

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 623**

51 Int. Cl.:

C07K 14/755 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2004** **E 14162830 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017** **EP 2808341**

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

30 Prioridad:

27.06.2003 US 483505 P

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

28.09.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 634 623 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

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

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al campo general de producción de proteínas recombinantes en una célula huésped de mamífero. Específicamente, la presente invención se refiere a la producción potenciada de una proteína de Factor VIII recombinante coexpresando al menos una proteína chaperona de calnexina en la célula huésped de mamífero.

Antecedentes de la invención

- 10 En células tanto procarióticas como eucariotas, las proteínas chaperonas moleculares catalizan intercambio de enlaces disulfuro y ayudan al plegamiento apropiado de proteínas de nueva síntesis. Esta observación ha conducido a un gran número de estudios y usos propuestos para estas proteínas de control de calidad. Por ejemplo, el aumento de la actividad de pDI (proteína disulfuro isomerasa) en sistemas de expresión celular bacterianos, de levadura y de insectos puede tener efectos beneficiosos en la solubilidad y el plegamiento de proteínas y, en algunos casos, puede conducir a un aumento de la secreción de proteínas heterólogas (1-7). Además, otros estudios han mostrado que las chaperonas moleculares proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina (BiP, también denominada proteína regulada por glucosa) y proteína de choque térmico humana 70 (Hsp 70) tienen un efecto beneficioso en una expresión de proteína recombinante en sistemas celulares de insectos (5, 8-12).

- 20 Las chaperonas moleculares no han tenido el mismo nivel de éxito en la expresión y secreción de proteínas recombinantes en sistemas celulares de mamífero. Por ejemplo, la sobreexpresión de la chaperona pDI en células de ovario de hámster Chino (CHO) no solamente no tuvo ningún efecto en los niveles de secreción de IL-15, sino que también provocó una reducción de la secreción, y un aumento en la retención celular de una proteína de fusión de receptor de factor de necrosis tumoral-Fc (TNFR:Fc) (13). Otros estudios han mostrado que la sobreexpresión de la chaperona BiP en células de mamífero puede conducir a un aumento de la retención celular y reducción de la secreción de proteínas recombinantes (14-15 y Patente de Estados Unidos n.º 4.912.040). Los mecanismos reguladores implicados en el procesamiento de proteínas dentro de la célula de mamífero son complejos, y probablemente implican la cooperación de muchas de estas proteínas chaperonas. Por lo tanto, se puede predecir si una chaperona particular conducirá a un aumento en la producción de una cierta proteína recombinante.

- 30 Debido a la enseñanza contradictoria en el campo, el efecto de las proteínas chaperonas en la producción de un producto proteico recombinante secretado no se entiende ni se aprecia. La Patente de Estados Unidos n.º 6.451.597 (la patente 597) describe un procedimiento para potenciar la producción de partículas víricas, y especula sobre el efecto de las chaperonas en la mejora del rendimiento de una proteína recombinante en células eucariotas. Sin embargo, no se desvela ninguna expresión real de una proteína recombinante. Sin embargo, otros estudios han descubierto que la sobreexpresión de chaperonas en líneas celulares eucariotas no tuvo ningún efecto en los rendimientos de producto o tuvo secreción reducida de proteínas recombinantes (14, 15). Véase también Patente de Estados Unidos n.º 4.912.040. A la luz de las enseñanzas contradictorias en el campo, la patente 597 no permite que un experto en la materia use chaperonas para mejorar la producción y secreción de una proteína recombinante en células eucariotas. El estado de la técnica no enseña a predecir qué efecto tendrá una chaperona particular en la producción y secreción de una proteína recombinante dada en modelos de cultivo celular tales como los descritos en el presente documento. Los solicitantes se sorprendieron por tanto al encontrar que cuando las chaperonas descritas en este estudio se transfectaron en líneas celulares de mamífero que expresaban una proteína recombinante, secretada, el efecto resultante fue un aumento general de la producción de la proteína secretada.

Sumario de la invención

- 45 En un aspecto de la invención, se proporciona una célula huésped de mamífero para expresión potenciada de un producto proteico de Factor VIII recombinante, teniendo dicha célula de mamífero material genético que codifica la expresión de dicha proteína de Factor VIII recombinante y transformada con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica proteína chaperona calnexina.

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

- 50 En otra realización de la invención, el material genético que codifica la expresión de dicho producto proteico recombinante se integra en el ADN de células huésped.

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

- 55 En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para producir una célula huésped de mamífero de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende proporcionar una célula de mamífero que tiene material genético que codifica la expresión de una proteína recombinante diana o fragmento de la misma; y

transformar la célula de mamífero con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica la proteína chaperona calnexina.

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

5 En otra realización de este aspecto de la invención, el material genético que codifica la expresión de dicho producto proteico recombinante se integra en el ADN de células huésped.

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

10 En un tercer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para producir un producto proteico recombinante secretado, comprendiendo el procedimiento las etapas de: cultivar una célula huésped de mamífero de la reivindicación 1, y recuperar del medio de cultivo el producto proteico recombinante producido y secretado de este modo.

En otra realización de la invención, el material genético que codifica la expresión de dicho producto proteico recombinante se integra en el ADN de células huésped.

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

En un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para potenciar el rendimiento de una proteína recombinante, comprendiendo el procedimiento las etapas como se definen en la reivindicación 11.

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

20 En otra realización del cuarto aspecto de la invención, el material genético que codifica la expresión de dicho producto proteico recombinante se integra en el ADN de la primera línea celular.

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

25 En otra realización de este aspecto de la invención, se produce al menos una segunda línea celular a partir de dicha primera línea celular seleccionando una parte de dicha primera línea celular que muestra integración del vector de expresión de proteína chaperona en ADN huésped.

Breve descripción de los dibujos

La invención se entenderá mejor a partir de una consideración de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones, tomadas junto con los dibujos, en los que:

30 La Figura **1** representa las secuencias de cebadores de RT-PCR usados para amplificar ADNc de chaperonas ER de una biblioteca de ADNc humano. El subrayado indica un sitio de restricción EcoRI (cebador 5') o XbaI (cebador 3') integrado. CNX: calnexina; CRT: calreticulina;

La Figura **2A** representa las secuencias de nucleótidos y aminoácidos completas de calnexina clonada por RT-PCR. Los sitios EcoRI 5' y XbaI 3' dentro de los cebadores están subrayados. El codón de inicio y el codón de terminación se muestran en texto en negrita;

35 La Figura **2B** representa las secuencias de nucleótidos y aminoácidos completas de calreticulina clonada por RT-PCR. Los sitios EcoRI 5' y XbaI 3' están subrayados. El codón de inicio y el codón de terminación se muestran en texto en negrita;

40 La Figura **2C** representa las secuencias de nucleótidos y aminoácidos completas de Erp57 clonado por RT-PCR. Los sitios EcoRI 5' y XbaI 3' están subrayados. El codón de inicio y el codón de terminación se muestran en texto en negrita;

La Figura **2D** representa las secuencias de nucleótidos y aminoácidos completas de la región codificante del gen de Hsp70 humano;

La Figura **2E** representa las secuencias de nucleótidos y aminoácidos completas de la región codificante del gen de Hsp40 humano. El codón de inicio se muestra en texto en negrita y subrayado;

45 La Figura **2F** representa las secuencias de nucleótidos y aminoácidos completas de la región codificante del gen de la glutamina sintetasa. El codón de inicio se muestra en texto en negrita y subrayado;

La Figura **3** es una ilustración de la sobreexpresión de bikunina en clones supertransfectados con calnexina (X4.14:5, X4/14:30), Hsp70 (7-3) o Erp57 (X4/19:62). La velocidad de producción de Bikunina específica para todas las líneas celulares se expresa como pg de Bikunina/células/día (SPR). Cada día se recogieron células y

se transfirieron a medio nuevo y se incubaron durante 24 horas a 37 °C en matraces de agitación. Al día siguiente, las células se recogieron de nuevo, se recontaron y se resuspendieron en medio nuevo del mismo volumen y se incubaron de forma similar durante otras 24 horas. Se realizaron mediciones de la actividad de bikunina (pg/célula/día) en muestras del medio gastado. El mismo procedimiento se repitió cada día hasta que comenzó a reducirse el número y la viabilidad de las células. La línea celular de control (CF9-20) expresa bikunina pero no expresa ninguna de las proteínas chaperonas;

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

La Figura 5 representa la secuencia de aminoácidos de bikunina.

Descripción detallada de la invención

En una realización de la invención, se proporciona una célula huésped de mamífero para expresión potenciada de un producto proteico de Factor VIII recombinante, en el que dicha célula de mamífero comprende material genético que codifica la expresión de dicho producto proteico recombinante y se transforma adicionalmente con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica proteína chaperona calnexina.

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

La expresión “célula huésped de mamífero” se usa para hacer referencia a una célula de mamífero que se ha transfectado, o es capaz de transfectarse con una secuencia de ácido nucleico y después de expresar un gen seleccionado de interés. La expresión incluye la descendencia de la célula parental, tanto si la descendencia es idéntica en morfología o en composición genética al parental original, como si no, siempre que esté presente el gen seleccionado.

Las células de mamífero adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de cría de hámster (BHK), células HeLa humanas, célula COS-1 de mono, células 293 de riñón embrionario humano, NSO de mieloma de ratón y células HKB humanas (Patente de Estados Unidos n.º 6.136.599). Las otras líneas celulares están fácilmente disponibles de la ATCC.

El término “transfección” se usa para hacer referencia a la captación de ADN ajeno o exógeno por una célula, y una célula se ha “transfectado” cuando el ADN exógeno se ha introducido dentro de la membrana celular. Se conocen bien en este campo varias técnicas de transfección y se desvelan en el presente documento. Véase, por ejemplo, Graham y col., 1973, Virology 52: 456; Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davis y col., Basic Methods in Molecular Biology (Elsevier, 1986); y Chu y col., 1981, Gene 13: 197. Dichas técnicas pueden usarse para introducir uno o más restos de ADN exógeno en células huésped adecuadas.

Las técnicas adecuadas para transfección para uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, transfección mediada por fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano y electroporación. También puede usarse transfección de lípidos catiónicos usando reactivos disponibles en el mercado, incluyendo el Reactivo de Transfección Boehringer Mannheim (N-> 1-(2,3-dioleoiloxi)propil-N,N,N-trimetilamonioetilsulfato, Boehringer Mannheim, Indianápolis, Ind.) o reactivo LIPOFECTIN o LIPOFECTAMIN o DMRIE (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD).

Como se usa en el presente documento, la expresión “supertransfección” se refiere a transfectar más de un vector de expresión a una célula huésped que ya expresa un gen recombinante.

El término “transformación” como se usa en el presente documento se refiere a un cambio en las características genéticas de una célula, y una célula se ha transformado cuando se ha modificado para contener un nuevo ADN. Por ejemplo, una célula se transforma cuando se modifica genéticamente de su estado nativo. Después de la transfección, el ADN transformante puede recombinarse con el de la célula integrándose físicamente en un cromosoma de la célula, puede mantenerse de forma transitoria como un elemento episómico sin replicarse o puede replicarse independientemente como un plásmido. Se considera que una célula se ha transformado de forma estable cuando el ADN se replica con la división de la célula.

Como se usa en el presente documento la expresión “línea celular modificada” se refiere a una línea celular transformada bien de forma transitoria o bien de forma estable con una o más construcciones de ADN.

Pueden aislarse polinucleótidos, material genético, moléculas de ADN recombinante, vectores de expresión y similares, usados en la práctica de la presente invención usando procedimientos de clonación convencionales tales como los descritos en Sambrook y col. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989). Como alternativa, los polinucleótidos que codifican un producto proteico recombinante de la presente invención pueden sintetizarse usando técnicas convencionales que se conocen bien en este campo, tales como por síntesis en un sintetizador de ADN automático. Por ejemplo, usando los cebadores representados en la

Figura 1, se sintetizan secuencias de ADN que codifican la proteína calnexina mediante RT-PCR.

Como se usa en el presente documento, un “vector de expresión” se refiere a una molécula de ADN, o un clon de dicha molécula, que se ha modificado mediante la intervención humana para contener segmentos de ADN combinados y yuxtapuestos de una manera que no existiría por lo demás en la naturaleza. Pueden modificarse técnicamente construcciones de ADN para incluir un primer segmento de ADN que codifica un polipéptido de la presente invención unido operativamente con segmentos de ADN adicionales requeridos para la expresión del primer segmento de ADN. Dentro del contexto de la presente invención los segmentos de ADN adicionales incluirán, en general, promotores y terminadores de la transcripción y pueden incluir adicionalmente potenciadores y otros elementos. También pueden incluirse uno o más marcadores seleccionables. Pueden prepararse construcciones de ADN útiles para expresar segmentos de ADN clonados en una diversidad de células huéspedes procariontes y eucariotas a partir de componentes fácilmente disponibles u obtenerse de proveedores comerciales.

Las construcciones de ADN también pueden contener segmentos de ADN necesarios para dirigir la secreción de un polipéptido o una proteína de interés. Dichos segmentos de ADN pueden incluir al menos una secuencia señal secretora. Las secuencias señal secretoras, también denominadas secuencias líderes, secuencias prepro y/o secuencias pre, son secuencias de aminoácidos que actúan para dirigir la secreción de polipéptidos o proteínas maduros de una célula. Dichas secuencias se caracterizan por un núcleo de aminoácidos hidrófobos y se encuentran típicamente (pero no exclusivamente) en los extremos amino terminales de proteínas de nueva síntesis. Con mucha frecuencia el péptido secretor se escinde de la proteína madura durante la secreción. Dichos péptidos secretores contienen sitios de procesamiento que permiten la escisión del péptido secretor de la proteína madura a medida que pasa a través de la ruta secretora. Una proteína recombinante puede contener una secuencia señal secretora en su secuencia de aminoácidos original, o puede modificarse técnicamente para convertirse en una proteína secretada insertando una secuencia señal secretora modificada técnicamente en su secuencia de aminoácidos original. La elección de promotores, terminadores y señales secretoras adecuados está dentro del nivel de experiencia habitual en la técnica. La expresión de genes clonados en células de mamífero cultivadas y en *E. coli*, por ejemplo, se analiza en detalle en Sambrook y col. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989).

Como se usa en el presente documento, la expresión “producto proteico recombinante” se refiere a una proteína recombinante o fragmento de la misma expresado a partir de material genético introducido en la célula de mamífero huésped.

Después de la transfección, la célula puede mantenerse transformada de forma transitoria o transformada de forma estable con dicha construcción de ADN. La introducción de múltiples construcciones de ADN, y selección de células que contienen las múltiples construcciones de ADN, puede realizarse bien simultáneamente o, más preferentemente, de forma secuencial. La técnica para establecer una línea celular transformada de forma estable con un material genético o vector de expresión se conoce bien en este campo (Current Protocols in Molecular Biology). En general, después de la transfección, el medio de cultivo seleccionará células que contengan la construcción de ADN mediante, por ejemplo, selección farmacológica o deficiencia de un nutriente esencial, que se complementa por un marcador seleccionable en la construcción de ADN o se cotransfecta con la construcción de ADN. Las células de mamífero cultivadas se cultivan en general en medio que contiene suero o medio sin suero disponibles en el mercado. La selección de un medio apropiado para la célula huésped particular usada está dentro del nivel de la experiencia habitual en la técnica.

Los marcadores seleccionables adecuados para selección farmacológica usados en la presente invención incluyen, pero sin limitación, neomicina (G418), higromicina, puromicina, zeocina, colchicina, metotrexato y metionina sulfoximina.

Una vez que se ha establecido una población celular resistente a fármacos, pueden seleccionarse clones individuales y explorarse con respecto a clones de alta expresión. Se conocen bien en la técnica procedimientos para establecer líneas celulares clonadas, incluyendo, pero sin limitación, uso de un cilindro de clonación, o por dilución limitante. La expresión del producto recombinante de interés de cada clon puede medirse por procedimientos tales como, pero sin limitación, inmunoensayo, ensayo enzimático o ensayo cromogénico.

Después puede usarse una línea celular transformada de forma estable con una primera construcción de ADN como una célula huésped para transfección con una segunda o más construcciones de ADN, y someterse a diferentes selecciones farmacológicas.

Como se usa en el presente documento el término “bikunina” se refiere a cualquier proteína, que tenga al menos un dominio Kunitz. Se han descrito dominios de tipo Kunitz en referencias tales como Laskowski y col., 1980, Ann Rev Biochem. 49: 593-626; y Patente de Estados Unidos n.º 5.914.315 (22 de junio de 1999). En una realización preferida, el término bikunina usado en el presente documento se refiere a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 5. Se describen otras proteínas de bikunina y fragmentos de las mismas en las Solicitudes de Estados Unidos número de serie 09/144.428, 09/974.026, 09/218.913 y 09/441.966, y Solicitud de PCT número de serie US97/03894, publicada como WO 97/33996, y US99/04381, publicada como WO 00/37099.

En otra realización de la invención, la invención proporciona una célula huésped de mamífero con expresión y secreción de proteína de Factor VIII potenciada de acuerdo con la reivindicación 1, y la célula huésped de mamífero se transforma adicionalmente con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica proteína chaperona calnexina.

- 5 En una realización preferida, la proteína de Factor VIII tiene la secuencia representada en la Patente de Estados Unidos n.º 4.965.199.

En otra realización preferida más, la célula huésped de mamífero con expresión y secreción potenciada de Factor VIII es una célula BHK.

- 10 En una realización preferida, la proteína IL2SA tiene la secuencia representada en la Patente de Estados Unidos n.º 6.348.192.

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

- 15 La presente invención también proporciona un procedimiento para producir una célula huésped de mamífero para expresión potenciada de dicha proteína recombinante diana que comprende: proporcionar una célula de mamífero que tiene material genético que codifica la expresión de una proteína recombinante diana o fragmento de la misma; y transformar la célula de mamífero con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica proteína chaperona calnexina.

En una realización de la invención, el material genético que codifica expresión de dicho producto proteico recombinante se integra en el ADN de la célula huésped.

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

El producto proteico recombinante es Factor VIII y la transformación se produce con un vector de expresión que comprende ADN que codifica calnexina.

- 25 En una realización de la invención, el procedimiento para producir un producto proteico recombinante secretado comprende cultivar una célula huésped de mamífero, en el que la célula huésped de mamífero se transforma de forma estable con un material genético que codifica la expresión de dicho producto recombinante.

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

- 30 También se desvela un procedimiento para potenciar la producción de una proteína de Factor VIII recombinante en células BHK, en el que se ha introducido previamente un material genético que codifica la expresión de dicho Factor VIII recombinante en una primera línea celular BHK, que comprende las etapas de: insertar al menos un vector de expresión de proteína chaperona en dicha primera línea celular BHK para formar una línea celular BHK modificada; y seleccionar de dicha línea celular BHK modificada al menos una segunda célula que muestra rendimiento
35 potenciado de la proteína de Factor VIII recombinante.

También se desvela un procedimiento para potenciar el rendimiento de Factor VIII recombinante en una línea celular BHK que comprende introducir un material genético para dicho Factor VIII en una línea celular BHK, en el que la línea celular BHK muestra expresión de proteína chaperona potenciada.

- 40 Se pretende que los siguientes ejemplos sean solamente para fines de ilustración, y no deberían interpretarse como limitantes del alcance de la invención de ninguna manera.

Ejemplos

Ejemplo 1. Clonación de ADNc de chaperona.

- 45 Todas las secuencias de chaperonas se clonan a partir de bibliotecas de ADNc humanas seguido de verificación de las secuencias de nucleótidos. Se clonaron secuencias de ADN que representaban las tres chaperonas de ER por RT-PCR de una biblioteca de ADNc humana. Los cebadores de RT-PCR usados en estas reacciones se diseñaron para amplificar la región codificante completa usando las secuencias apropiadas obtenidas de Genbank. Cada par de cebadores 5' y 3' incluyen un sitio de restricción EcoRI (cebador 5') o XbaI (cebador 3') (Figura 1) para facilitar la clonación del producto de PCR en el vector de expresión, pCI-neo (Promega).

- 50 Las reacciones de PCR se realizaron usando enzima PFU de alta fidelidad (Stratagene). Se purificaron bandas del tamaño esperado, se digirieron con EcoR I y Xba I y se clonaron en el vector pCI-neo digerido de forma similar. Se propagaron vectores recombinantes de esta etapa en *E. coli* seguido de aislamiento y purificación de las secuencias de vectores. Los insertos de secuencia que representan las chaperonas se secuenciaron usando cebadores que se

unían fuera de los sitios de clonación múltiple del vector así como dentro de la secuencia de chaperona. Se realizó secuenciación usando el procedimiento de terminador Big Dye en termociclador de MJ Research y se analizó usando un analizador genético ABI 310. Las secuencias de ADNc de calnexina humana, calreticulina y Erp57 se muestran en las Figuras 2A-2C.

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

Ejemplo 2. La producción de bikunina aumenta en células CHO después de transfección de una chaperona ER, tal como calnexina, calreticulina, Erp57 o Hsp70.

Se supertransfectó una línea celular CHO que secretaba la proteína recombinante Bikunina (Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º de serie 09/441654) con diversas combinaciones de las chaperonas ER, calnexina (CNX), calreticulina (CRT), Erp57 o Hsp70 seguido de selección con G418. Se obtuvieron poblaciones y se exploraron por ensayo de calicreína (Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º de Serie 09/441.654). Brevemente, se diluyeron en serie patrones de bikunina o fluido de cultivo y se incubaron con un volumen igual de calicreína a 37 °C durante 30 minutos, después de lo cual se añadió un sustrato cromogénico, N-benzoyl-Pro-Phe-Arg-pNA. La reacción se incubó durante 15 minutos antes de la adición de ácido acético al 50 %. La cantidad de p-nitroanilida liberada se midió a 405 nM. Las poblaciones que mostraban los mayores títulos de Bikunina se clonaron después a partir de una única célula y se cultivaron en expansión durante un periodo de varias semanas. Los clones que mostraban títulos de Bikunina uniformemente mayores (2-4x) en relación con las células de control CF9-20 se conservaron y se expandieron a matraces de agitación para análisis adicional. Estos clones se redujeron adicionalmente basándose en títulos de Bikunina y características de crecimiento demostradas mientras crecían en el ambiente del matraz de agitación. Se seleccionaron clones candidatos finales después de varios ciclos y análisis exhaustivo en el estadio de matraz de agitación.

La velocidad de producción de Bikunina específica para todas las líneas celulares se expresa como pg de Bikunina/célula/día (SPR). Cada día se recogieron células y se transfirieron a medio nuevo y se incubaron durante 24 horas a 37 °C en matraces de agitación. Al día siguiente, las células se recogieron de nuevo, se contaron y se resuspendieron en medio nuevo del mismo volumen y se incubaron de forma similar durante otras 24 horas. Se realizaron mediciones de la actividad de bikunina (pg/célula/día) en muestras del medio gastado. El mismo procedimiento se repitió cada día hasta que el número y la viabilidad de las células comenzaron a reducirse.

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

Tabla 1. Los niveles de producción de Bikunina generales son 2-4 veces mayores en clones que se han supertransfectado con una chaperona

Clon	Aumento de Bikunina en Relación con el Control	Chaperona
X4/14:5	2-4	CNX
X4/14:30	2-4	CNX
X4/19:62	2-4	Erp57
T4/13:22	1,5-2	CRT

Las mediciones del factor de actividad son en relación con una línea celular de control que expresa Bikunina pero no expresa ninguna de las proteínas chaperonas. Las células se cultivaron en medio sin suero en cultivos de matraces de agitación.

Ejemplo 3. La producción de Factor VIII recombinante aumenta en células BHK después de la transfección con chaperonas ER.

Se transfectaron células productoras de Factor VIII estable (MWCB1) (Patente de Estados Unidos n.º 4.965.199, ATCC n.º CRL 8544) con vectores de expresión de chaperonas además de pPUR, un vector que contiene gen

resistente a puromicina, en una relación 10:1. Aproximadamente 4×10^6 células MWCB 1 se transfectaron con un total de 5 µg de ADN usando el reactivo DMRIE-C y medio OPTI-MEM (Life Technology, MD) en placas de 6 pocillos. Tres días después de la transfección, se sembraron 100.000 células en placas de 6 pocillos y después se seleccionaron en presencia de puromicina 1-2 µg/ml con medio OPTI-MEM que contenía FBS al 2 % durante 2 semanas. Las colonias resistentes a puromicina se seleccionaron manualmente y se sembraron en placas de 96 pocillos y se expandieron sin la presencia de fármaco. Se exploraron poblaciones clonales individuales con respecto a producción de Factor VIII usando un kit COATEST (Chromogenix, Italia) según las instrucciones del fabricante. Los clones de alta producción se expandieron secuencialmente a partir de la placa de 6 pocillos, a un matraz T75, seguido de estadio de matraz de agitación para ensayos de estabilidad y productividad. Las chaperonas Calnexina (CNX), Calreticulina (CRT), Erp57, Hsp40 y Hsp70 se transfectaron después en células individualmente o en combinaciones de dos. Se observó un aumento significativo de 2 a 3 veces de la productividad del Factor VIII en clones transfectados con CNX, CRT y Erp57, Hsp70 y Hsp40 mientras que el control de vector vacío (PCI-Neo) no mostró ninguna diferencia en comparación con las células MWCB 1 parentales (Tabla 2).

Tabla 2. Productividad de Factor VIII recombinante en clones

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

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

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

Se supertransfectaron células CHO recombinantes (como se ha descrito en el Ejemplo 2) que expresaban altos niveles de bikunina, y células BHK recombinantes (como se ha descrito en el Ejemplo 3) que expresaban altos niveles de Factor VIII recombinante (rFVIII) con pHyg (plásmido que confiere resistencia a higromicina) y pBiP. Las condiciones transfectantes y condiciones de selección fueron iguales que en el Ejemplo 2. Después de la selección en higromicina y clonación con dilución limitante, los clones se evaluaron con respecto a productividad para actividad de bikunina y rFVIII. No hubo diferencias significativas en la productividad específica de clones derivados de células transfectadas solamente con el vector de control (pHyg) y clones derivados de células transfectadas con pBiP.

Ejemplo 5. Transfección de clon productor de IL2SA con glutamina sintetasa (GS) y Hsp70.

Se cotransfectó la línea celular CHO productora de IL2SA (agonista selectivo de IL2, Patente de Estados Unidos n.º 6.348.192), 49-19-H42 (una variante clonal del depósito de la ATCC PTA-8), con PCI-GS y PCI-neo-Hsp70. Se transfectaron 4×10^6 células con 2,5 µg de ADN plasmídico usando reactivos DMRIE-C y medio OPTI-MEM (Life Technology, MD) en placas de 6 pocillos según las instrucciones del fabricante. Tres días después de la transfección, las células se sembraron en placas de 150 mm y 96 pocillos y después se seleccionaron en presencia de MSX (metionina sulfoximinina) 10 µM y G418 250 µg/ml con medio DME:F12 (1:1) deficiente en glutamina que contenía FBS dializado 2 % durante 2 semanas. Se seleccionaron colonias de células individuales y se volvieron a sembrar en 96 pocillos. Los clones se seleccionaron durante otra semana con concentraciones mayores de MSX (20 µM) y G418 (400 µg/ml). Se genera un grupo a partir de una placa de 150 mm después de selección de 3 semanas. El grupo y los clones se expandieron gradualmente a matraces de agitación y se exploraron con respecto a productividad de IL2 usando ELISA. La expresión de proteínas GS y Hsp70 se confirmó mediante análisis de FACS usando un citómetro de flujo. Las células "GS positivas" se cultivaron en un complemento de medio sin glutamina con glutamato 5,6 mM y glucosa 4 g/l. El tiempo de duplicación de estos clones varió de 24 a 48 horas. Se muestra una comparación de la productividad del parental y los clones en la Tabla 3. Se observó un factor de

aumento de 2-4 en el título general y un factor de aumento de 2-3 en la productividad específica en todos los clones de células individuales en comparación con el grupo o la línea parental.

Tabla 3. Productividad de células productoras de IL2SA

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

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

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

Referencias

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

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

(3) Tuite, M. F.; Freedman, R. B.; Schultz, L. D.; Ellis, R. W.; Markus, H. Z.; Montgomery, D. L. Method for increasing production of disulfide bonded recombinant proteins by *saccharomyces cerevisiae*. *Patente Australiana n.º AU679448B2* 1997.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(13) Davis, R.; Schooley, K.; Rasmussen, B.; Thomas, J.; Reddy, P. Effect of PDI Overexpression on

Recombinant Protein Secretion in CHO Cells. *Biotechnol. Prog.* 2000, 16, 736-743.

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

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

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

También se desvelan en el presente documento las siguientes realizaciones:

- 10 1. Una célula huésped de mamífero para expresión potenciada de un producto proteico recombinante, teniendo dicha célula de mamífero material genético que codifica la expresión de dicho producto proteico recombinante y transformado con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona seleccionada del grupo que consiste en calnexina, calreticulina, Erp57, Hsp40 y Hsp70.
- 15 2. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 1, en la que se secreta el producto proteico recombinante.
3. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 2, en la que el material genético que codifica la expresión de dicho producto proteico recombinante se integra en el ADN de la célula huésped.
4. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 3, transformada además con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína glutamina sintetasa.
- 20 5. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 2, en la que el producto proteico recombinante es bikunina o fragmento de la misma.
6. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 5, en la que la transformación se produce con un vector de expresión que comprende ADN que codifica calnexina.
- 25 7. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 5, en la que la transformación se produce con un vector de expresión que comprende ADN que codifica Erp57.
8. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 5, en la que la transformación se produce con un vector de expresión que comprende ADN que codifica calreticulina.
9. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 5, en la que la transformación se produce con un vector de expresión que comprende ADN que codifica Hsp70.
- 30 10. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 2, en la que el producto proteico recombinante es Factor VIII o fragmento del mismo.
11. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 10, en la que dicha transformación se produce con un primer vector de expresión que comprende ADN que codifica calreticulina y un segundo vector de expresión que comprende ADN que codifica Erp57.
- 35 12. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 10, en la que dicha transformación se produce con un vector de expresión que comprende ADN que codifica calnexina.
13. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 10, en la que dicha transformación se produce con un vector de expresión que comprende ADN que codifica Hsp70.
- 40 14. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 2, en la que el producto proteico recombinante es IL2SA o fragmento del mismo.
15. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 14, en la que dicha transformación se produce con un vector de expresión que comprende ADN que codifica Hsp70.
- 45 16. Una célula huésped de mamífero para expresión potenciada de bikunina o fragmento de la misma, teniendo dicha célula de mamífero material genético que codifica la expresión de bikunina o fragmento de la misma y transformado con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona seleccionada del grupo que consiste en calnexina, calreticulina, Erp57, Hsp40 y Hsp70.
17. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 16, en la que el material genético que codifica la expresión de bikunina o fragmento de la misma se integra en el ADN de la célula huésped.

18. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 16, transformada además con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína glutamina sintetasa.
19. Una célula huésped de mamífero para expresión potenciada de Factor VIII o fragmento del mismo, teniendo dicha célula de mamífero material genético que codifica la expresión de Factor VIII o fragmento del mismo y transformado con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona seleccionada del grupo que consiste en calnexina, calreticulina, Erp57, hsp40 y Hsp70.
20. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 19, en la que el material genético que codifica la expresión de Factor VIII o fragmento del mismo se integra en el ADN de la célula huésped.
21. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 20, transformada además con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína glutamina sintetasa.
22. Una célula huésped de mamífero para expresión potenciada de IL2SA o fragmento del mismo, teniendo dicha célula de mamífero material genético que codifica la expresión de IL2SA o fragmento del mismo y transformado con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona seleccionada del grupo que consiste en calnexina, calreticulina, Erp57, hsp40 y Hsp70.
23. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 22, en la que el material genético que codifica la expresión de IL2SA o fragmento del mismo se integra en el ADN de la célula huésped.
24. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 23, transformada además con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína glutamina sintetasa.
25. Un procedimiento para producir una célula huésped de mamífero para expresión potenciada de una proteína recombinante diana o fragmento de la misma que comprende proporcionar una célula de mamífero que tiene material genético que codifica la expresión de una proteína recombinante diana o fragmento de la misma; y transformar la célula de mamífero con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona seleccionada del grupo que consiste en calnexina, calreticulina, Erp57, Hsp40 y Hsp70.
26. El procedimiento de acuerdo con la realización 25 en el que se secreta el producto proteico recombinante.
27. El procedimiento de acuerdo con la realización 26, en el que el material genético que codifica la expresión de dicho producto proteico recombinante se integra en el ADN de la célula huésped.
28. El procedimiento de acuerdo con la realización 28, transformado además con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína glutamina sintetasa.
29. El procedimiento de acuerdo con la realización 26, en el que el producto proteico recombinante es bikunina o fragmento de la misma.
30. El procedimiento 1 de acuerdo con la realización 29, en el que la transformación se produce con un vector de expresión que comprende ADN que codifica calnexina.
31. El procedimiento de acuerdo con la realización 29, en el que la transformación se produce con un vector de expresión que comprende ADN que codifica Erp57.
32. El procedimiento de acuerdo con la realización 29, en el que la transformación se produce con un vector de expresión que comprende ADN que codifica calreticulina.
33. El procedimiento de acuerdo con la realización 29, en el que la transformación se produce con un vector de expresión que comprende ADN que codifica Hsp70.
34. El procedimiento de acuerdo con la realización 26, en el que el producto proteico recombinante es Factor VIII o fragmento del mismo.
35. El procedimiento de acuerdo con la realización 34, en el que dicha transformación se produce con un primer vector de expresión que comprende ADN que codifica calreticulina y un segundo vector de expresión que comprende ADN que codifica Erp57.
36. El procedimiento de acuerdo con la realización 34, en el que dicha transformación se produce con un vector de expresión que comprende ADN que codifica calnexina.
37. El procedimiento de acuerdo con la realización 34, en el que dicha transformación se produce con un vector de expresión que comprende ADN que codifica Hsp70.

38. El procedimiento de acuerdo con la realización 26, en el que el producto proteico recombinante es IL25A o fragmento del mismo.
39. El procedimiento de acuerdo con la realización 38, en el que dicha transformación se produce con un vector de expresión que comprende ADN que codifica Hsp70.
- 5 40. Un procedimiento para producir un producto proteico recombinante secretado que comprende las etapas de:
- cultivar una célula huésped de mamífero, teniendo dicha célula huésped de mamífero material genético que codifica la expresión de dicho producto proteico recombinante y transformado con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona seleccionada del grupo que consiste en calnexina, calreticulina, Erp57, hsp40 y Hsp70; y
- 10 recuperar del medio de cultivo el producto proteico recombinante producido y secretado de este modo.
41. El procedimiento de acuerdo con la realización 40, en el que el material genético que codifica la expresión de dicho producto proteico recombinante se integra en el ADN de la célula huésped.
42. El procedimiento de acuerdo con la realización 41, en el que dicha célula huésped de mamífero se transforma adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína glutamina sintetasa.
- 15 43. Un procedimiento para producir una proteína bikunina o fragmento de la misma que comprende cultivar la célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 5 y recuperar del medio de cultivo la proteína bikunina o fragmento de la misma producida y secretada de este modo.
44. El procedimiento de acuerdo con la realización 43, en el que dicha célula huésped de mamífero se transforma adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína glutamina sintetasa.
- 20 45. Un procedimiento para producir una proteína de Factor VIII o fragmento de la misma que comprende cultivar la célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 10 y recuperar del medio de cultivo la proteína de Factor VIII o fragmento de la misma producida y secretada de este modo.
- 25 46. El procedimiento de acuerdo con la realización 45, en el que dicha célula huésped de mamífero se transforma adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína glutamina sintetasa.
47. Un procedimiento para producir una proteína IL2SA o fragmento de la misma que comprende cultivar la célula huésped de mamífero de acuerdo con la realización 14 y recuperar del medio de cultivo la proteína IL2SA o fragmento de la misma producida y secretada de este modo.
- 30 48. El procedimiento de acuerdo con la realización 47, en el que dicha célula huésped de mamífero se transforma adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína de glutamina sintetasa.
49. Un procedimiento para potenciar el rendimiento de proteína bikunina recombinante en una línea celular CHO, en el que se ha introducido previamente material genético que codifica la expresión de dicha bikunina recombinante en una primera línea celular CHO, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- insertar al menos un vector de expresión de proteína chaperona en dicha primera línea celular CHO para formar una línea celular CHO modificada; y
- 40 seleccionar de dicha línea celular CHO modificada al menos una segunda línea celular que muestra rendimiento potenciado de la proteína bikunina recombinante.
50. El procedimiento de acuerdo con la realización 49, en el que el material genético que codifica la expresión de dicha bikunina recombinante se integra en el ADN de la primera célula CHO.
51. El procedimiento de acuerdo con la realización 50, en el que la segunda línea celular se transforma adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína glutamina sintetasa.
- 45 52. El procedimiento de acuerdo con la realización 49, en el que se produce al menos una segunda línea celular a partir de dicha primera línea celular seleccionando una parte de dicha primera línea celular que muestra integración del vector de expresión de proteína chaperona en ADN del huésped.
53. El procedimiento de acuerdo con la realización 49, en el que dicho vector de expresión de proteína chaperona comprende ADN que codifica una proteína chaperona seleccionada del grupo que consiste en calnexina, calreticulina, Erp57, Hsp40 y Hsp70.
- 50

54. El procedimiento de acuerdo con la realización 49, en el que dicha selección se produce en presencia de G418.
55. Un procedimiento para potenciar el rendimiento del factor VIII recombinante en una línea celular de riñón de cría de hámster (BHK), en el que se ha introducido previamente material genético que codifica la expresión de dicho Factor VIII recombinante en una primera línea celular BHK, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - insertar al menos un vector de expresión de proteína chaperona en dicha primera línea celular BHK para formar una línea celular BHK modificada; y
 - seleccionar de dicha línea celular BHK modificada al menos una segunda línea celular que muestra rendimiento potenciado del producto de Factor VIII recombinante.
56. El procedimiento de acuerdo con la realización 55, en el que el material genético que codifica la expresión de dicho Factor VIII recombinante se integra en el ADN de la primera célula BHK.
57. El procedimiento de acuerdo con la realización 55, en el que dicha segunda línea celular se transforma adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína glutamina sintetasa.
58. El procedimiento de acuerdo con la realización 55, en el que al menos una segunda línea celular se produce a partir de dicha primera línea celular seleccionando una parte de dicha primera línea celular que muestra integración del vector de expresión de proteína chaperona en ADN del huésped.
59. El procedimiento de acuerdo con la realización 55, en el que dicho vector de expresión de proteína chaperona comprende ADN que codifica una proteína chaperona seleccionada del grupo que consiste en calnexina, calreticulina, Erp57, Hsp40 o Hsp70.
60. El procedimiento de acuerdo con la realización 55, en el que dicha célula BHK se transfecta adicionalmente con un vector que incluye un gen resistente a puromicina.
61. El procedimiento de acuerdo con la realización 55, en el que la selección se produce en presencia de puromicina.
62. Un procedimiento para potenciar el rendimiento de proteínas IL2SA recombinantes en una línea celular CHO, en la que se ha introducido previamente material genético que codifica la expresión de dicho IL2SA recombinante en una primera línea celular CHO, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - insertar al menos un vector de expresión de proteína chaperona en dicha primera línea celular CHO para formar una línea celular CHO modificada; y
 - seleccionar de dicha línea celular CHO modificada al menos una segunda línea celular que muestra rendimiento potenciado de la proteína IL2SA recombinante.
63. El procedimiento de acuerdo con la realización 62, en el que el material genético que codifica la expresión de dicho IL2SA recombinante se integra en el ADN de la primera célula CHO.
64. El procedimiento de acuerdo con la realización 63, en el que la segunda línea celular se transforma adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína glutamina sintetasa.
65. El procedimiento de acuerdo con la realización 62, en el que dicho vector de expresión de proteína chaperona comprende ADN que codifica una proteína chaperona seleccionada del grupo que consiste en calnexina, calreticulina, Erp57, Hsp40 y Hsp70.
66. Un procedimiento para potenciar el rendimiento de una bikunina recombinante o fragmento en una línea celular CHO que comprende introducir material genético que codifica bikunina o fragmento de la misma en una línea celular CHO que muestra expresión de proteína chaperona potenciada.
67. El procedimiento de acuerdo con la realización 66, en el que la línea celular CHO se transforma adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína glutamina sintetasa.
68. Un procedimiento para potenciar el rendimiento de un Factor VIII recombinante o fragmento del mismo en una línea celular BHK que comprende introducir material genético que codifica dicho Factor VIII o fragmento del mismo en una línea celular BHK que muestra expresión de proteína chaperona potenciada.
69. El procedimiento de acuerdo con la realización 68, en el que la línea celular BHK se transforma adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína glutamina sintetasa.
70. Un procedimiento para potenciar el rendimiento de un IL2SA recombinante o fragmento del mismo en una línea celular CHO que comprende introducir material genético que codifica dicho IL2SA en una línea celular CHO

que muestra expresión de proteína chaperona potenciada.

71. El procedimiento de acuerdo con la realización 70, en el que la línea celular CHO se transforma adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína glutamina sintetasa.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> Chan, Sham-Yuen Tang, Hsinyi Y Tao, Yiwen Wu, Yongjian Kelly, Ruth	
	<120> Uso de chaperonas moleculares para la producción potenciada de proteínas secretadas, recombinantes, en células de mamífero	
10	<130> 03-302-A	
	<140> 10/792.571	
	<141> 04-03-2004	
15	<150> 60/483.505	
	<151> 27-06-2003	
	<160> 22	
20	<170> PatentIn versión 3.3	
	<210> 1	
	<211> 28	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 1	
	atgaattccg ggaggctaga gatcatgg	28
	<210> 2	
35	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 2	
	attctagatg caggggagga gggagaag	28
45	<210> 3	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 3	
55	atgaattccc gccatgctgc tatccgtg	28
	<210> 4	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 4	

ES 2 634 623 T3

	attctagact ggaggcaggc ctctctac	28
	<210> 5	
	<211> 28	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 5	
	atgaattcct ccgcagtcct agccgagc	28
	<210> 6	
15	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 6	
	attctagact ctcggccctg agaggtaa	28
25	<210> 7	
	<211> 1856	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (23)..(1801)	
35	<400> 7	
	gaattccggg aggctagaga tc atg gaa ggg aag tgg ttg ctg tgt atg tta	52
	Met Glu Gly Lys Trp Leu Leu Cys Met Leu	
	1 5 10	
	ctg gtg ctt gga act gct att gtt gag gct cat gat gga cat gat gat	100
	Leu Val Leu Gly Thr Ala Ile Val Glu Ala His Asp Gly His Asp Asp	
	15 20 25	
	gat gtg att gat att gag gat gac ctt gac gat gtc att gaa gag gta	148
	Asp Val Ile Asp Ile Glu Asp Asp Leu Asp Asp Val Ile Glu Glu Val	
	30 35 40	
	gaa gac tca aaa cca gat acc act gct cct cct tca tct ccc aag gtt	196
	Glu Asp Ser Lys Pro Asp Thr Thr Ala Pro Pro Ser Ser Pro Lys Val	
	45 50 55	
	act tac aaa gct cca gtt cca aca ggg gaa gta tat ttt gct gat tct	244
	Thr Tyr Lys Ala Pro Val Pro Thr Gly Glu Val Tyr Phe Ala Asp Ser	
	60 65 70	

ES 2 634 623 T3

ttt gac aga gga act ctg tca ggg tgg att tta tcc aaa gcc aag aaa Phe Asp Arg Gly Thr Leu Ser Gly Trp Ile Leu Ser Lys Ala Lys Lys 75 80 85 90	292
gac gat acc gat gat gaa att gcc aaa tat gat gga aag tgg gag gta Asp Asp Thr Asp Asp Glu Ile Ala Lys Tyr Asp Gly Lys Trp Glu Val 95 100 105	340
gag gaa atg aag gag tca aag ctt cca ggt gat aaa gga ctt gtg ttg Glu Glu Met Lys Glu Ser Lys Leu Pro Gly Asp Lys Gly Leu Val Leu 110 115 120	388
atg tct cgg gcc aag cat cat gcc atc tct gct aaa ctg aac aag ccc Met Ser Arg Ala Lys His His Ala Ile Ser Ala Lys Leu Asn Lys Pro 125 130 135	436
ttc ctg ttt gac acc aag cct ctc att gtt cag tat gag gtt aat ttc Phe Leu Phe Asp Thr Lys Pro Leu Ile Val Gln Tyr Glu Val Asn Phe 140 145 150	484
caa aat gga ata gaa tgt ggt ggt gcc tat gtg aaa ctg ctt tct aaa Gln Asn Gly Ile Glu Cys Gly Gly Ala Tyr Val Lys Leu Leu Ser Lys 155 160 165 170	532
aca cca gaa ctc aac ctg gat cag ttc cat gac aag acc cct tat acg Thr Pro Glu Leu Asn Leu Asp Gln Phe His Asp Lys Thr Pro Tyr Thr 175 180 185	580
att atg ttt ggt cca gat aaa tgt gga gag gac tat aaa ctg cac ttc Ile Met Phe Gly Pro Asp Lys Cys Gly Glu Asp Tyr Lys Leu His Phe 190 195 200	628
atc ttc cga cac aaa aac ccc aaa acg ggt atc tat gaa gaa aaa cat Ile Phe Arg His Lys Asn Pro Lys Thr Gly Ile Tyr Glu Glu Lys His 205 210 215	676
gct aag agg cca gat gca gat ctg aag acc tat ttt act gat aag aaa Ala Lys Arg Pro Asp Ala Asp Leu Lys Thr Tyr Phe Thr Asp Lys Lys 220 225 230	724
aca cat ctt tac aca cta atc ttg aat cca gat aat agt ttt gaa ata Thr His Leu Tyr Thr Leu Ile Leu Asn Pro Asp Asn Ser Phe Glu Ile 235 240 245 250	772
ctg gtt gac caa tct gtg gtg aat agt gga aat ctg ctc aat gac atg Leu Val Asp Gln Ser Val Val Asn Ser Gly Asn Leu Leu Asn Asp Met 255 260 265	820
act cct cct gta aat cct tca cgt gaa att gag gac cca gaa gac cgg Thr Pro Pro Val Asn Pro Ser Arg Glu Ile Glu Asp Pro Glu Asp Arg 270 275 280	868
aag ccc gag gat tgg gat gaa aga cca aaa atc cca gat cca gaa gct Lys Pro Glu Asp Trp Asp Glu Arg Pro Lys Ile Pro Asp Pro Glu Ala 285 290 295	916
gtc aag cca gat gac tgg gat gaa gat gcc cct gct aag att cca gat Val Lys Pro Asp Asp Trp Asp Glu Asp Ala Pro Ala Lys Ile Pro Asp 300 305 310	964
gaa gag gcc aca aaa ccc gaa ggc tgg tta gat gat gag cct gag tac Glu Glu Ala Thr Lys Pro Glu Gly Trp Leu Asp Asp Glu Pro Glu Tyr 315 320 325 330	1012

ES 2 634 623 T3

gta cct gat cca gac gca gag aaa cct gag gat tgg gat gaa gac atg	1060
Val Pro Asp Pro Asp Ala Glu Lys Pro Glu Asp Trp Asp Glu Asp Met	
335 340 345	
gat gga gaa tgg gag gct cct cag att gcc aac cct aga tgt gag tca	1108
Asp Gly Glu Trp Glu Ala Pro Gln Ile Ala Asn Pro Arg Cys Glu Ser	
350 355 360	
gct cct gga tgt ggt gtc tgg cag cga cct gtg att gac aac ccc aat	1156
Ala Pro Gly Cys Gly Val Trp Gln Arg Pro Val Ile Asp Asn Pro Asn	
365 370 375	
tat aaa ggc aaa tgg aag cct cct atg att gac aat ccc agt tac cag	1204
Tyr Lys Gly Lys Trp Lys Pro Pro Met Ile Asp Asn Pro Ser Tyr Gln	
380 385 390	
gga atc tgg aaa ccc agg aaa ata cca aat cca gat ttc ttt gaa gat	1252
Gly Ile Trp Lys Pro Arg Lys Ile Pro Asn Pro Asp Phe Phe Glu Asp	
395 400 405 410	
ctg gaa cct ttc aga atg act cct ttt agt gct att ggt ttg gag ctg	1300
Leu Glu Pro Phe Arg Met Thr Pro Phe Ser Ala Ile Gly Leu Glu Leu	
415 420 425	
tgg tcc atg acc tct gac att ttt ttt gac aac ttt atc att tgt gct	1348
Trp Ser Met Thr Ser Asp Ile Phe Phe Asp Asn Phe Ile Ile Cys Ala	
430 435 440	
gat cga aga ata gtt gat gat tgg gcc aat gat gga tgg ggc ctg aag	1396
Asp Arg Arg Ile Val Asp Asp Trp Ala Asn Asp Gly Trp Gly Leu Lys	
445 450 455	
aaa gct gct gat ggg gct gct gag cca ggc gtt gtg ggg cag atg atc	1444
Lys Ala Ala Asp Gly Ala Ala Glu Pro Gly Val Val Gly Gln Met Ile	
460 465 470	
gag gca gct gaa gag cgc ccg tgg ctg tgg gta gtc tat att cta act	1492
Glu Ala Ala Glu Glu Arg Pro Trp Leu Trp Val Val Tyr Ile Leu Thr	
475 480 485 490	
gta gcc ctt cct gtg ttc ctg gtt atc ctc ttc tgc tgt tct gga aag	1540
Val Ala Leu Pro Val Phe Leu Val Ile Leu Phe Cys Cys Ser Gly Lys	
495 500 505	
aaa cag acc agt ggt atg gag tat aag aaa act gat gca cct caa ccg	1588
Lys Gln Thr Ser Gly Met Glu Tyr Lys Lys Thr Asp Ala Pro Gln Pro	
510 515 520	
gat gtg aag gaa gag gaa gaa gag aag gaa gag gaa aag gac aag gga	1636
Asp Val Lys Glu Glu Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Lys Asp Lys Gly	
525 530 535	
gat gag gag gag gaa gga gaa gag aaa ctt gaa gag aaa cag aaa agt	1684
Asp Glu Glu Glu Glu Gly Glu Glu Lys Leu Glu Glu Lys Gln Lys Ser	
540 545 550	
gat gct gaa gaa gat ggt ggc act gtc agt caa gag gag gaa gac aga	1732
Asp Ala Glu Glu Asp Gly Gly Thr Val Ser Gln Glu Glu Glu Asp Arg	
555 560 565 570	
aaa cct aaa gca gag gag gat gaa att ttg aac aga tca cca aga aac	1780
Lys Pro Lys Ala Glu Glu Asp Glu Ile Leu Asn Arg Ser Pro Arg Asn	

ES 2 634 623 T3

575 580 585
aga aag cca cga aga gag tga aacaatctta agagcttgat ctgtgatttc 1831
Arg Lys Pro Arg Arg Glu
590

ttctccctcc tccctgcat ctaga 1856

<210> 8
<211> 592
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Met Glu Gly Lys Trp Leu Leu Cys Met Leu Leu Val Leu Gly Thr Ala
1 5 10 15

Ile Val Glu Ala His Asp Gly His Asp Asp Asp Val Ile Asp Ile Glu
20 25 30

Asp Asp Leu Asp Asp Val Ile Glu Glu Val Glu Asp Ser Lys Pro Asp
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 634 623 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 9

gaattcccg c atg ctg cta tcc gtg ccg ctg ctg ctc ggc ctc ctc ggc	50
Met Leu Leu Ser Val Pro Leu Leu Leu Gly Leu Leu Gly	
1 5 10	
ctg gcc gtc gcc gag cct gcc gtc tac ttc aag gag cag ttt ctg gac	98
Leu Ala Val Ala Glu Pro Ala Val Tyr Phe Lys Glu Gln Phe Leu Asp	
15 20 25	
gga gac ggg tgg act tcc cgc tgg atc gaa tcc aaa cac aag tca gat	146
Gly Asp Gly Trp Thr Ser Arg Trp Ile Glu Ser Lys His Lys Ser Asp	
30 35 40 45	
ttt ggc aaa ttc gtt ctc agt tcc ggc aag ttc tac ggt gac gag gag	194
Phe Gly Lys Phe Val Leu Ser Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Asp Glu Glu	

ES 2 634 623 T3

50	55	60	
aaa gat aaa ggt ttg cag aca agc cag gat gca cgc ttt tat gct ctg Lys Asp Lys Gly Leu Gln Thr Ser Gln Asp Ala Arg Phe Tyr Ala Leu 65 70 75			242
tcg gcc agt ttc gag cct ttc agc aac aaa ggc cag acg ctg gtg gtg Ser Ala Ser Phe Glu Pro Phe Ser Asn Lys Gly Gln Thr Leu Val Val 80 85 90			290
cag ttc acg gtg aaa cat gag cag aac atc gac tgt ggg ggc ggc tat Gln Phe Thr Val Lys His Glu Gln Asn Ile Asp Cys Gly Gly Gly Tyr 95 100 105			338
gtg aag ctg ttt cct aat agt ttg gac cag aca gac atg cac gga gac Val Lys Leu Phe Pro Asn Ser Leu Asp Gln Thr Asp Met His Gly Asp 110 115 120 125			386
tca gaa tac aac atc atg ttt ggt ccc gac atc tgt ggc cct ggc acc Ser Glu Tyr Asn Ile Met Phe Gly Pro Asp Ile Cys Gly Pro Gly Thr 130 135 140			434
aag aag gtt cat gtc atc ttc aac tac aag ggc aag aac gtg ctg atc Lys Lys Val His Val Ile Phe Asn Tyr Lys Gly Lys Asn Val Leu Ile 145 150 155			482
aac aag gac atc cgt tgc aag gat gat gag ttt aca cac ctg tac aca Asn Lys Asp Ile Arg Cys Lys Asp Asp Glu Phe Thr His Leu Tyr Thr 160 165 170			530
ctg att gtg cgg cca gac aac acc tat gag gtg aag att gac aac agc Leu Ile Val Arg Pro Asp Asn Thr Tyr Glu Val Lys Ile Asp Asn Ser 175 180 185			578
cag gtg gag tcc ggc tcc ttg gaa gac gat tgg gac ttc ctg cca ccc Gln Val Glu Ser Gly Ser Leu Glu Asp Asp Trp Asp Phe Leu Pro Pro 190 195 200 205			626
aag aag ata aag gat cct gat gct tca aaa ccg gaa gac tgg gat gag Lys Lys Ile Lys Asp Pro Asp Ala Ser Lys Pro Glu Asp Trp Asp Glu 210 215 220			674
cgg gcc aag atc gat gat ccc aca gac tcc aag cct gag gac tgg gac Arg Ala Lys Ile Asp Asp Pro Thr Asp Ser Lys Pro Glu Asp Trp Asp 225 230 235			722
aag ccc gag cat atc cct gac cct gat gct aag aag ccc gag gac tgg Lys Pro Glu His Ile Pro Asp Pro Asp Ala Lys Lys Pro Glu Asp Trp 240 245 250			770
gat gaa gag atg gac gga gag tgg gaa ccc cca gtg att cag aac cct Asp Glu Glu Met Asp Gly Glu Trp Glu Pro Pro Val Ile Gln Asn Pro 255 260 265			818
gag tac aag ggt gag tgg aag ccc cgg cag atc gac aac cca gat tac Glu Tyr Lys Gly Glu Trp Lys Pro Arg Gln Ile Asp Asn Pro Asp Tyr 270 275 280 285			866
aag ggc act tgg atc cac cca gaa att gac aac ccc gag tat tct ccc Lys Gly Thr Trp Ile His Pro Glu Ile Asp Asn Pro Glu Tyr Ser Pro 290 295 300			914
gat ccc agt atc tat gcc tat gat aac ttt ggc gtg ctg ggc ctg gac			962

ES 2 634 623 T3

```

Asp Pro Ser Ile Tyr Ala Tyr Asp Asn Phe Gly Val Leu Gly Leu Asp
305 310 315

ctc tgg cag gtc aag tct ggc acc atc ttt gac aac ttc ctc atc acc 1010
Leu Trp Gln Val Lys Ser Gly Thr Ile Phe Asp Asn Phe Leu Ile Thr
320 325 330

aac gat gag gca tac gct gag gag ttt ggc aac gag acg tgg ggc gta 1058
Asn Asp Glu Ala Tyr Ala Glu Glu Phe Gly Asn Glu Thr Trp Gly Val
335 340 345

aca aag gca gca gag aaa caa atg aag gac aaa cag gac gag gag cag 1106
Thr Lys Ala Ala Glu Lys Gln Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln
350 355 360 365

agg ctt aag gag gag gaa gaa gac aag aaa cgc aaa gag gag gag gag 1154
Arg Leu Lys Glu Glu Glu Glu Asp Lys Lys Arg Lys Glu Glu Glu Glu
370 375 380

gca gag gac aag gag gat gat gag gac aaa gat gag gat gag gag gat 1202
Ala Glu Asp Lys Glu Asp Asp Glu Asp Lys Asp Glu Asp Glu Glu Asp
385 390 395

gag gag gac aag gag gaa gat gag gag gaa gat gtc ccc ggc cag gcc 1250
Glu Glu Asp Lys Glu Glu Asp Glu Glu Glu Asp Val Pro Gly Gln Ala
400 405 410

aag gac gag ctg tag agaggcctgc ctccagtcta ga 1287
Lys Asp Glu Leu
415

```

<210> 10
 <211> 417
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10

```

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

Ala Glu Pro Ala Val Tyr Phe Lys Glu Gln Phe Leu Asp Gly Asp Gly
20 25 30

Trp Thr Ser Arg Trp Ile Glu Ser Lys His Lys Ser Asp Phe Gly Lys
35 40 45

Phe Val Leu Ser Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Asp Glu Glu Lys Asp Lys
50 55 60

Gly Leu Gln Thr Ser Gln Asp Ala Arg Phe Tyr Ala Leu Ser Ala Ser
65 70 75 80

Phe Glu Pro Phe Ser Asn Lys Gly Gln Thr Leu Val Val Gln Phe Thr
85 90 95

```

ES 2 634 623 T3

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

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

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

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

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

Leu

<210> 11
<211> 1696
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (65)..(1582)

<400> 11

```

gaattcctcc gcagtcacag ccgagccgcg acccttcagg ccgtcccccac cccacctcgc      60
cgcc atg cgc ctc cgc cgc cta gcg ctg ttc ccg ggt gtg gcg ctg ctt      109
  Met Arg Leu Arg Arg Leu Ala Leu Phe Pro Gly Val Ala Leu Leu
    1          5          10          15

ctt gcc gcg gcc cgc ctc gcc gct gcc tcc gac gtg cta gaa ctc acg      157
Leu Ala Ala Ala Arg Leu Ala Ala Ala Ser Asp Val Leu Glu Leu Thr
          20          25          30

gac gac aac ttc gag agt cgc atc tcc gac acg ggc tct gcg ggc ctc      205
Asp Asp Asn Phe Glu Ser Arg Ile Ser Asp Thr Gly Ser Ala Gly Leu
          35          40          45

atg ctc gtc gag ttc ttc gct ccc tgg tgt gga cac tgc aag aga ctt      253
Met Leu Val Glu Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Arg Leu
          50          55          60

gca cct gag tat gaa gct gca gct acc aga tta aaa gga ata gtc cca      301
Ala Pro Glu Tyr Glu Ala Ala Ala Thr Arg Leu Lys Gly Ile Val Pro
          65          70          75

tta gca aag gtt gat tgc act gcc aac act aac acc tgt aat aaa tat      349
Leu Ala Lys Val Asp Cys Thr Ala Asn Thr Asn Thr Cys Asn Lys Tyr
          80          85          90          95

gga gtc agt gga tat cca acc ctg aag ata ttt aga gat ggt gaa gaa      397
Gly Val Ser Gly Tyr Pro Thr Leu Lys Ile Phe Arg Asp Gly Glu Glu
          100          105          110

gca ggt gct tat gat gga cct agg act gct gat gga att gtc agc cac      445

```

ES 2 634 623 T3

Ala Gly Ala Tyr Asp Gly Pro Arg Thr Ala Asp Gly Ile Val Ser His	
115 120 125	
ttg aag aag cag gca gga cca gct tca gtg cct ctc agg act gag gaa	493
Leu Lys Lys Gln Ala Gly Pro Ala Ser Val Pro Leu Arg Thr Glu Glu	
130 135 140	
gaa ttt aag aaa ttc att agt gat aaa gat gcc tct ata gta ggt ttt	541
Glu Phe Lys Lys Phe Ile Ser Asp Lys Asp Ala Ser Ile Val Gly Phe	
145 150 155	
ttc gat gat tca ttc agt gag gct cac tcc gag ttc cta aaa gca gcc	589
Phe Asp Asp Ser Phe Ser Glu Ala His Ser Glu Phe Leu Lys Ala Ala	
160 165 170 175	
agc aac ttg agg gat aac tac cga ttt gca cat acg aat gtt gag tct	637
Ser Asn Leu Arg Asp Asn Tyr Arg Phe Ala His Thr Asn Val Glu Ser	
180 185 190	
ctg gtg aac gag tat gat gat aat gga gag ggt atc atc tta ttt cgt	685
Leu Val Asn Glu Tyr Asp Asp Asn Gly Glu Gly Ile Ile Leu Phe Arg	
195 200 205	
cct tca cat ctc act aac aag ttt gag gac aag act gtg gca tat aca	733
Pro Ser His Leu Thr Asn Lys Phe Glu Asp Lys Thr Val Ala Tyr Thr	
210 215 220	
gag caa aaa atg acc agt ggc aaa att aaa aag ttt atc cag gaa aac	781
Glu Gln Lys Met Thr Ser Gly Lys Ile Lys Lys Phe Ile Gln Glu Asn	
225 230 235	
att ttt ggt atc tgc cct cac atg aca gaa gac aat aaa gat ttg ata	829
Ile Phe Gly Ile Cys Pro His Met Thr Glu Asp Asn Lys Asp Leu Ile	
240 245 250 255	
cag ggc aag gac tta ctt att gct tac tat gat gtg gac tat gaa aag	877
Gln Gly Lys Asp Leu Leu Ile Ala Tyr Tyr Asp Val Asp Tyr Glu Lys	
260 265 270	
aac gct aaa ggt tcc aac tac tgg aga aac agg gta atg atg gtg gca	925
Asn Ala Lys Gly Ser Asn Tyr Trp Arg Asn Arg Val Met Met Val Ala	
275 280 285	
aag aaa ttc ctg gat gct ggg cac aaa ctc aac ttt gct gta gct agc	973
Lys Lys Phe Leu Asp Ala Gly His Lys Leu Asn Phe Ala Val Ala Ser	
290 295 300	
cgc aaa acc ttt agc cat gaa ctt tct gat ttt ggc ttg gag agc act	1021
Arg Lys Thr Phe Ser His Glu Leu Ser Asp Phe Gly Leu Glu Ser Thr	
305 310 315	
gct gga gag att cct gtt gtt gct atc aga act gct aaa gga gag aag	1069
Ala Gly Glu Ile Pro Val Val Ala Ile Arg Thr Ala Lys Gly Glu Lys	
320 325 330 335	
ttt gtc atg cag gag gag ttc tcg cgt gat ggg aag gct ctg gag agg	1117
Phe Val Met Gln Glu Glu Phe Ser Arg Asp Gly Lys Ala Leu Glu Arg	
340 345 350	
ttc ctg cag gat tac ttt gat ggc aat ctg aag aga tac ctg aag tct	1165
Phe Leu Gln Asp Tyr Phe Asp Gly Asn Leu Lys Arg Tyr Leu Lys Ser	
355 360 365	

gaa cct atc cca gag agc aat gat ggg cct gtg aag gta gtg gta gca 1213
 Glu Pro Ile Pro Glu Ser Asn Asp Gly Pro Val Lys Val Val Val Ala
 370 375 380

gag aat ttt gat gaa ata gtg aat aat gaa aat aaa gat gtg ctg att 1261
 Glu Asn Phe Asp Glu Ile Val Asn Asn Glu Asn Lys Asp Val Leu Ile
 385 390 395

gaa ttt tat gcc cct tgg tgt ggt cat tgt aag aac ctg gag ccc aag 1309
 Glu Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Asn Leu Glu Pro Lys
 400 405 410 415

tat aaa gaa ctt ggc gag aag ctc agc aaa gac cca aat atc gtc ata 1357
 Tyr Lys Glu Leu Gly Glu Lys Leu Ser Lys Asp Pro Asn Ile Val Ile
 420 425 430

gcc aag atg gat gcc aca gcc aat gat gtg cct tct cca tat gaa gtc 1405
 Ala Lys Met Asp Ala Thr Ala Asn Asp Val Pro Ser Pro Tyr Glu Val
 435 440 445

aga ggt ttt cct acc ata tac ttc tct cca gcc aac aag aag cta aat 1453
 Arg Gly Phe Pro Thr Ile Tyr Phe Ser Pro Ala Asn Lys Lys Leu Asn
 450 455 460

cca aag aaa tat gaa ggt ggc cgt gaa tta agt gat ttt att agc tat 1501
 Pro Lys Lys Tyr Glu Gly Gly Arg Glu Leu Ser Asp Phe Ile Ser Tyr
 465 470 475

cta caa aga gaa gct aca aac ccc cct gta att caa gaa gaa aaa ccc 1549
 Leu Gln Arg Glu Ala Thr Asn Pro Pro Val Ile Gln Glu Glu Lys Pro
 480 485 490 495

aag aag aag aag aag gca cag gag gat ctc taa agcagtagcc aaacaccact 1602
 Lys Lys Lys Lys Lys Ala Gln Glu Asp Leu
 500 505

ttgtaaaagg actcttccat cagagatggg aaaaccattg gggaggacta ggacccatat 1662

gggaattatt acctctcagg gccgagagtc taga 1696

<210> 12
 <211> 505
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

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

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

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

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

ES 2 634 623 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Lys Lys Lys Ala Gln Glu Asp Leu
500 505

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

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

<400> 13

atg gcc aaa gcc gcg gcg atc gcc atc gac ctg gcc acc acc tac tcc 48
Met Ala Lys Ala Ala Ala Ile Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Tyr Ser

ES 2 634 623 T3

1	5	10	15	
tgc gtg ggg gtg ttc caa cac ggc aag gtg gag atc atc gcc aac gac				96
Cys Val Gly Val Phe Gln His Gly Lys Val Glu Ile Ile Ala Asn Asp	20	25	30	
cag ggc aac cgc acc acc ccc agc tac gtg gcc ttc acg gac acc gag				144
Gln Gly Asn Arg Thr Thr Pro Ser Tyr Val Ala Phe Thr Asp Thr Glu	35	40	45	
cgg ctc atc ggg gat gcg gcc aag aac cag gtg gcg ctg aac ccg cag				192
Arg Leu Ile Gly Asp Ala Ala Lys Asn Gln Val Ala Leu Asn Pro Gln	50	55	60	
aac acc gtg ttt gac gcg aag cgg ctg atc ggc cgc aag ttc ggc gac				240
Asn Thr Val Phe Asp Ala Lys Arg Leu Ile Gly Arg Lys Phe Gly Asp	65	70	75	80
ccg gtg gtg cag tcg gac atg aag cac tgg cct ttc cag gtg atc aac				288
Pro Val Val Gln Ser Asp Met Lys His Trp Pro Phe Gln Val Ile Asn	85	90	95	
gac gga gac aag ccc aag gtg cag gtg agc tac aag ggg gag acc aag				336
Asp Gly Asp Lys Pro Lys Val Gln Val Ser Tyr Lys Gly Glu Thr Lys	100	105	110	
gca ttc tac ccc gag gag atc tcg tcc atg gtg ctg acc aag atg aag				384
Ala Phe Tyr Pro Glu Glu Ile Ser Ser Met Val Leu Thr Lys Met Lys	115	120	125	
gag atc gcc gag gcg tac ctg ggc tac ccg gtg acc aac gcg gtg atc				432
Glu Ile Ala Glu Ala Tyr Leu Gly Tyr Pro Val Thr Asn Ala Val Ile	130	135	140	
acc gtg ccg gcc tac ttc aac gac tcg cag cgc cag gcc acc aag gat				480
Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asn Asp Ser Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp	145	150	155	160
gcg ggt gtg atc gcg ggg ctc aac gtg ctg cgg atc atc aac gag ccc				528
Ala Gly Val Ile Ala Gly Leu Asn Val Leu Arg Ile Ile Asn Glu Pro	165	170	175	
acg gcc gcc gcc atc gcc tac ggc ctg gac aga acg ggc aag ggg gag				576
Thr Ala Ala Ala Ile Ala Tyr Gly Leu Asp Arg Thr Gly Lys Gly Glu	180	185	190	
cgc aac gtg ctc atc ttt gac ctg ggc ggg ggc acc ttc gac gtg tcc				624
Arg Asn Val Leu Ile Phe Asp Leu Gly Gly Gly Thr Phe Asp Val Ser	195	200	205	
atc ctg acg atc gac gac ggc atc ttc gag gtg aag gcc acg gcc ggg				672
Ile Leu Thr Ile Asp Asp Gly Ile Phe Glu Val Lys Ala Thr Ala Gly	210	215	220	
gac acc cac ctg ggt ggg gag gac ttt gac aac agg ctg gtg aac cac				720
Asp Thr His Leu Gly Gly Glu Asp Phe Asp Asn Arg Leu Val Asn His	225	230	235	240
ttc gtg gag gag ttc aag aga aaa cac aag aag gac atc agc cag aac				768
Phe Val Glu Glu Phe Lys Arg Lys His Lys Lys Asp Ile Ser Gln Asn	245	250	255	
aag cga gcc gtg agg cgg ctg cgc acc gcc tgc gag agg gcc aag agg				816

ES 2 634 623 T3

Lys	Arg	Ala	Val	Arg	Arg	Leu	Arg	Thr	Ala	Cys	Glu	Arg	Ala	Lys	Arg	
			260					265					270			
acc	ctg	tcg	tcc	agc	acc	cag	gcc	agc	ctg	gag	atc	gac	tcc	ctg	ttt	864
Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Thr	Gln	Ala	Ser	Leu	Glu	Ile	Asp	Ser	Leu	Phe	
		275					280					285				
gag	ggc	atc	gac	ttc	tac	acg	tcc	atc	acc	agg	gcg	agg	ttc	gag	gag	912
Glu	Gly	Ile	Asp	Phe	Tyr	Thr	Ser	Ile	Thr	Arg	Ala	Arg	Phe	Glu	Glu	
	290					295				300						
ctg	tgc	tcc	gac	ctg	ttc	cga	agc	acc	ctg	gag	ccc	gtg	gag	aag	gct	960
Leu	Cys	Ser	Asp	Leu	Phe	Arg	Ser	Thr	Leu	Glu	Pro	Val	Glu	Lys	Ala	
305					310					315					320	
ctg	cgc	gac	gcc	aag	ctg	gac	aag	gcc	cag	att	cac	gac	ctg	gtc	ctg	1008
Leu	Arg	Asp	Ala	Lys	Leu	Asp	Lys	Ala	Gln	Ile	His	Asp	Leu	Val	Leu	
				325				330						335		
gtc	ggg	ggc	tcc	acc	cgc	atc	ccc	aag	gtg	cag	aag	ctg	ctg	cag	gac	1056
Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Arg	Ile	Pro	Lys	Val	Gln	Lys	Leu	Leu	Gln	Asp	
			340					345					350			
ttc	ttc	aac	ggg	cgc	gac	ctg	aac	aag	agc	atc	aac	ccc	gac	gag	gct	1104
Phe	Phe	Asn	Gly	Arg	Asp	Leu	Asn	Lys	Ser	Ile	Asn	Pro	Asp	Glu	Ala	
		355					360					365				
gtg	gcc	tac	ggg	gcg	gcg	gtg	cag	gcg	gcc	atc	ctg	atg	ggg	gac	aag	1152
Val	Ala	Tyr	Gly	Ala	Ala	Val	Gln	Ala	Ala	Ile	Leu	Met	Gly	Asp	Lys	
	370					375					380					
tcc	gag	aac	gtg	cag	gac	ctg	ctg	ctg	ctg	gac	gtg	gct	ccc	ctg	tcg	1200
Ser	Glu	Asn	Val	Gln	Asp	Leu	Leu	Leu	Leu	Asp	Val	Ala	Pro	Leu	Ser	
385					390					395					400	
ctg	ggg	ctg	gag	acg	gcc	gga	ggc	gtg	atg	act	gcc	ctg	atc	aag	cgc	1248
Leu	Gly	Leu	Glu	Thr	Ala	Gly	Gly	Val	Met	Thr	Ala	Leu	Ile	Lys	Arg	
				405				410						415		
aac	tcc	acc	atc	ccc	acc	aag	cag	acg	cag	atc	ttc	acc	acc	tac	tcc	1296
Asn	Ser	Thr	Ile	Pro	Thr	Lys	Gln	Thr	Gln	Ile	Phe	Thr	Thr	Tyr	Ser	
			420					425					430			
gac	aac	caa	ccc	ggg	gtg	ctg	atc	cag	gtg	tac	gag	ggc	gag	agg	gcc	1344
Asp	Asn	Gln	Pro	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Val	Tyr	Glu	Gly	Glu	Arg	Ala	
		435					440					445				
atg	acg	aaa	gac	aac	aat	ctg	ttg	ggg	cgc	ttc	gag	ctg	agc	ggc	atc	1392
Met	Thr	Lys	Asp	Asn	Asn	Leu	Leu	Gly	Arg	Phe	Glu	Leu	Ser	Gly	Ile	
	450					455					460					
cct	ccg	gcc	ccc	agg	ggc	gtg	ccc	cag	atc	gag	gtg	acc	ttc	gac	atc	1440
Pro	Pro	Ala	Pro	Arg	Gly	Val	Pro	Gln	Ile	Glu	Val	Thr	Phe	Asp	Ile	
465					470					475					480	
gat	gcc	aac	ggc	atc	ctg	aac	gtc	acg	gcc	acg	gac	aag	agc	acc	ggc	1488
Asp	Ala	Asn	Gly	Ile	Leu	Asn	Val	Thr	Ala	Thr	Asp	Lys	Ser	Thr	Gly	
				485					490					495		
aag	gcc	aac	aag	atc	acc	atc	acc	aac	gac	aag	ggc	cgc	ctg	agc	aag	1536
Lys	Ala	Asn	Lys	Ile	Thr	Ile	Thr	Asn	Asp	Lys	Gly	Arg	Leu	Ser	Lys	
			500					505					510			

gag gag atc gag cgc atg gtg cag gag gcg gag aag tac aaa gcg gag 1584
 Glu Glu Ile Glu Arg Met Val Gln Glu Ala Glu Lys Tyr Lys Ala Glu
 515 520 525

gac gag gtg cag cgc gag agg gtg tca gcc aag aac gcc ctg gag tcc 1632
 Asp Glu Val Gln Arg Glu Arg Val Ser Ala Lys Asn Ala Leu Glu Ser
 530 535 540

tac gcc ttc aac atg aag agc gcc gtg gag gat gag ggg ctc aag ggc 1680
 Tyr Ala Phe Asn Met Lys Ser Ala Val Glu Asp Glu Gly Leu Lys Gly
 545 550 555 560

aag atc agc gag gcc gac aag aag aag gtg ctg gac aag tgt caa gag 1728
 Lys Ile Ser Glu Ala Asp Lys Lys Lys Val Leu Asp Lys Cys Gln Glu
 565 570 575

gtc atc tcg tgg ctg gac gcc aac acc ttg gcc gag aag gac gag ttt 1776
 Val Ile Ser Trp Leu Asp Ala Asn Thr Leu Ala Glu Lys Asp Glu Phe
 580 585 590

gag cac aag agg aag gag ctg gag cag gtg tgt aac ccc atc atc agc 1824
 Glu His Lys Arg Lys Glu Leu Glu Gln Val Cys Asn Pro Ile Ile Ser
 595 600 605

gga ctg tac cag ggt gcc ggt ggt ccc ggg cct ggg ggc ttc ggg gct 1872
 Gly Leu Tyr Gln Gly Ala Gly Gly Pro Gly Pro Gly Gly Phe Gly Ala
 610 615 620

cag ggt ccc aag gga ggg tct ggg tca ggc ccc acc att gag gag gta 1920
 Gln Gly Pro Lys Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro Thr Ile Glu Glu Val
 625 630 635 640

gat tag 1926
 Asp

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

<400> 14

Met Ala Lys Ala Ala Ala Ile Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Tyr Ser
 1 5 10 15

Cys Val Gly Val Phe Gln His Gly Lys Val Glu Ile Ile Ala Asn Asp
 20 25 30

Gln Gly Asn Arg Thr Thr Pro Ser Tyr Val Ala Phe Thr Asp Thr Glu
 35 40 45

Arg Leu Ile Gly Asp Ala Ala Lys Asn Gln Val Ala Leu Asn Pro Gln
 50 55 60

Asn Thr Val Phe Asp Ala Lys Arg Leu Ile Gly Arg Lys Phe Gly Asp
 65 70 75 80

ES 2 634 623 T3

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

Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile Pro Lys Val Gln Lys Leu Leu Gln Asp
 340 345 350
 Phe Phe Asn Gly Arg Asp Leu Asn Lys Ser Ile Asn Pro Asp Glu Ala
 355 360 365
 Val Ala Tyr Gly Ala Ala Val Gln Ala Ala Ile Leu Met Gly Asp Lys
 370 375 380
 Ser Glu Asn Val Gln Asp Leu Leu Leu Leu Asp Val Ala Pro Leu Ser
 385 390 395 400
 Leu Gly Leu Glu Thr Ala Gly Gly Val Met Thr Ala Leu Ile Lys Arg
 405 410 415
 Asn Ser Thr Ile Pro Thr Lys Gln Thr Gln Ile Phe Thr Thr Tyr Ser
 420 425 430
 Asp Asn Gln Pro Gly Val Leu Ile Gln Val Tyr Glu Gly Glu Arg Ala
 435 440 445
 Met Thr Lys Asp Asn Asn Leu Leu Gly Arg Phe Glu Leu Ser Gly Ile
 450 455 460
 Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln Ile Glu Val Thr Phe Asp Ile
 465 470 475 480
 Asp Ala Asn Gly Ile Leu Asn Val Thr Ala Thr Asp Lys Ser Thr Gly
 485 490 495
 Lys Ala Asn Lys Ile Thr Ile Thr Asn Asp Lys Gly Arg Leu Ser Lys
 500 505 510
 Glu Glu Ile Glu Arg Met Val Gln Glu Ala Glu Lys Tyr Lys Ala Glu
 515 520 525
 Asp Glu Val Gln Arg Glu Arg Val Ser Ala Lys Asn Ala Leu Glu Ser
 530 535 540
 Tyr Ala Phe Asn Met Lys Ser Ala Val Glu Asp Glu Gly Leu Lys Gly
 545 550 555 560
 Lys Ile Ser Glu Ala Asp Lys Lys Lys Val Leu Asp Lys Cys Gln Glu
 565 570 575
 Val Ile Ser Trp Leu Asp Ala Asn Thr Leu Ala Glu Lys Asp Glu Phe

ES 2 634 623 T3

	580		585		590
Glu His Lys Arg Lys Glu Leu Glu Gln Val Cys Asn Pro Ile Ile Ser					
595		600		605	
Gly Leu Tyr Gln Gly Ala Gly Gly Pro Gly Pro Gly Gly Phe Gly Ala					
610		615		620	
Gln Gly Pro Lys Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro Thr Ile Glu Glu Val					
625		630		635	640

Asp

<210> 15
 <211> 1023
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1023)

<400> 15

atg ggt aaa gac tac tac cag acg ttg ggc ctg gcc cgc ggc gcg tcg	48
Met Gly Lys Asp Tyr Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ala Arg Gly Ala Ser	
1 5 10 15	
gac gag gag atc aag cgg gcc tac cgc cgc cag gcg ctg cgc tac cac	96
Asp Glu Glu Ile Lys Arg Ala Tyr Arg Arg Gln Ala Leu Arg Tyr His	
20 25 30	
ccg gac aag aac aag gag ccc ggc gcc gag gag aag ttc aag gag atc	144
Pro Asp Lys Asn Lys Glu Pro Gly Ala Glu Glu Lys Phe Lys Glu Ile	
35 40 45	
gct gag gcc tac gac gtg ctc agc gac ccg cgc aag cgc gag atc ttc	192
Ala Glu Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Arg Lys Arg Glu Ile Phe	
50 55 60	
gac cgc tac ggg gag gaa ggc cta aag ggg agt ggc ccc agt ggc ggt	240
Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Lys Gly Ser Gly Pro Ser Gly Gly	
65 70 75 80	
agc ggc ggt ggt gcc aat ggt acc tct ttc agc tac aca ttc cat gga	288
Ser Gly Gly Gly Ala Asn Gly Thr Ser Phe Ser Tyr Thr Phe His Gly	
85 90 95	
gac cct cat gcc atg ttt gct gag ttc ttc ggt ggc aga aat ccc ttt	336
Asp Pro His Ala Met Phe Ala Glu Phe Phe Gly Gly Arg Asn Pro Phe	
100 105 110	
gac acc ttt ttt ggg cag cgg aac ggg gag gaa ggc atg gac att gat	384
Asp Thr Phe Phe Gly Gln Arg Asn Gly Glu Glu Gly Met Asp Ile Asp	
115 120 125	
gac cca ttc tct ggc ttc cct atg ggc atg ggt ggc ttc acc aac gtg	432

ES 2 634 623 T3

Asp	Pro	Phe	Ser	Gly	Phe	Pro	Met	Gly	Met	Gly	Gly	Phe	Thr	Asn	Val		
130						135					140						
aac	ttt	ggc	cgc	tcc	cgc	tct	gcc	caa	gag	ccc	gcc	cga	aag	aag	caa	480	
Asn	Phe	Gly	Arg	Ser	Arg	Ser	Ala	Gln	Glu	Pro	Ala	Arg	Lys	Lys	Gln		
145					150					155					160		
gat	ccc	cca	gtc	acc	cac	gac	ctt	cga	gtc	tcc	ctt	gaa	gag	atc	tac	528	
Asp	Pro	Pro	Val	Thr	His	Asp	Leu	Arg	Val	Ser	Leu	Glu	Glu	Ile	Tyr		
				165					170					175			
agc	ggc	tgt	acc	aag	aag	atg	aaa	atc	tcc	cac	aag	cgg	cta	aac	ccc	576	
Ser	Gly	Cys	Thr	Lys	Lys	Met	Lys	Ile	Ser	His	Lys	Arg	Leu	Asn	Pro		
			180					185					190				
gac	gga	aag	agc	att	cga	aac	gaa	gac	aaa	ata	ttg	acc	atc	gaa	gtg	624	
Asp	Gly	Lys	Ser	Ile	Arg	Asn	Glu	Asp	Lys	Ile	Leu	Thr	Ile	Glu	Val		
		195					200					205					
aag	aag	ggg	tgg	aaa	gaa	gga	acc	aaa	atc	act	ttc	ccc	aag	gaa	gga	672	
Lys	Lys	Gly	Trp	Lys	Glu	Gly	Thr	Lys	Ile	Thr	Phe	Pro	Lys	Glu	Gly		
		210				215					220						
gac	cag	acc	tcc	aac	aac	att	cca	gct	gat	atc	gtc	ttt	gtt	tta	aag	720	
Asp	Gln	Thr	Ser	Asn	Asn	Ile	Pro	Ala	Asp	Ile	Val	Phe	Val	Leu	Lys		
225					230					235					240		
gac	aag	ccc	cac	aat	atc	ttt	aag	aga	gat	ggc	tct	gat	gtc	att	tat	768	
Asp	Lys	Pro	His	Asn	Ile	Phe	Lys	Arg	Asp	Gly	Ser	Asp	Val	Ile	Tyr		
				245					250					255			
cct	gcc	agg	atc	agc	ctc	cgg	gag	gct	ctg	tgt	ggc	tgc	aca	gtg	aac	816	
Pro	Ala	Arg	Ile	Ser	Leu	Arg	Glu	Ala	Leu	Cys	Gly	Cys	Thr	Val	Asn		
				260				265						270			
gtc	ccc	act	ctg	gac	ggc	agg	acg	ata	ccc	gtc	gta	ttc	aaa	gat	gtt	864	
Val	Pro	Thr	Leu	Asp	Gly	Arg	Thr	Ile	Pro	Val	Val	Phe	Lys	Asp	Val		
			275				280					285					
atc	agg	cct	ggc	atg	cgg	cga	aaa	gtt	cct	gga	gaa	ggc	ctc	ccc	ctc	912	
Ile	Arg	Pro	Gly	Met	Arg	Arg	Lys	Val	Pro	Gly	Glu	Gly	Leu	Pro	Leu		
						295					300						
ccc	aaa	aca	ccc	gag	aaa	cgt	ggg	gac	ctc	att	att	gag	ttt	gaa	gtg	960	
Pro	Lys	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Gly	Asp	Leu	Ile	Ile	Glu	Phe	Glu	Val		
305					310					315					320		
atc	ttc	ccc	gaa	agg	att	ccc	cag	aca	tca	aga	acc	gta	ctt	gag	cag	1008	
Ile	Phe	Pro	Glu	Arg	Ile	Pro	Gln	Thr	Ser	Arg	Thr	Val	Leu	Glu	Gln		
				325					330					335			
gtt	ctt	cca	ata	tag												1023	
Val	Leu	Pro	Ile														
				340													

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

<400> 16

ES 2 634 623 T3

Met	Gly	Lys	Asp	Tyr	Tyr	Gln	Thr	Leu	Gly	Leu	Ala	Arg	Gly	Ala	Ser	1	5	10	15
Asp	Glu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Tyr	Arg	Arg	Gln	Ala	Leu	Arg	Tyr	His	20	25	30	
Pro	Asp	Lys	Asn	Lys	Glu	Pro	Gly	Ala	Glu	Glu	Lys	Phe	Lys	Glu	Ile	35	40	45	
Ala	Glu	Ala	Tyr	Asp	Val	Leu	Ser	Asp	Pro	Arg	Lys	Arg	Glu	Ile	Phe	50	55	60	
Asp	Arg	Tyr	Gly	Glu	Glu	Gly	Leu	Lys	Gly	Ser	Gly	Pro	Ser	Gly	Gly	65	70	75	80
Ser	Gly	Gly	Gly	Ala	Asn	Gly	Thr	Ser	Phe	Ser	Tyr	Thr	Phe	His	Gly	85	90	95	
Asp	Pro	His	Ala	Met	Phe	Ala	Glu	Phe	Phe	Gly	Gly	Arg	Asn	Pro	Phe	100	105	110	
Asp	Thr	Phe	Phe	Gly	Gln	Arg	Asn	Gly	Glu	Glu	Gly	Met	Asp	Ile	Asp	115	120	125	
Asp	Pro	Phe	Ser	Gly	Phe	Pro	Met	Gly	Met	Gly	Gly	Phe	Thr	Asn	Val	130	135	140	
Asn	Phe	Gly	Arg	Ser	Arg	Ser	Ala	Gln	Glu	Pro	Ala	Arg	Lys	Lys	Gln	145	150	155	160
Asp	Pro	Pro	Val	Thr	His	Asp	Leu	Arg	Val	Ser	Leu	Glu	Glu	Ile	Tyr	165	170	175	
Ser	Gly	Cys	Thr	Lys	Lys	Met	Lys	Ile	Ser	His	Lys	Arg	Leu	Asn	Pro	180	185	190	
Asp	Gly	Lys	Ser	Ile	Arg	Asn	Glu	Asp	Lys	Ile	Leu	Thr	Ile	Glu	Val	195	200	205	
Lys	Lys	Gly	Trp	Lys	Glu	Gly	Thr	Lys	Ile	Thr	Phe	Pro	Lys	Glu	Gly	210	215	220	
Asp	Gln	Thr	Ser	Asn	Asn	Ile	Pro	Ala	Asp	Ile	Val	Phe	Val	Leu	Lys	225	230	235	240
Asp	Lys	Pro	His	Asn	Ile	Phe	Lys	Arg	Asp	Gly	Ser	Asp	Val	Ile	Tyr	245	250	255	

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

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

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

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

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

Val Leu Pro Ile
340

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

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

<400> 17

atg acc acc tca gca agt tcc cac tta aat aaa ggc atc aag cag gtg	48
Met Thr Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Val	
1 5 10 15	
tac atg tcc ctg cct cag ggt gag aaa gtc cag gcc atg tat atc tgg	96
Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp	
20 25 30	
atc gat ggt act gga gaa gga ctg cgc tgc aag acc cgg acc ctg gac	144
Ile Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp	
35 40 45	
agt gag ccc aag tgt gtg gaa gag ttg cct gag tgg aat ttc gat ggc	192
Ser Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Asp Gly	
50 55 60	
tcc agt act tta cag tct gag ggt tcc aac agt gac atg tat ctc gtg	240
Ser Ser Thr Leu Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu Val	
65 70 75 80	
cct gct gcc atg ttt cgg gac ccc ttc cgt aag gac cct aac aag ctg	288
Pro Ala Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu	
85 90 95	
gtg tta tgt gaa gtt ttc aag tac aat cga agg cct gca gag acc aat	336
Val Leu Cys Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Arg Pro Ala Glu Thr Asn	
100 105 110	

ES 2 634 623 T3

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

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

5

<400> 18

```

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

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
      20      25      30

Ile Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
      35      40      45

Ser Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Asp Gly
      50      55      60

Ser Ser Thr Leu Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu Val
65      70      75      80

Pro Ala Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu
      85      90      95

Val Leu Cys Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Arg Pro Ala Glu Thr Asn
      100      105      110

Leu Arg His Thr Cys Lys Arg Ile Met Asp Met Val Ser Asn Gln His
      115      120      125

Pro Trp Phe Gly Met Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Met Gly Thr Asp Gly
      130      135      140

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

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

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

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

```

ES 2 634 623 T3

195					200					205					
Cys	Glu	Gly	Ile	Ser	Met	Gly	Asp	His	Leu	Trp	Val	Ala	Arg	Phe	Ile
210						215					220				
Leu	His	Arg	Val	Cys	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Ile	Ala	Thr	Phe	Asp	Pro
225					230					235					240
Lys	Pro	Ile	Pro	Gly	Asn	Trp	Asn	Gly	Ala	Gly	Cys	His	Thr	Asn	Phe
				245					250					255	
Ser	Thr	Lys	Ala	Met	Arg	Glu	Glu	Asn	Gly	Leu	Lys	Tyr	Ile	Glu	Glu
			260					265					270		
Ala	Ile	Glu	Lys	Leu	Ser	Lys	Arg	His	Gln	Tyr	His	Ile	Arg	Ala	Tyr
	275						280					285			
Asp	Pro	Lys	Gly	Gly	Leu	Asp	Asn	Ala	Arg	Arg	Leu	Thr	Gly	Phe	His
290						295					300				
Glu	Thr	Ser	Asn	Ile	Asn	Asp	Phe	Ser	Ala	Gly	Val	Ala	Asn	Arg	Ser
305					310					315					320
Ala	Ser	Ile	Arg	Ile	Pro	Arg	Thr	Val	Gly	Gln	Glu	Lys	Lys	Gly	Tyr
				325					330					335	
Phe	Glu	Asp	Arg	Arg	Pro	Ser	Ala	Asn	Cys	Asp	Pro	Phe	Ser	Val	Thr
			340					345					350		
Glu	Ala	Leu	Ile	Arg	Thr	Cys	Leu	Leu	Asn	Glu	Thr	Gly	Asp	Glu	Pro
		355					360					365			
Phe	Gln	Tyr	Lys	Asn											
	370														

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

<400> 19

ES 2 634 623 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 20
 agggaaccgc atggccaaag 20

<210> 21
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 21
 gaaaggcccc taatctacct cctca 25

5	<210> 22 <211> 3 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Péptido sintético	
10	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (1)..(1) <223> N-benzoílo	
15	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (3)..(3) <223> Xaa es Arg-pNA	
	<400> 22	
20		Pro Phe Xaa 1

REIVINDICACIONES

1. Una célula huésped de mamífero para la expresión potenciada de un producto proteico recombinante, teniendo dicha célula de mamífero material genético que codifica la expresión de dicho producto proteico recombinante y transformado con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica la proteína chaperona calnexina, en la que dicho producto proteico recombinante es Factor VIII.
2. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la reivindicación 1, en la que se secreta el producto proteico recombinante.
3. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el material genético que codifica la expresión de dicho producto proteico recombinante está integrado en el ADN de la célula huésped.
4. La célula huésped de mamífero de acuerdo con la reivindicación 3, transformada además con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína glutamina sintetasa.
5. Un procedimiento de producción de una célula huésped de mamífero de la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento:
proporcionar una célula de mamífero que tiene material genético que codifica la expresión de una proteína recombinante diana o fragmento de la misma; y
transformar la célula de mamífero con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica la proteína chaperona calnexina.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que se secreta el producto proteico recombinante.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el material genético que codifica la expresión de dicho producto proteico recombinante se integra en el ADN de la célula huésped.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, transformado además con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína glutamina sintetasa.
9. Un procedimiento de producción de un producto proteico recombinante secretado que comprende las etapas de:
cultivar una célula huésped de mamífero de la reivindicación 1; y
recuperar del medio de cultivo el producto proteico recombinante producido y secretado de este modo.
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el material genético que codifica la expresión de dicho producto proteico recombinante se integra en el ADN de la célula huésped;
preferentemente en el que dicha célula huésped de mamífero se transforma adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína glutamina sintetasa.
11. Un procedimiento para potenciar el rendimiento de proteína recombinante, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
insertar al menos un vector de expresión de proteína chaperona en una primera línea celular para formar una línea celular modificada, en el que previamente se ha introducido material genético que codifica la expresión de dicha proteína recombinante en la línea celular para formar la primera línea celular, en el que la proteína chaperona es calnexina y en el que la proteína recombinante es Factor VIII; y
seleccionar de dicha línea celular modificada al menos una segunda línea celular que muestra rendimiento potenciado de la proteína recombinante.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el material genético que codifica la expresión de dicha proteína recombinante se integra en el ADN de la primera línea celular;
preferentemente en el que la segunda línea celular se transforma adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína glutamina sintetasa.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que al menos una segunda línea celular se produce a partir de dicha primera línea celular seleccionando una parte de dicha primera línea celular que muestra integración del vector de expresión de proteína chaperona en el ADN del huésped.

CNX: cebador 5' : ATGAATTCCGGGAGGCTAGAGATCATGG
 cebador 3' : ATTCTAGATGCAGGGGAGGAGGGAGAAG
CRT: cebador 5' : ATGAATTCCGCCATGCTGCTATCCGTG
 cebador 3' : ATTCTAGACTGGAGGCAGGCCTCTCTAC
Erp57: cebador 5' : ATGAATTCCTCCGCAGTCCCAGCCGAGC
 cebador 3' : ATTCTAGACTCTCGGCCCTGAGAGGTAA

FIG. 1

```

                                M E G   K W L
1  GAATTCCGGG AGGCTAGAGA TCATGGAAGG GAAGTGGTTG
   L C M L   L V L   G T A   I V E A .
41 CTGTGTATGT TACTGGTGCT TGGAAGTCTGCT ATTGTTGAGG
   . H D G   H D D   D V I D   I E D .
81 CTCATGATGG ACATGATGAT GATGTGATTG ATATTGAGGA
   . D L D   D V I E   E V E   D S K
121 TGACCTTGAC GATGTCATTG AAGAGGTAGA AGACTCAAAA
   P D T T   A P P   S S P   K V T Y .
161 CCAGATACCA CTGCTCCTCC TTCATCTCCC AAGGTTACTT
   . K A P   V P T   G E V Y   F A D .
201 ACAAAGCTCC AGTTCCAACA GGGGAAGTAT ATTTTGCTGA
   . S F D   R G T L   S G W   I L S
241 TTCTTTTGAC AGAGGAACTC TGTCAGGGTG GATTTTATCC
   K A K K   D D T   D D E   I A K Y .
281 AAAGCCAAGA AAGACGATAC CGATGATGAA ATTGCCAAAT
   . D G K   W E V   E E M K   E S K .
321 ATGATGGAAA GTGGGAGGTA GAGGAAATGA AGGAGTCAAA
   . L P G   D K G L   V L M   S R A
361 GCTTCCAGGT GATAAAGGAC TTGTGTTGAT GTCTCGGGCC
   K H H A   I S A   K L N   K P F L .
401 AAGCATCATG CCATCTCTGC TAAACTGAAC AAGCCCTTCC
   . F D T   K P L   I V Q Y   E V N .
441 TGTTTGACAC CAAGCCTCTC ATTGTTTCAGT ATGAGGTAA
   . F Q N   G I E C   G G A   Y V K
481 TTTCCAAAAT GGAATAGAAT GTGGTGGTGC CTATGTGAAA
   L L S K   T P E   L N L   D Q F H .
521 CTGCTTTCTA AAACACCAGA ACTCAACCTG GATCAGTTCC
   . D K T   P Y T   I M F G   P D K .
561 ATGACAAGAC CCCTTATACG ATTATGTTTG GTCCAGATAA
   . C G E   D Y K L   H F I   F R H
601 ATGTGGAGAG GACTATAAAC TGCACTTCAT CTTCCGACAC
   K N P K   T G I   Y E E   K H A K .
641 AAAAACCCCA AAACGGGTAT CTATGAAGAA AAACATGCTA
   . R P D   A D L   K T Y F   T D K .
681 AGAGGCCAGA TGCAGATCTG AAGACCTATT TTACTGATAA
   . K T H   L Y T L   I L N   P D N

```

FIG. 2A

```

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

```

FIG. 2A (Continuación)

```

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

```

FIG. 2A(Continuación)

```

          M L L S V P L L L G .
1  GAATTCCCGC CATGCTGCTA TCCGTGCCGC TGCTGCTCGG
   · L L G L A V A E P A V Y F
41 CCTCCTCGGC CTGGCCGTCG CCGAGCCTGC CGTCTACTTC
   K E Q F L D G D G W T S R W .
81 AAGGAGCAGT TTCTGGACGG AGACGGGTGG ACTTCCCGCT
   · I E S K H K S D F G K F V .
121 GGATCGAATC CAAACACAAG TCAGATTTTG GCAAATTCGT
   · L S S G K F Y G D E E K D
161 TCTCAGTTCC GGCAAGTTCT ACGGTGACGA GGAGAAAGAT
   K G L Q T S Q D A R F Y A L .
201 AAAGGTTTGC AGACAAGCCA GGATGCACGC TTTTATGCTC
   · S A S F E P F S N K G Q T .
241 TGTCGGCCAG TTTCGAGCCT TTCAGCAACA AAGGCCAGAC
   · L V V Q F T V K H E Q N I
281 GCTGGTGGTG CAGTTCACGG TGAAACATGA GCAGAACATC
   D C G G G Y V K L F P N S L .
321 GACTGTGGGG GCGGCTATGT GAAGCTGTTT CCTAATAGTT
   · D Q T D M H G D S E Y N I .
361 TGGACCAGAC AGACATGCAC GGAGACTCAG AATACAACAT
   · M F G P D I C G P G T K K
401 CATGTTTGGT CCCGACATCT GTGGCCCTGG CACCAAGAAG
   V H V I F N Y K G K N V L I .
441 GTTCATGTCA TCTTCAACTA CAAGGGCAAG AACGTGCTGA
   · N K D I R C K D D E F T H .
481 TCAACAAGGA CATCCGTTGC AAGGATGATG AGTTTACACA
   · L Y T L I V R P D N T Y E
521 CCTGTACACA CTGATTGTGC GGCCAGACAA CACCTATGAG
   V K I D N S Q V E S G S L E .
561 GTGAAGATTG ACAACAGCCA GGTGGAGTCC GGCTCCTTGG
   · D D W D F L P P K K I K D .
601 AAGACGATTG GGACTTCCTG CCACCCAAGA AGATAAAGGA
   · P D A S K P E D W D E R A
641 TCCTGATGCT TCAAAACCGG AAGACTGGGA TGAGCGGGCC
   K I D D P T D S K P E D W D .
681 AAGATCGATG ATCCCACAGA CTCCAAGCCT GAGGACTGGG
   · K P E H I P D P D A K K P .
721 ACAAGCCCGA GCATATCCCT GACCCTGATG CTAAGAAGCC
   · E D W D E E M D G E W E P

```

FIG. 2B

```

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

```

FIG. 2B(Continuación)

```

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

```

FIG. 2C

```

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

```

FIG. 2C (Continuación)

```

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

```

FIG. 2C (Continuación)

```

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

```

FIG. 2D

```

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

```

FIG. 2D(Continuación)

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

FIG. 2E

```

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

```

FIG. 2E (Continuación)

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

FIG. 2F

```

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

```

FIG. 2F (Continuación)

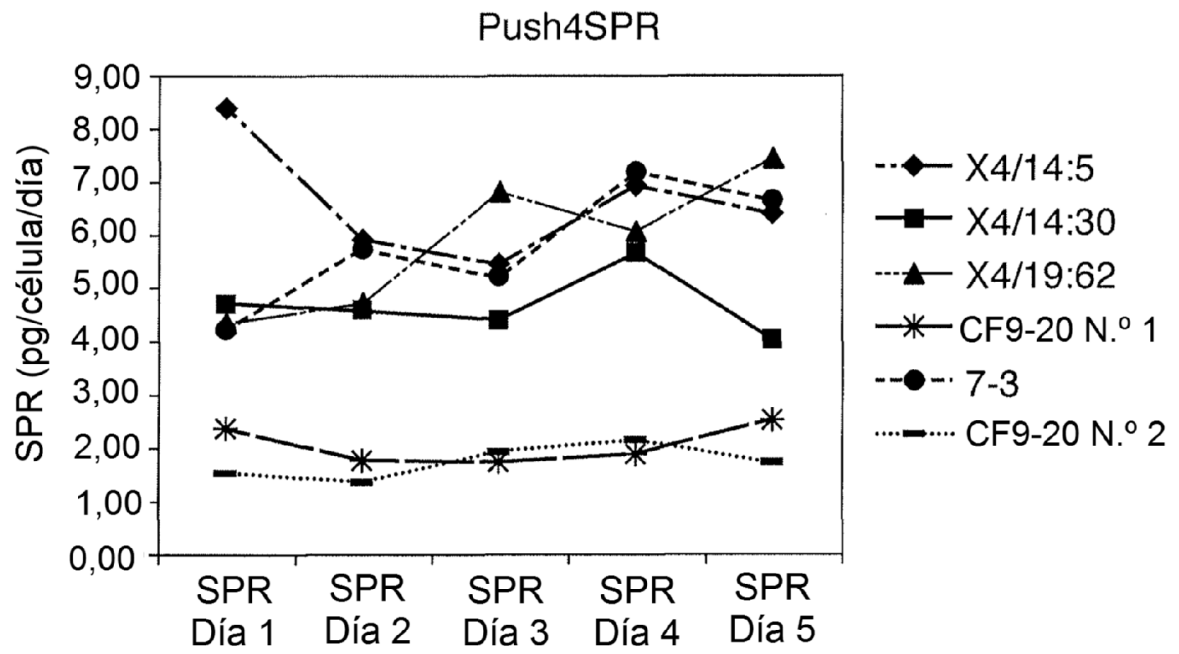


FIG. 3

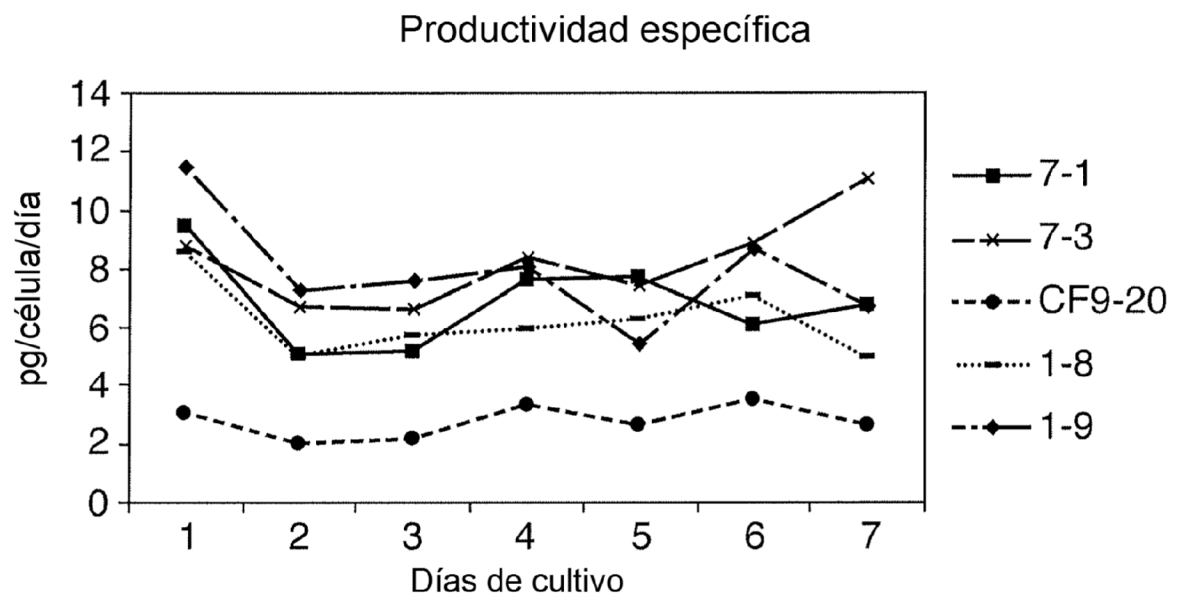


FIG. 4

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

FIG. 5