala Gly Ile Val Gly Thr Ile Leu Leu Ile Tyr Tyr
 20 25 30
 55 Leu Ile Ser Leu Ile Thr Lys Lys Ile Ser Ala Asp Lys Gln Pro Pro
 35 40 45
 60 Lys Ser Glu Asn Thr Asp Glu Pro Pro Ser Pro Ile Glu Gln Ile Ile
 50 55 60
 65 Val Gln Glu Glu His Asp Ser Ile Val
 65 70

ES 2 621 298 T3

< 210 > 13
 < 211 > 405
 < 212 > DNA
 5 < 213 > Secuencia Artificial

 < 220 >
 < 223 > Vector de expresión

 10 < 400 > 13

 gccgccacta tgaagttcct ggtgaatgtg gccttggtgt tcatgggtgg gtacatcagc 60
 15 ttcatctacg ctagccttaa gggtagcgag ctcgatcca ctagtgaatt cgatatctct 120
 agagcggccg ctgactacaa agacgatgac gacaagcttt caccaattca acacgatttt 180
 20 cctgcactag tgatgatact cataattttg ggcgtgatgg cagggattat cggaactatc 240
 cttcttatct cttactgtat cagccgaatg acaaagaaaa gttcagttga catccaatct 300
 cctgaggggtg gtgacaacag tgtgcctttg agttctattg agcagactcc taatgaagag 360
 25 tcctccaatg ttagcggcgg ccatcaccat caccatcact gataa 405

 < 210 > 14
 30 < 211 > 411
 < 212 > DNA
 < 213 > Secuencia Artificial

 < 220 >
 35 < 223 > Vector de expresión

 < 400 > 14

 40 gccgccacta tgaagttcct ggtgaatgtg gccttggtgt tcatgggtgg gtacatcagc 60
 ttcatctacg ctagccttaa gggtagcgag ctcgatcca ctagtgaatt cgatatctct 120
 45 agagcggccg ctgactacaa agacgatgac gacaagcttc aaagagttga tcaccatttt 180
 aatgagccag tgactatagc cattattttg ggcatgatcg ctggtatcgt tggaactatc 240
 cttctcattt attacttaat cagcctaata acaaagaaaa tttcagctga caaacaacct 300
 50 cccaagagtg aaaacacgga tgagccacca agtcctattg aacagattat tgttcaagaa 360
 gagcatgaca gcattgtag cggcggccat caccatcacc atcactgata a 411

 55 < 210 > 15
 < 211 > 405
 < 212 > DNA
 < 213 > Secuencia Artificial
 60 < 220 >
 < 223 > Vector de expresión

 < 400 > 15
 65

ES 2 621 298 T3

	gccgccacta tgaagttcct ggtgaatgtg gccttgggtg tcatgggtggt gtacatcagc	60
5	ttcatctacg ctagccttaa ggtaccgag ctccgatcca ctagtgaatt cgatatcgac	120
	gtcgcggccg ctgactacaa agacgatgac gacaagagcc ctagggccgc acacgatttt	180
10	cctgcactag tgatgatact cataattttg ggcgtgatgg cagggattat cggaactatc	240
	cttcttatct cttactgtat cagccgaatg acaaagaaaa gttcagttga catccaatct	300
15	cctgaggggtg gtgacaacag tgtgcctttg agttctattg agcagactcc taatgaagag	360
	tcctccaatg ttagcggcgg ccatcaccaat caccatcact gataa	405

REIVINDICACIONES

- 1.- Un vector de expresión de ácido nucleico, para la expresión de la superficie celular de proteínas, el cual comprende, en orden, una secuencia polinucleotídica, la cual codifica a un péptido señal de secreción de la melitina del veneno de la abeja, un sitio de clonación para insertar una secuencia polinucleotídica, la cual codifica a una proteína a ser expresada, y una secuencia polinucleotídica, la cual comprende una secuencia que codifica a un dominio transmembranario de la glicoforina A.
- 2.- El vector de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde, el dominio transmembranario de glicoforina A, es el dominio transmembranario de la glicoforina A del ratón, o el dominio transmembranario de la glicoforina A, del hámster armenio.
- 3.- El vector de ácido nucleico de la reivindicación 2, en donde, el dominio transmembranario de la glicoforina A del ratón, comprende los aminoácidos los cuales se dan a conocer encuentra en la Seq. Id. No. 1, y el dominio de la glicoforina A del Hámster Armenio, comprende la secuencia de aminoácidos la cual se da a conocer en la Seq. Id. No. 12.
- 4.- El vector de ácido nucleico de las reivindicaciones 1 – 3, en donde, el péptido señal de secreción de la melitina del veneno de abejas, comprende la secuencia de aminoácidos la cual se da a conocer en la Seq. Id. No. 2.
- 5.- El vector de ácido nucleico de las reivindicaciones 1 – 4, el cual comprende, de una forma adicional, aguas abajo (3') del sitio de clonación para insertar una secuencia polinucleotídica, la cual codifica a una proteína a ser expresada, una secuencia polinucleotídica, la cual codifica a un marcador FAG, el cual comprende la secuencia de aminoácidos de la Seq. Id. No. 3.
- 6.- El vector de ácido nucleico de las reivindicaciones 1 – 5, el cual comprende, de una forma adicional, aguas abajo (3') de la secuencia polinucleotídica, la cual codifica el dominio transmembranario de la glicoforina, una secuencia polinucleotídica, la cual codifica un marcador His, de una forma preferible, un marcador His, el cual comprende la secuencia de aminoácidos, la cual se da a conocer en la Seq. Id. No. 4.
- 7.- El vector de ácido nucleico de las reivindicaciones 1 – 6, en donde, el sitio de clonación, comprende los sitios de segmentación de enzimas de restricción de NheI, KpnI, BamHI, EcoRI, EcoRV y NotI.
- 8.- El vector de ácido nucleico de las reivindicaciones 1 – 7, el cual comprende una secuencia polinucleotídica, la cual se selecciona de entre grupo consistente en las Seq. Id. No. 5, Seq. Id. No. 13, Seq. Id. No. 14 , y Seq. Id. No. 15.
- 9.- El vector de ácido nucleico de las reivindicaciones 1 – 8, en donde, la proteína a ser expresada, es una proteína asociada a membrana.
- 10.- Una célula, la cual comprende el vector de las reivindicaciones 1 a 9, comprendiendo, de una forma preferible, una célula de mamífero y, de una forma más preferible, una célula HEK.
- 11.- Uso, in vitro, de una célula de la reivindicación 10, para la expresión de proteínas apropiadas para la generación de anticuerpos.
- 12.- Uso de una célula de la reivindicación 10, para la inmunización, no terapéutica, de un animal no humano, para la generación de anticuerpos, de una forma preferible, para la generación de anticuerpos monoclonales.
- 13.- Un procedimiento no terapéutico, para la generación de anticuerpos monoclonales, contra una proteína específica, el cual comprende las etapas de:
- a) la inmunización de un animal no humano, mediante células que expresan, en sus superficies celulares, la proteína específica, mediante la utilización del vector de las reivindicaciones 1 a 9.
 - b) el aislamiento de células esplénicas de los animales no humanos de la etapa a),
 - c) la fusión de las células esplénicas de la etapa b), con células de mieloma, para generar hibridomas de linfocitos B, y
 - d) la identificación de hibridomas de linfocitos B, que expresen anticuerpos dirigidos contra la proteína específica.
- 14.- El procedimiento de la reivindicación 13, en donde, el animal no humano, es un ratón o un hámster.

Fig. 1A

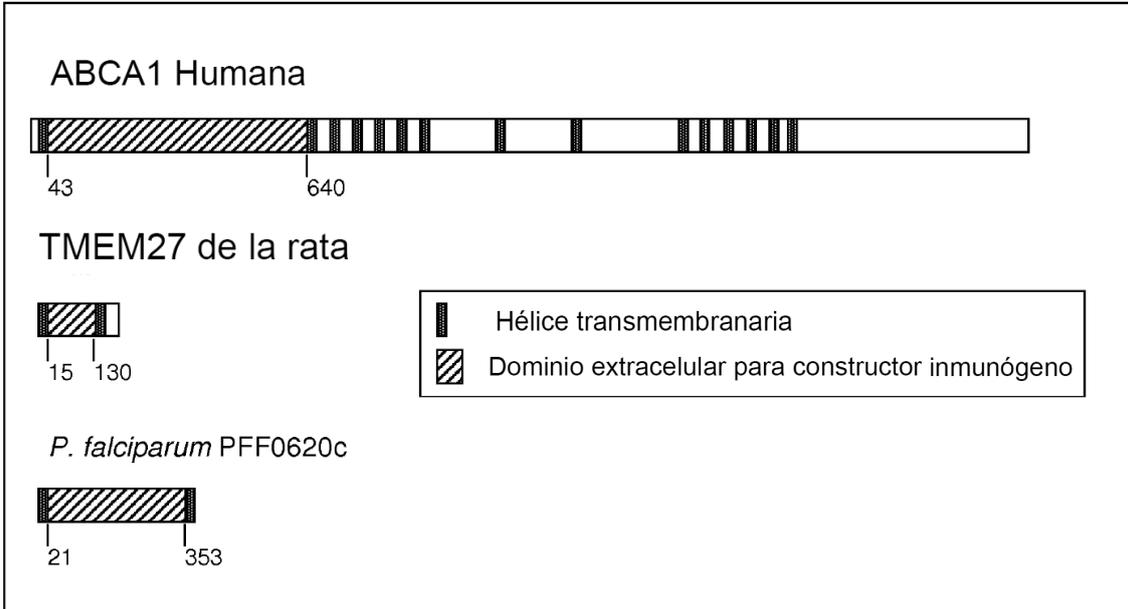


Fig. 1B

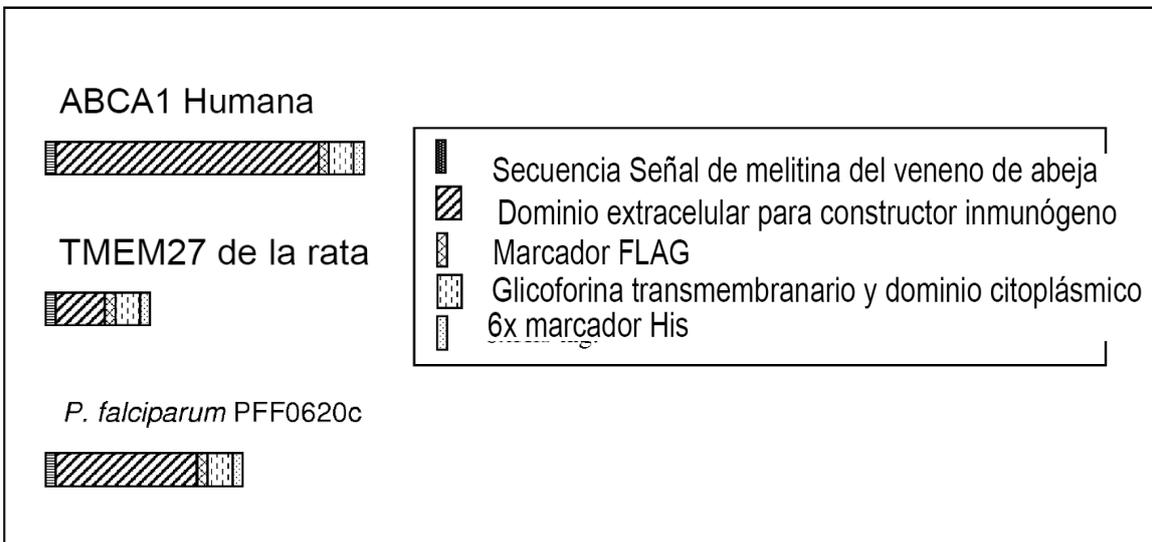


Fig. 2

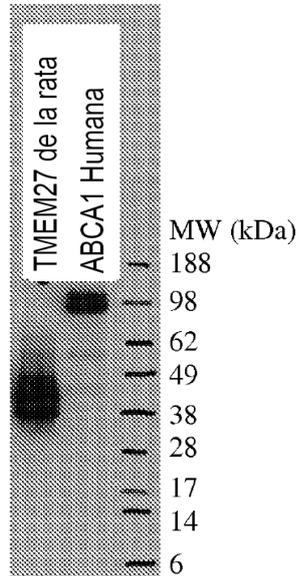


Fig. 3A

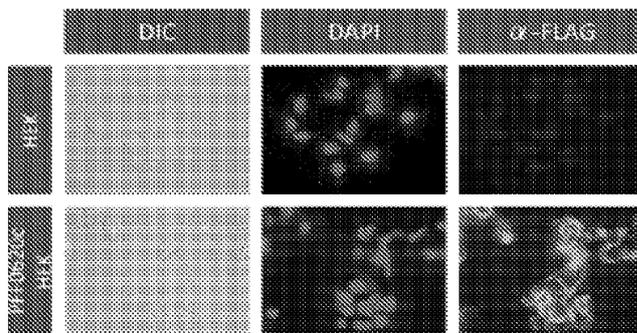


Fig. 3B

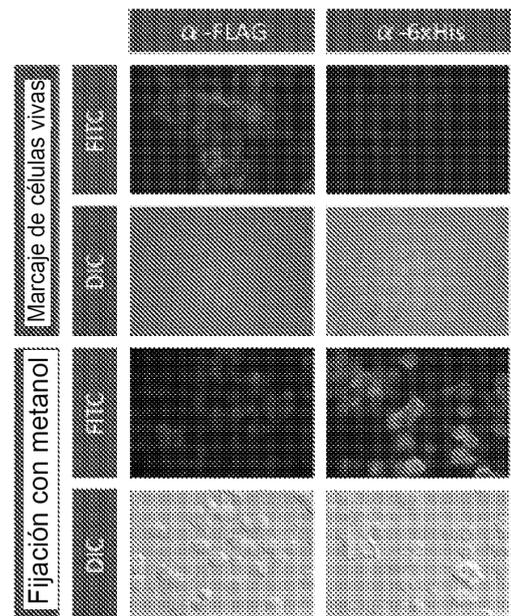


Fig. 4

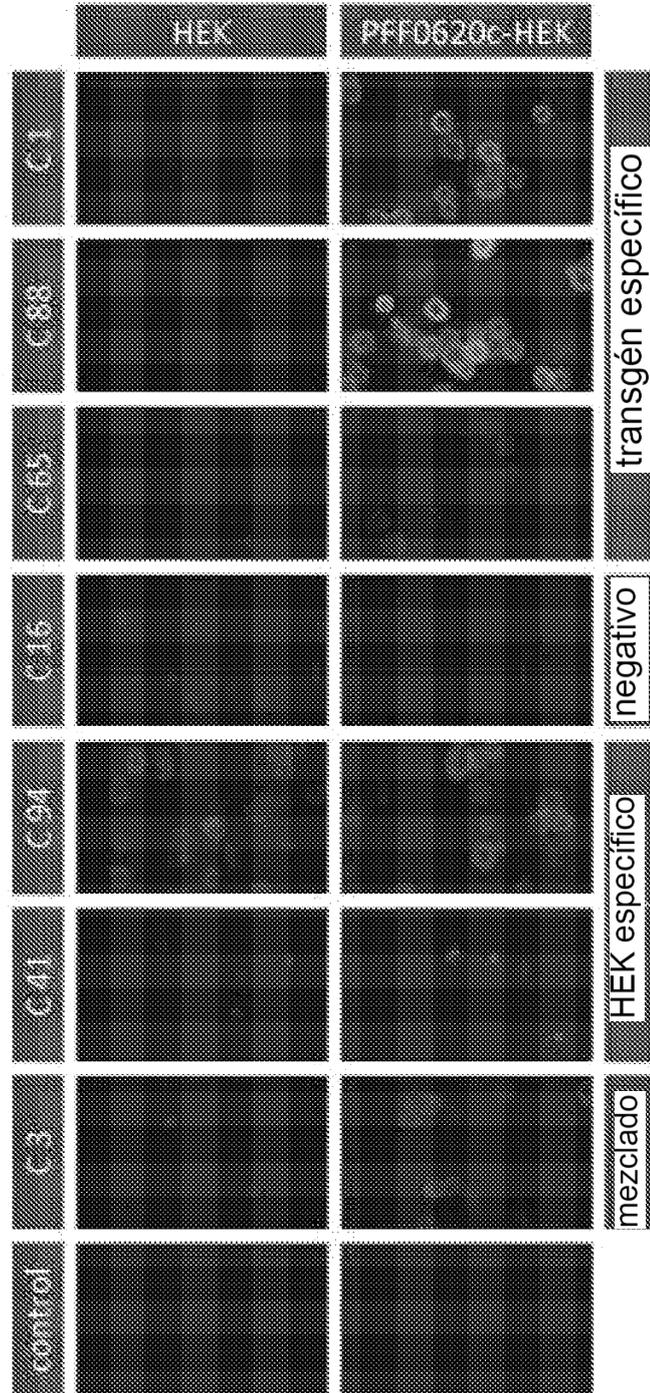


Fig. 5

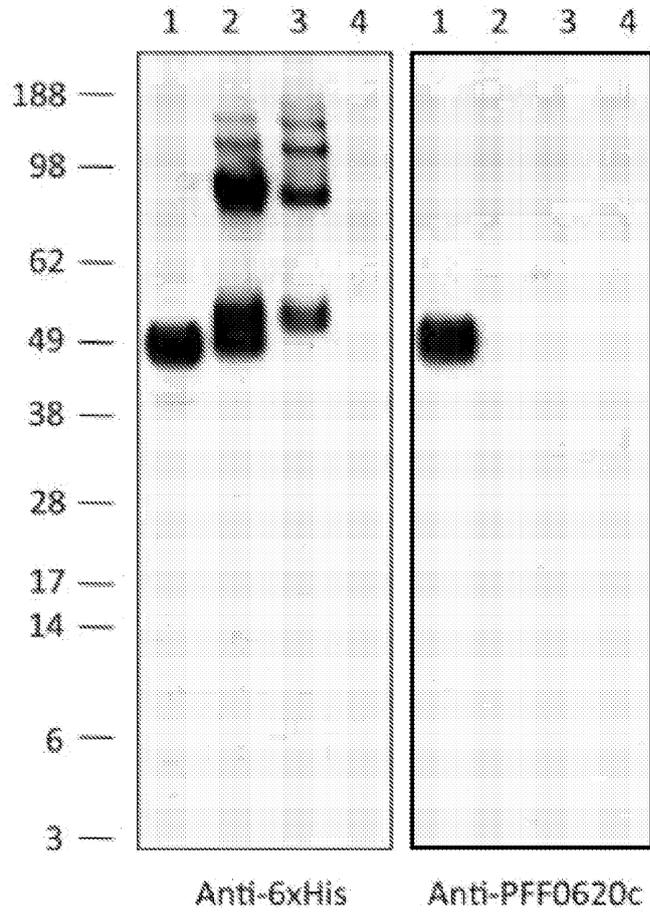


Fig. 6

