

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 276**

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.02.2009 PCT/EP2009/051672**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2009 WO09101160**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2009 E 09710039 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 2257618**

54 Título: **Producción de polipéptidos glicosilados en microalgas**

30 Prioridad:

12.02.2008 EP 08300090

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

05.12.2019

73 Titular/es:

**INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR
L'EXPLOITATION DE LA MER (IFREMER) (33.3%)
155, rue Jean-Jacques Rousseau
92130 Issy-les-Moulineaux Cedex , FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%) y
UNIVERSITÉ DE ROUEN-NORMANDIE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**CADORET, JEAN-PAUL;
CARLIER, AUDE;
LEROUGE, PATRICE;
BARDOR, MURIEL;
BUREL, CAROLE y
MAURY, FLORIAN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 734 276 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

Producción de polipéptidos glicosilados en microalgas

Campo de la invención

5 La presente invención está dirigida a métodos para producir proteínas glicosiladas (glicoproteínas) en microalgas, teniendo dichos polipéptidos glicosilados patrones de glicosilación adecuados para fines terapéuticos.

Antecedentes de la invención

Después de que el DNA se transcribe y se traduce en una proteína, el procesamiento adicional posterior a la traducción implica la unión de los restos de azúcar, un proceso conocido como glicosilación. Diferentes organismos producen diferentes enzimas de glicosilación (glicosiltransferasas y glicosidasas), y tienen diferentes sustratos (azúcares de nucleótidos) disponibles, de modo que los patrones de glicosilación, así como la composición de los oligosacáridos individuales, incluso de la misma proteína, serán diferentes dependiendo del sistema huésped en el que se expresa la proteína particular. Las bacterias típicamente no glicosilan las proteínas y, de ser así, solo de una manera muy inespecífica. Los eucariotas inferiores, tales como los hongos y levaduras filamentosas, agregan principalmente azúcares de manosa y manosilfosfato. El glicano resultante se conoce como un glicano de tipo "poli-manosa" o un manano.

Por el contrario, en eucariotas superiores tal como los humanos, las células vegetales y las células de insecto, la cadena lateral de oligosacáridos naciente puede recortarse para eliminar varios restos de manosa y alargarse con restos de azúcar adicionales que normalmente no se encuentran en los N-glicanos de eucariotas inferiores, tales como hongos y levaduras filamentosas. Esta síntesis comienza con un conjunto de reacciones secuenciales en el curso de las cuales los restos de azúcar se añaden y eliminan mientras la proteína se mueve a lo largo de la vía secretora en el organismo huésped. Sin embargo, las enzimas que residen en el aparato de Golgi del organismo o célula huésped difieren en sus especificidades y, por lo tanto, determinan los patrones de glicosilación resultantes de las proteínas secretadas.

Por lo tanto, el patrón de glicosilación resultante de proteínas expresadas en células huésped eucariotas tales como levadura, plantas o insectos, difiere sustancialmente del patrón de glicosilación de proteínas expresadas en humanos y otros mamíferos.

Las primeras etapas de la glicosilación de proteínas de mamíferos se pueden dividir en al menos cuatro fases diferentes:

30 (i) los oligosacáridos unidos a lípidos se ensamblan mediante un conjunto secuencial de reacciones en la membrana del retículo endoplásmico (ER) y

(ii) la transferencia de este oligosacárido desde el pirofosfato de dolicol de anclaje lipídico sobre la proteína sintetizada novo. El sitio de la transferencia específica se define mediante un resto de asparagina (Asn) en la secuencia Asn-Xaa-Ser/Thr donde Xaa puede ser cualquier aminoácido excepto prolina y ácido aspártico.

35 (iii) el procesamiento adicional por glucosidasas y manosidasas se produce en el ER antes de que la glicoproteína naciente se transfiera al aparato de cis-Golgi, donde los restos de manosa adicionales se eliminan mediante α 1, 2-manosidasas específicas de Golgi.

40 (iv) el procesamiento continúa a medida que la proteína avanza a través del aparato de Golgi. En la mediana del Golgi, un número de enzimas modificadoras, incluyendo N-acetilglucosaminiltransferasas (GnTI, GnTII, GnTIII, GnTIV y GnTV), manosidasa II y fucosiltransferasas, añaden y eliminan restos de azúcar específicos. Finalmente, en el trans-Golgi, galactosiltransferasas (GalT) y sialiltransferasas (ST) producen una estructura de glicoproteína que se libera del Golgi. Es esta estructura, caracterizada por estructuras bi, tri y tetraantenarias, que contienen galactosa, fucosa, N-acetilglucosamina y un alto grado de ácido siálico terminal que le da a las glicoproteínas sus características de mamífero.

45 En casi todos los eucariotas, las glicoproteínas se derivan de un precursor de oligosacárido unido a lípidos común $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -dolicol-pirofosfato. Dentro del retículo endoplásmico, la síntesis y procesamiento de oligosacáridos unidos a pirofosfato de dolicol son idénticos entre todos los eucariotas conocidos.

50 Sin embargo, el procesamiento adicional del oligosacárido central por las células de hongos, plantas o insectos una vez que se ha transferido a un péptido que sale del ER y entra al Golgi, difiere significativamente de los humanos a medida que se mueve a lo largo de la vía secretora e implica en el aparato de Golgi la adición de varios azúcares específicos del organismo.

Una fracción significativa de proteínas aisladas de humanos u otros animales se glicosila. Entre las proteínas utilizadas terapéuticamente, aproximadamente el 70% están glicosiladas. Sin embargo, si una proteína terapéutica se produce en un organismo huésped tal como levaduras u hongos, y está glicosilada utilizando la vía endógena, su

eficacia terapéutica se reduce considerablemente. Dichas glicoproteínas son típicamente inmunogénicas en seres humanos y muestran una vida media reducida in vivo después de la administración. Los receptores específicos en humanos y animales pueden reconocer los restos de manosa terminales y promover la rápida eliminación de la proteína del torrente sanguíneo. Los efectos adversos adicionales pueden incluir cambios en el plegamiento de proteínas, solubilidad, susceptibilidad a las proteasas, tráfico, transporte, compartimentación, secreción, actividad biológica, reconocimiento por otras proteínas o factores, antigenicidad o alergenidad.

En consecuencia, ha sido necesario producir glicoproteínas terapéuticas en sistemas huéspedes de animales, de modo que el patrón de glicosilación sea idéntico o al menos similar al de los humanos o en las especies receptoras previstas. En la mayoría de los casos, se utiliza un sistema huésped de mamíferos, como el cultivo de células de mamíferos.

Para producir proteínas terapéuticas que tengan glicofomas apropiadas y tengan efectos terapéuticos satisfactorios, se han utilizado sistemas de expresión basados en plantas o animales. Los sistemas disponibles incluyen:

- células de ovario de hámster chino (CHO), células de fibroblastos de ratón y células de mieloma de ratón;
- animales transgénicos como cabras, ovejas, ratones y otros;
- levaduras (tal como *S. pombe*, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*), bacterias (tal como *E. Coli*), hongos (tal como *A. nidulans*, *T. reesei*);
- plantas (tal como *A. thaliana*, *N. tabacum*, *M. sativa* etc.);
- células de insectos (tal como *S. frugiperda* Sf9, Sf21, *Trichoplusia ni*, etc. en combinación con baculovirus recombinantes tales como el virus de polihedrosis nuclear múltiple de *A. californica* que infecta las células lepidópteras).

Las proteínas humanas recombinantes expresadas en los sistemas huésped anteriormente mencionados pueden incluir además glicofomas no humanas. En particular, la fracción de los N-glicanos puede carecer de ácido siálico terminal, que se encuentra típicamente en las glicoproteínas humanas. Se han dirigido esfuerzos sustanciales para desarrollar procesos para obtener glicoproteínas que estén lo más cerca posible de la estructura de las formas humanas, o que tengan otras ventajas terapéuticas, tal como tener glicofomas específicas que pueden ser especialmente útiles, por ejemplo, en la selección de proteínas terapéuticas. Por ejemplo, la adición de uno o más restos de ácido siálico a una cadena lateral del glicano puede aumentar la vida útil de una glicoproteína terapéutica in vivo después de la administración. En consecuencia, las células huésped de mamíferos pueden modificarse genéticamente para aumentar la extensión del ácido siálico terminal en las glicoproteínas expresadas en las células. Alternativamente, el ácido siálico puede conjugarse con la proteína de interés *in vitro* antes de la administración utilizando una sialiltransferasa y un sustrato apropiado. Además, los cambios en la composición del medio de crecimiento o la expresión de las enzimas implicadas en la glicosilación humana se han empleado para producir glicoproteínas que se parecen más a las formas humanas. Alternativamente, pueden utilizarse células humanas cultivadas.

Sin embargo, todos los sistemas existentes tienen inconvenientes significativos. Solo ciertas proteínas terapéuticas son adecuadas para la expresión en sistemas animales o vegetales (por ejemplo, aquellas que carecen de cualquier efecto citotóxico u otro efecto adverso al crecimiento).

Los sistemas de cultivo de células animales y vegetales pueden ser muy lentos, y con frecuencia requieren hasta una semana de crecimiento en condiciones cuidadosamente controladas para producir cualquier cantidad útil de la proteína de interés. No obstante, los rendimientos proteicos se comparan desfavorablemente con los de los procesos de fermentación microbiana. Además, los sistemas de cultivo de células animales requieren típicamente nutrientes y cofactores complejos y costosos, tal como el suero fetal bovino. Además, el crecimiento puede estar limitado por la muerte celular programada (apoptosis).

Además, las células animales (particularmente las células de mamíferos) son altamente susceptibles a la infección o contaminación viral. En algunos casos, el virus u otro agente infeccioso puede comprometer solo el crecimiento del cultivo, mientras que en otros casos; este agente puede ser un patógeno humano que hace que el producto proteico terapéutico no sea apto para su uso previsto. Además, muchos procesos de cultivo celular requieren el uso de componentes de medios de crecimiento derivados de animales complejos, sensibles a la temperatura, que pueden comportar patógenos como los priones de encefalopatía espongiforme bovina (BSE). Dichos patógenos son difíciles de detectar y/o difíciles de eliminar o esterilizar sin comprometer el medio de crecimiento. En cualquier caso, el uso de células animales para producir proteínas terapéuticas requiere controles de calidad costosos para garantizar la seguridad del producto.

Los animales transgénicos pueden utilizarse también para fabricar grandes volúmenes de proteínas terapéuticas tales como albúmina sérica humana, activador tisular del plasminógeno, anticuerpos monoclonales, hemoglobina, colágeno, fibrinógeno y otros. Si bien las cabras transgénicas y otros animales transgénicos (ratones, ovejas, vacas,

etc.) pueden diseñarse genéticamente para producir proteínas terapéuticas en altas concentraciones en la leche, el proceso es costoso ya que cada lote debe someterse a un riguroso control de calidad. Los animales pueden albergar una variedad de patógenos humanos o animales, incluyendo bacterias, virus, hongos y priones. En el caso de los rasguños y la encefalopatía espongiforme bovina, las pruebas pueden demorar aproximadamente un año para descartar una infección. La producción de compuestos terapéuticos se lleva a cabo preferiblemente en un ambiente estéril bien controlado, por ejemplo, bajo buenas condiciones de fabricación (GMP). Sin embargo, generalmente no es factible mantener animales en dichos ambientes. Además, mientras que las células cultivadas en un fermentador se derivan de un Master Cell Bank (MCB) bien caracterizado, la tecnología de los animales transgénicos se basa en diferentes animales y, por lo tanto, es inherentemente no uniforme. Además, factores externos tal como la absorción de alimentos, la enfermedad y la falta de homogeneidad dentro de un hato pueden afectar los patrones de glicosilación del producto final. Se sabe que, en los seres humanos, por ejemplo, los diferentes hábitos alimenticios dan como resultado diferentes patrones de glicosilación.

Las plantas transgénicas se han desarrollado como una fuente potencial para obtener proteínas de valor terapéutico. Sin embargo, el alto nivel de expresión de proteínas en plantas sufre de silenciamiento génico, un mecanismo por el cual los genes para proteínas altamente expresadas son posteriormente regulados en las siguientes generaciones de plantas. Además, las plantas añaden xilosa con enlaces β (1,2) y/o fucosa con enlaces α (1,3) a los N-glicanos de la proteína, dando como resultado glicoproteínas que difieren en la estructura de los animales y son inmunogénicas en los mamíferos. Además, generalmente no es práctico cultivar plantas en un ambiente estéril o GMP, y la recuperación de proteínas de los tejidos de las plantas es más costosa que la recuperación de microorganismos fermentados.

Los sistemas de levaduras u hongos transgénicos también presentan el inconveniente de expresar los genes de la manosiltransferasa, que añade manosa a la estructura del glicano y conduce a proteínas hipermanosiladas.

En conclusión, todos los sistemas diferentes descritos aquí anteriormente presentan importantes inconvenientes en términos de inmunogenicidad de las proteínas glicosiladas producidas.

Por lo tanto, un objetivo de la invención es proporcionar un sistema alternativo y eficaz para producir glicoproteínas recombinantes que tengan un patrón de glicosilación adecuado para fines terapéuticos.

El solicitante encontró sorprendente que microalgas tales como *Phaeodactylum tricornutum* (*P. tricornutum*) son capaces de producir polipéptidos que albergan de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ a $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a través de su maquinaria endógena de N-glicosilación. El análisis de los N-glicanos de otras microalgas representativas también reveló la presencia de oligosacáridos del tipo de manosa alta en sus proteínas. Por lo tanto, las microalgas presentan la ventaja de permitir la producción de proteínas con un cierto patrón de glicosilación sin necesidad de la supresión de los genes responsables de la adición de epítomos inmunogénicos, tal como en plantas o levaduras. Este descubrimiento fue inesperado ya que se pensaba que las microalgas producían proteínas con un patrón de glicosilación de la planta y, eventualmente, un patrón de glicosilación de hongos o levaduras. Esta idea se ilustra bien en la solicitud de Patente PCT WO 2006/013572 que describe la producción de un antígeno glicosilado de hepatitis BS (HBsAg) en microalgas rojas y sugiere "humanizar" el patrón de glicosilación de productos recombinantes sintetizados en microalgas rojas (página 16, líneas 4 a 8) por:

- inactivación en dichas microalgas de α -manosidasa I y N-acetilglucosaminiltransferasa (página 16, líneas 29-33), enzimas que están implicadas en la levadura y en los hongos en la adición de una manosa a la estructura del glicano conduciendo a proteínas hipermanosiladas); e
- inactivación de la α (1,3)-fucosiltransferasa y la β (1,2)-xilosiltransferasa (página 17, líneas 16-22 y líneas 1-5), enzimas que están implicadas en las plantas en la adición de xilosa con enlaces β (1,2) y fucosa con enlaces α (1,3) a los N-glicanos de la proteína.

Las microalgas presentan también la ventaja de cultivarse en fotobiorreactores confinados, por lo que supera el problema de la diseminación de genes en el medio ambiente y el problema de la transmisión del virus a los animales. Además, el sistema de cultivo de microalgas es muy rápido, proporciona un excelente rendimiento en biomasa y solo requiere agua de mar o agua dulce, elementos nutritivos, carbono y luz.

Compendio de la invención

La solicitud describe las microalgas transformadas que comprenden una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido glicosilado que se expresa en las microalgas transformadas.

Estas microalgas permiten la producción de dicho polipéptido glicosilado con un patrón de glicosilación adecuado para fines terapéuticos en animales sin la necesidad de la supresión de los genes responsables de la adición de epítomos inmunogénicos tales como en plantas, que añaden xilosa con enlaces β (1,2) y/o fucosa con enlaces α (1,3) a los N-glicanos de la proteína dando como resultado glicoproteínas que difieren en la estructura de los animales y

son inmunogénicas en mamíferos, o levaduras que expresan los genes de manosiltransferasa añadiendo una manosa a la estructura de glicano y que conducen a proteínas hipermanosiladas.

Estas microalgas no comparten ninguna actividad de β (1,2)-xilosiltransferasa y/o α (1,3)-fucosil transferasa antes de transformarse.

- 5 Estas microalgas no comparten ninguna actividad de la manosiltransferasa que conduzca a proteínas hipermanosiladas resultantes de la adición de manosa a la estructura del glicano como se observa en la levadura y en los hongos.

El polipéptido glicosilado expresado en la microalga transformada comprende un patrón de glicosilación adecuado para fines terapéuticos.

- 10 El polipéptido glicosilado expresado en la microalga transformada comprende al menos una estructura de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$.

Estas microalgas se seleccionan entre algas verdes, algas rojas, cromalveolados, y euglénidos; preferiblemente, dichas microalgas se seleccionan entre clorófitas, euglénidos, haptofitas, prasinofitas y diatomeas.

- 15 El polipéptido glicosilado se selecciona del grupo que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos primaria de un polipéptido glicosilado humano, una secuencia de aminoácidos primaria de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo, y/o una secuencia de aminoácidos primaria de un polipéptido glicosilado no de mamífero.

El polipéptido glicosilado es un polipéptido animal, de mamífero o humano.

- 20 Estas microalgas transformadas comprenden además una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una enzima N-acetilglucosaminiltransferasa I que se expresa en la microalga transformada.

Estas microalgas transformadas comprenden además una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una manosidasa II que se expresa en la microalga transformada.

- 25 Las microalgas transformadas comprenden además una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una enzima N-acetilglucosaminiltransferasa II que se expresa en la microalga transformada.

- 30 Las microalgas transformadas comprenden además una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica al menos una enzima seleccionada entre N-acetilglucosaminiltransferasa II, III, IV, V y VI que se expresa en la microalga transformada.

- 35 Las microalgas transformadas comprenden además una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica al menos una enzima glicosiltransferasa seleccionada entre galactosiltransferasa, fucosiltransferasa y sialiltransferasa, que se expresa en la microalga transformada.

La secuencia de nucleótidos, operativamente unida a un promotor que impulsa la expresión de N-acetilglucosaminiltransferasas, manosidasa II o glicosiltransferasas en dichas microalgas, comprende dicho dominio catalítico de la enzima que tiene una actividad óptima en dicho ER y Golgi a un pH entre 5,1 y 8, unido a una señal de direccionamiento celular no asociada normalmente con el dominio catalítico.

- 40 La solicitud también describe microalgas transformadas que comprenden una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una enzima N-acetilglucosaminiltransferasa que se expresa en las microalgas transformadas.

- 45 Estas microalgas comprenden también una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una manosidasa II que se expresa en las microalgas transformadas.

Estas microalgas comprenden también una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una enzima N-acetilglucosaminiltransferasa II que se expresa en las microalgas transformadas.

- 50 Estas microalgas comprenden también una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica al menos una enzima seleccionada entre N-acetilglucosaminiltransferasa II, III, IV, V y VI que se expresa en las microalgas transformadas.

Estas microalgas comprenden además una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica al menos una enzima glicosiltransferasa seleccionada entre galactosiltransferasa, fucosiltransferasa y sialiltransferasas que se expresan en las microalgas transformadas.

- 5 Las secuencias de nucleótidos, unidas operativamente a promotores que impulsan la expresión de N-acetilglucosaminiltransferasas, manosidasa II o glicosiltransferasas en dichas microalgas, comprenden dicho dominio catalítico de la enzima que tiene una actividad óptima en dicho ER y Golgi a un pH entre 5,1 y 8, unido a una señal de direccionamiento celular no asociada generalmente con el dominio catalítico.

Estas microalgas se seleccionan entre algas verdes, algas rojas, cromalveolados, y euglenidos.

- 10 Un objetivo de la invención es un método para producir al menos un polipéptido glicosilado que tiene un patrón de glicosilación adecuado para fines terapéuticos, que comprende las etapas de:

(i) cultivar unas microalgas transformadas de *Phaeodactylum tricornutum* que comprenden una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido glicosilado que se expresa en las microalgas transformadas para obtener la expresión de dicho al menos un polipéptido glicosilado, y,

(ii) seleccionar dicho al menos un polipéptido glicosilado para determinar el patrón de glicosilación de dicho al menos un polipéptido glicosilado y para seleccionar el al menos un polipéptido glicosilado que tiene al menos una estructura de Man₉GlcNAc₂ a Man₅GlcNAc₂ y no comprende xilosa con enlaces β (1,2) y/o fucosa con enlaces α (1,3),

- 20 en donde dichas microalgas transformadas no comparten ninguna actividad de β (1,2)-xilosiltransferasa y/o α (1,3)-fucosil transferasa antes de transformarse, y no comparten ninguna actividad de la manosiltransferasa que conduzca a proteínas hipermanosiladas resultantes de la adición de manosa a la estructura del glicano.

En otra realización, dicho método comprende la etapa de aislamiento del polipéptido glicosilado recombinante después del paso de dicho polipéptido glicosilado recombinante a través del ER y del aparato de Golgi de las microalgas transformadas.

En otra realización, las microalgas transformadas utilizadas en el método de la invención comprenden además una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una enzima N-acetilglucosaminiltransferasa I que se expresa en las microalgas transformadas.

- 30 En otra realización, las microalgas transformadas utilizadas en el método de la invención comprenden además una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una enzima manosidasa II que se expresa en las microalgas transformadas.

En otra realización, las microalgas transformadas utilizadas en el método de la invención comprenden además una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una enzima N-acetilglucosaminiltransferasa II que se expresa en las microalgas transformadas.

- 40 En otra realización, las microalgas transformadas utilizadas en el método de la invención comprenden además una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica al menos una enzima seleccionada entre N-acetilglucosaminiltransferasa II, III, IV, V y VI que se expresa en las microalgas transformadas.

En otra realización, las microalgas transformadas utilizadas en el método de la invención comprenden además una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica al menos una enzima glicosiltransferasa seleccionada entre galactosiltransferasa, fucosiltransferasa y sialiltransferasa que se expresan en las microalgas transformadas.

Otro objetivo de la invención es el polipéptido glicosilado producido por el método de la invención.

La solicitud describe también una composición farmacéutica que comprende el polipéptido glicosilado producido por el método de la invención.

- 50 La solicitud describe también una composición farmacéutica que comprende el polipéptido glicosilado producido por el método de la invención.

La solicitud describe también el uso de las microalgas transformadas como se definió previamente para producir un polipéptido glicosilado que tiene al menos una estructura de Man₉GlcNAc₂ a Man₅GlcNAc₂.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Vía de la N-glicosilación en *Phaeodactylum tricorutum* basada en el análisis bioinformático del genoma. Las secuencias putativas identificadas en el genoma de *Phaeodactylum tricorutum* de la vía de la N-glicosilación se han indicado en negrita y cursiva en este esquema. Los N-glicanos del tipo de alta manosa en negrita se identificaron mediante el análisis estructural de oligosacáridos unidos a N a proteínas aisladas de la cepa P.t.1.8.6 fusiforme de *P. tricorutum* cultivada en condiciones estándar.

Figura 2. Glicoproteínas de *Phaeodactylum tricorutum* albergan oligosacáridos unidos a N reconocidos por concanavalina A

(a) Afinodetección utilizando concanavalina A e inmunodetección utilizando anticuerpos generados frente a epítopos del núcleo β 1,2-xilosa y núcleo α 1,3-fucosa de proteínas aisladas de cebolla verde (carril 1) y de la cepa P.t.1.8.6 fusiforme de *P. tricorutum* (carril 2).

(b) Afinodetección mediante concanavalina A de un extracto de proteína aislado de la cepa P.t.1.8.6. fusiforme de *P. tricorutum*, tratada o no por endoglicosidasa H (Endo H) y péptido N-glicosidasa F (PNGasa F).

Figura 3. Glicanos unidos a N de *Phaeodactylum tricorutum* son estructuras del tipo de alta manosa. MALDI-TOF MS de los glicanos unidos a N liberados de glicoproteínas aisladas de la cepa Pt 1.8.6 de *P. tricorutum* cultivada en condiciones estándar y marcadas con 2-aminobenzamida.

Figura 4. Glicanos unidos a N de las microalgas representativas son estructuras del tipo de alta manosa.

A. Afinodetección de N-glicanos de alta manosa mediante concanavalina A de proteínas de *Euglena*, *Tetraselmis*, *Pavlova*, *Rhodella*,

B. Afinodetección de N-glicanos de alta manosa mediante concanavalina A de proteínas de *Skeuletonema*, *Heterocapsa*, *Amphora*, *Chaetoceros*, *Naviculas*, *Nanochloropsis*.

C. Afinodetección mediante anticuerpos de anti α -1,3 fucosa de proteínas de *Skeuletonema*, *Heterocapsa*, *Amphora*, *Chaetoceros*, *Naviculas*, *Nanochloropsis*.

D. Afinodetección mediante anticuerpos de β -1,2 xilosa de proteínas de *Skeuletonema*, *Heterocapsa*, *Amphora*, *Chaetoceros*, *Naviculas*, *Nanochloropsis*.

Figura 5. Constructos pZEPO y pZEPOHis.

Figura 6. Análisis de DNA de EPO recombinante y transcritos mediante PCR (A) y RT-PCR (B).

Figura 7. Análisis de las proteínas EPO recombinante mediante transferencia de Western.

Figura 8. Vía de la N-glicosilación humanizada.

30 Descripción detallada de la invención**I. Definiciones**

Como se utiliza en la presente memoria, un "polipéptido glicosilado" se refiere a un polipéptido con N-glicosilación.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "N-glicano" se refiere a un oligosacárido unido a N, por ejemplo, uno que está unido mediante un enlace asparagina-N-acetilglucosamina a un resto de asparagina de un polipéptido. Los N-glicanos tienen un núcleo de pentasacárido común de $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ("Man" se refiere a manosa; "Glc" se refiere a glucosa; y "NAc" se refiere a N-acetilo; GlcNAc se refiere a N-acetilglucosamina). El término "núcleo de trimanosa" utilizado con respecto al N-glicano se refiere también a la estructura de $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ("Man3"). El término "núcleo de pentamanosa" o "núcleo de Manosa-5" o utilizado con respecto al N-glicano se refiere a la estructura $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. Los N-glicanos difieren con respecto al número de ramificaciones (antenas) que comprenden azúcares periféricos (por ejemplo, GlcNAc, fucosa y ácido siálico) que se unen a la estructura del núcleo Man3. Los N-glicanos se clasifican según sus constituyentes ramificados (por ejemplo, manosa alta, complejo o híbrido).

Como se utiliza en la presente memoria, un N-glicano del tipo "alta manosa" tiene de cinco a nueve restos de manosa. Un N-glicano del tipo "poli-manosa" tiene más de nueve restos de manosa. Un N-glicano del tipo "complejo" tiene típicamente al menos un GlcNAc unido al brazo de la α 1,3-manosa y al menos un GlcNAc unido al brazo de la α 1,6-manosa del núcleo de trimanosa. Los N-glicanos complejos pueden tener también restos de galactosa ("Gal") que están opcionalmente modificados con ácido siálico o derivados ("NeuAc", donde "Neu" se refiere a un ácido neuramínico y "Ac" se refiere a acetilo). Un N-glicano complejo tiene típicamente al menos una ramificación que termina en un oligosacárido tal como, por ejemplo: NeuAc-; NeuAc α 2-6GalNAc α 1-; NeuAc α 2-3Gal 1-3GalNAc α 1-3; NeuAc α 2-3/6Gal1-4GlcNAc1-; GlcNAc α 1-4Gal1- (solo mucinas); Fuca α 1-2Gal1-(grupo sanguíneo H). Los ésteres de

sulfato se pueden producir en galactosa, GalNAc, y restos GlcNAc, y los ésteres de fosfato se pueden producir en restos de manosa. NeuAc puede estar O-acetilado o reemplazado por NeuGc (ácido N-glicolilneuramínico). Los N-glicanos complejos pueden tener también sustituciones dentro de la cadena que comprenden "bisecciones" de GlcNAc y núcleo de Fucosa ("Fuc"). Un N-glicano "híbrido" tiene al menos un GlcNAc en el extremo del brazo de la α 1,3-manosa del núcleo de trimanosa y ninguna o más manosas en el brazo del la α 1,6-manosa del núcleo de trimanosa.

Como se utiliza en la presente memoria, un "patrón de glicosilación adecuado para fines terapéuticos" se refiere a polipéptidos que tienen al menos una estructura de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ($\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$) y polipéptidos que tienen estructuras de N-glicanos complejos como se describió aquí anteriormente.

El término "predominante" o "predominantemente" utilizado con respecto a la producción de N-glicanos se refiere a una estructura que representa el ion principal detectado mediante el análisis de espectrometría de masas del tiempo de ionización de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS).

Las abreviaturas utilizadas en la presente memoria son de uso común en la técnica, véase, por ejemplo, abreviaturas de azúcares, anteriores. Otras abreviaturas comunes incluyen "PNGasa", que se refiere al péptido N-glicosidasa, "GlcNAc T" o "GnT" que se refiere a las enzimas N-acetilglucosaminiltransferasa; "NeuAc" se refiere al ácido N-acetilneuramínico.

Como se utiliza en la presente memoria, una "glicoproteína o proteína humanizada" o una "glicoproteína de tipo humano" se refiere alternativamente a una proteína que tiene unida a ella los N-glicanos que tienen menos de cuatro restos de manosa, e intermedios de glicoproteína sintéticos (que son también útiles y se pueden manipular además in vitro o in vivo) que tienen al menos cinco restos de manosa. Preferiblemente, las glicoproteínas producidas según la invención contienen al menos 30% en moles, preferiblemente al menos 40% en moles y más preferiblemente 50, 60, 70, 80, 90, o incluso 100% en moles del intermedio $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, al menos de forma transitoria. Esto se puede lograr, por ejemplo, diseñando una célula huésped de la invención para expresar una "mejor", es decir, una vía de glicosilación más eficiente. Por ejemplo, una manosidasa se selecciona de modo que tenga una actividad óptima en las condiciones presentes en el sitio en la célula huésped donde las proteínas están glicosiladas y se introduce en la célula huésped preferiblemente dirigiendo la enzima a un orgánulo de la célula huésped donde se desea la actividad.

El término "enzima", cuando se utiliza en la presente memoria en relación con la alteración de la glicosilación de la célula huésped, se refiere a una molécula que tiene al menos una actividad enzimática, e incluye enzimas de longitud completa, fragmentos catalíticamente activos, quiméricos, complejos y similares. "Fragmento catalíticamente activo" de una enzima se refiere a un polipéptido que tiene un nivel detectable de actividad funcional (enzimática). La actividad de la enzima es "sustancialmente intracelular" cuando menos del 10% de la actividad de la enzima se puede medir fuera de la célula en comparación con la medida de las células lisadas.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "vía de secreción" se refiere a la línea de ensamblaje de varias enzimas de glicosilación a las que se exponen secuencialmente un precursor de oligosacárido unido a lípidos y un sustrato de N-glicano, siguiendo el flujo molecular de una cadena polipeptídica naciente desde el citoplasma hasta el retículo endoplásmico (ER), a los compartimentos del aparato de Golgi y a su destino final. Se dice que las enzimas se localizan a lo largo de esta vía. Una enzima X que actúa sobre un glicano unido a lípidos o sobre un N-glicano antes de que se diga que la enzima Y es o actúa "anterior" a la enzima Y; de manera similar, la enzima Y es o actúa "posterior" a la enzima X.

El término "péptido de direccionamiento" como se utiliza en la presente memoria se refiere a secuencias de aminoácidos que median la localización (o retención) de una secuencia asociada a localizaciones subcelulares, por ejemplo, orgánulos.

El término "polinucleótido" o "molécula de ácido nucleico" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud. El término incluye moléculas de DNA (por ejemplo, cDNA o DNA genómico o sintético) y moléculas de RNA (por ejemplo, mRNA o RNA sintético), así como análogos de DNA o RNA que contienen análogos de nucleótidos no naturales, enlaces internucleósidos no nativos, o ambos. El ácido nucleico puede estar en cualquier conformación topológica. Por ejemplo, el ácido nucleico puede ser monocatenario, bicatenario, tricatenario, cuádruple, parcialmente bicatenario, ramificado, en forma de horquilla, circular, o en una conformación con candado. El término incluye formas de DNA de cadena simple o doble. Una molécula de ácido nucleico de esta invención puede incluir tanto cadenas con sentido como antisentido de RNA, cDNA, DNA genómico, y formas sintéticas y polímeros mixtos de los anteriores. Ellos se pueden modificar química o bioquímicamente o pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivatizadas, como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, etiquetas, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleótidas tales como enlaces sin carga (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.), enlaces cargados (por ejemplo, fosforotiatos, fosforoditiatos, etc.), restos colgantes (por ejemplo, polipéptidos), intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), quelantes, alquilantes, y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). También se incluyen moléculas sintéticas que imitan a los polinucleótidos en su capacidad para unirse a una secuencia

designada a través de enlaces de hidrógeno y otras interacciones químicas. Dichas moléculas se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, aquellas en las que los enlaces peptídicos sustituyen a los enlaces fosfato en el esqueleto de la molécula.

5 El término “microalgas transformadas” se refiere a microalgas en donde una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor se ha introducido mediante métodos convencionales de transformación (por ejemplo, bombardeo de micropartículas, electroporación, perlas de vidrio, polietilenglicol (PEG), patillas de carburo de silicio, o usos de virus o agrobacterias) para expresar dicha molécula de ácido nucleico en el núcleo de dichas microalgas.

10 Un ácido nucleico o polinucleótido “aislado” o “sustancialmente puro” (por ejemplo, un RNA, DNA o un polímero mixto) es uno que se separa sustancialmente de otros componentes celulares que acompañan de manera natural al polinucleótido nativo en su célula huésped natural, por ejemplo, ribosomas, polimerasas, y secuencias genómicas con las que se asocia naturalmente. El término abarca un ácido nucleico o polinucleótido que (1) se ha eliminado de su entorno natural, (2) no está asociado con la totalidad o una parte de un polinucleótido en el que el “polinucleótido aislado” se encuentra en la naturaleza, (3) está unido operativamente a un polinucleótido que no está unido en la naturaleza, o (4) no está en la naturaleza. El término “aislado” o “sustancialmente puro” también se puede utilizar en referencia a aislados de DNA clonados o recombinantes, análogos de polinucleótidos sintetizados químicamente, o análogos de polinucleótidos que se sintetizan biológicamente mediante sistemas heterólogos.

15 Como se utiliza en la presente memoria, la frase “variante degenerada” de una secuencia de ácidos nucleicos de referencia abarca secuencias de ácidos nucleicos que se pueden traducir, según los códigos genéticos estándar, para proporcionar una secuencia de aminoácidos idéntica a la traducida de la secuencia de ácidos nucleicos de referencia.

20 El término “porcentaje de identidad de secuencia” o “idéntico” en el contexto de las secuencias de ácidos nucleicos se refiere a los restos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para obtener la máxima correspondencia. Existen varios algoritmos diferentes conocidos en la técnica que se pueden utilizar para medir la identidad de secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos se pueden comparar utilizando FASTA, Gap o Bestfit, que son programas en Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA proporciona alineaciones y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones de la mejor superposición entre las secuencias de consulta y búsqueda.

25 El término “homología sustancial” o “similitud sustancial” cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que, cuando está alineado de manera óptima con las inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), existe una identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente el 50%, más preferiblemente el 60% de las bases de nucleótidos, generalmente al menos aproximadamente el 70%, más usualmente al menos aproximadamente el 80%, preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las bases de nucleótidos medido mediante cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST O Gap, como se explicó anteriormente.

30 Alternativamente, existe una homología o similitud sustancial cuando un ácido nucleico o fragmento del mismo se hibrida con otro ácido nucleico, con una cadena de otro ácido nucleico, o con la cadena complementaria del mismo, en condiciones de hibridación rigurosas. Las “condiciones de hibridación rigurosas” y las “condiciones de lavado rigurosas” en el contexto de los experimentos de hibridación de ácidos nucleicos dependen de varios parámetros físicos diferentes. La hibridación del ácido nucleico se verá afectada por condiciones tales como la concentración de sal, la temperatura, los disolventes, la composición base de las especies que se hibridan, la longitud de las regiones complementarias y el número de desajustes de bases de nucleótidos entre los ácidos nucleicos que se hibridan, como se apreciará fácilmente por los expertos en la técnica. Un experto en la técnica sabe como variar estos parámetros para lograr una rigurosidad particular de la hibridación. En general, la “hibridación rigurosa” se realiza aproximadamente a 25°C por debajo del punto de fusión térmica (T_m) para el híbrido de DNA específico en un conjunto particular de condiciones. El “lavado riguroso” se realiza a temperaturas aproximadamente de 5°C más bajas de la T_m para el híbrido de DNA específico en un conjunto particular de condiciones. La T_m es la temperatura a la que el 50% de la secuencia objetivo se hibrida con una sonda perfectamente adaptada. Por ejemplo, se pueden definir “condiciones de alta rigurosidad” para la hibridación en la fase de disolución como hibridación acuosa (es decir, libre de formamida) en 6X SSC (donde 20X SSC contiene NaCl 3,0 M y citrato de sodio 0,3 M), SDS al 1% a 65°C durante 8-12 horas, seguido por dos lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1% a 65°C durante 20 minutos. El experto en la técnica apreciará que la hibridación a 65°C se producirá a diferentes velocidades dependiendo de una serie de factores que incluyen la longitud y el porcentaje de identidad de las secuencias que se hibridan.

35 El término “mutados” cuando se aplica a secuencias de ácidos nucleicos significa que los nucleótidos en una secuencia de ácidos nucleicos se pueden insertar, eliminar o cambiar en comparación con una secuencia de ácidos nucleicos de referencia. Se puede realizar una única alteración en un locus (una mutación puntual) o se pueden insertar, eliminar o cambiar múltiples nucleótidos en un solo locus. Además, se pueden hacer una o más alteraciones en cualquier número de loci dentro de una secuencia de ácidos nucleicos. Una secuencia de ácidos nucleicos puede mutarse por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, técnicas de mutagénesis tal como la “PCR propensa a errores” (un proceso para realizar una PCR en condiciones en las que la

fidelidad de copia de la DNA polimerasa es baja, de modo que se obtiene una alta tasa de mutaciones puntuales a lo largo de toda la longitud del producto de la PCR).

El término “vector” como se utiliza en la presente memoria, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle circular de DNA bicatenario en el que se pueden unir segmentos de DNA adicionales. Otros vectores incluyen cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC) y cromosomas artificiales de levadura (YAC). Otro tipo de vector es un vector viral, en el que segmentos de DNA adicionales pueden unirse en el genoma viral (descrito con más detalle a continuación). Algunos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores que tienen un origen de replicación que funciona en la célula huésped). Otros vectores pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y por lo tanto se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores preferidos son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en la presente memoria como “vectores de expresión recombinantes” (o simplemente, “vectores de expresión”).

Secuencias de control de expresión “operativamente unidas” se refieren a un enlace en el que la secuencia de control de expresión es contigua al gen de interés para controlar el gen de interés, así como las secuencias de control de expresión que actúan en trans o a una distancia para controlar el gen de interés.

El término “secuencia de control de expresión” como se utiliza en la presente memoria se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para afectar a la expresión de las secuencias codificantes a las que se unen operativamente. Las secuencias de control de expresión son secuencias que controlan la transcripción, los eventos post-transcripcionales y la traducción de las secuencias de ácidos nucleicos. Las secuencias de control de expresión incluyen secuencias apropiadas de iniciación, terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción; señales de procesamiento de RNA eficientes, tales como señales de empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el mRNA citoplásmico; secuencias que mejoran la eficiencia de la traducción (por ejemplo, los sitios de unión a ribosomas); secuencias que mejoran la estabilidad de las proteínas; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariontes, dichas secuencias de control incluyen generalmente el promotor, el sitio de unión del ribosoma y la secuencia de terminación de la transcripción. El término “secuencias de control” pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, las secuencias líderes y las secuencias asociadas de fusión.

El término “célula huésped recombinante” (o simplemente “célula huésped”), como se utiliza en la presente memoria, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un ácido nucleico tal como un vector recombinante. Debe entenderse que dichos términos pretenden referirse no solo a la célula objeto en particular, sino a la progenie de dicha célula. Debido a que ciertas modificaciones se pueden producir en generaciones sucesivas debido tanto a mutaciones como a influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula madre, pero aún están incluidas dentro del alcance del término “célula huésped” como se utiliza en la presente memoria. Una célula huésped recombinante puede ser una célula aislada o una línea celular que crece en cultivo o puede ser una célula que reside en un tejido u organismo vivo.

El término “péptido” como se utiliza en la presente memoria se refiere a un polipéptido corto, por ejemplo, uno que típicamente tiene menos de aproximadamente 50 aminoácidos de largo y más típicamente menos de aproximadamente 30 aminoácidos de largo. El término como se utiliza en la presente memoria abarca análogos y miméticos que imitan la función estructural y, por lo tanto, la biológica.

El término “polipéptido” como se utiliza en la presente memoria abarca tanto proteínas naturales como no naturales, y fragmentos, mutantes, derivados y análogos de los mismos. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico. Además, un polipéptido puede comprender varios dominios diferentes, cada uno de los cuales tiene una o más actividades distintas.

El término “proteína aislada” o “polipéptido aislado” es una proteína o polipéptido que, en virtud de su origen o fuente de derivación (1) no está asociado con componentes asociados de forma natural que lo acompañan en su estado nativo, (2) cuando existe en una pureza no encontrada en la naturaleza, donde la pureza puede adjudicarse con respecto a la presencia de otro material celular (por ejemplo, está libre de otras proteínas de la misma especie) (3) es expresada por una célula de una especie diferente, o (4) no se produce en la naturaleza (por ejemplo, es un fragmento de un polipéptido que se encuentra en la naturaleza o incluye análogos o derivados de aminoácidos que no se encuentran en la naturaleza o enlaces distintos a los enlaces peptídicos estándar). Por lo tanto, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula a partir de la cual se origina naturalmente se “aislará” de sus componentes asociados de forma natural. Un polipéptido o proteína también pueden prepararse sustancialmente libre de componentes asociados de forma natural por aislamiento, utilizando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la técnica. Tal como se define así, “aislado” no requiere necesariamente que la proteína, el polipéptido, el péptido u el oligopéptido así descrito se hayan eliminado físicamente de su entorno nativo.

El término “fragmento polipeptídico” como se utiliza en la presente memoria se refiere a una secuencia contigua en la que la secuencia de aminoácidos del fragmento es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia de origen natural. Los fragmentos típicamente tienen al menos 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de longitud, preferiblemente de al menos 12, 14, 16 o 18 aminoácidos de longitud, más preferiblemente de al menos 20 aminoácidos de longitud, más preferiblemente de al menos 25, 30, 35, 40 o 45 aminoácidos, incluso más preferiblemente al menos 50 o 60 aminoácidos de longitud, y aún más preferiblemente al menos 70 aminoácidos de longitud.

Un “derivado modificado” se refiere a polipéptidos o fragmentos de los mismos que son sustancialmente homólogos en la secuencia estructural primaria pero que incluyen, por ejemplo, modificaciones químicas o bioquímicas in vivo o in vitro o que incorporan aminoácidos que no se encuentran en el polipéptido nativo. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, acetilación, carboxilación, fosforilación, glicosilación, ubiquitinación, etiquetado, por ejemplo, con radionucleótidos y diversas modificaciones enzimáticas, como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. Una variedad de métodos para marcar polipéptidos y sustituyentes o etiquetas útiles para dichos fines son bien conocidos en la técnica, e incluyen isótopos radioactivos tales como ¹²⁵I, ³²P, ³⁵S, y ³H, ligandos que se unen a antiligandos marcados (por ejemplo, anticuerpos), fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, enzimas, y antiligandos que pueden servir como miembros de pares de unión específicos para un ligando marcado. La elección de la etiqueta depende de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con el cebador, los requisitos de estabilidad y la instrumentación disponible. Los métodos para marcar polipéptidos son bien conocidos en la técnica.

Un “polipéptido mutante” o “muteína” se refiere a un polipéptido cuya secuencia contiene una inserción, duplicación, delección, reorganización o sustitución de uno o más aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de una proteína nativa o de tipo nativo. Una muteína puede tener una o más sustituciones puntuales de aminoácidos, en las que un solo aminoácido en una posición se ha cambiado a otro aminoácido, una o más inserciones y/o delecciones, en las que se insertan o eliminan uno o más aminoácidos respectivamente, en la secuencia de la proteína natural, y/u omisiones de la secuencia de aminoácidos en uno o ambos extremos amino o carboxi. Una muteína puede tener la misma, pero preferiblemente tiene una actividad biológica diferente en comparación con la proteína natural. Una muteína tiene al menos un 70% de homología de secuencia global con su homólogo de tipo nativo. Incluso más preferidas son las muteínas que tienen una homología de secuencia global del 80%, 85% o 90% con la proteína de tipo nativo. En una realización aún más preferida, una muteína muestra un 95% de identidad de secuencia, incluso más preferiblemente un 97%, incluso más preferiblemente un 98% e incluso más preferiblemente un 99% de identidad de secuencia global. La homología de secuencia se puede medir mediante cualquier algoritmo de análisis de secuencia común, como Gap o Bestfit. Las sustituciones de aminoácidos preferidas son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos de proteínas, (4) alteran la afinidad de unión o actividad enzimática, y (5) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de dichos análogos. Como se utiliza en la presente memoria, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional.

Una proteína tiene “homología” o es “homóloga” a una segunda proteína si la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína tiene una secuencia similar a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la segunda proteína. Alternativamente, una proteína tiene homología con una segunda proteína si las dos proteínas tienen secuencias de aminoácidos “similares”. (Por lo tanto, el término “proteínas homólogas” se define para significar que las dos proteínas tienen secuencias de aminoácidos similares). En una realización preferida, una proteína homóloga es una que muestra un 60% de homología de secuencia con la proteína de tipo nativo, más preferido es un 70% de homología de secuencia. Incluso más preferidas son proteínas homólogas que muestran una homología de secuencia del 80%, 85% o 90% con la proteína de tipo nativo. En una realización todavía más preferida, la proteína homóloga muestra una identidad de secuencia del 95%, 97%, 98% o 99%. Como se utiliza en la presente memoria, la homología entre dos regiones de secuencias de aminoácidos (especialmente con respecto a las similitudes estructurales predichas) se interpreta como que implica similitud en la función.

Cuando se utiliza “homólogo” en referencia a proteínas o péptidos, se reconoce que las posiciones de los restos que no son idénticas a menudo difieren por las sustituciones conservativas de aminoácidos. Una “sustitución conservativa de aminoácidos” es aquella en la que un resto de aminoácido se sustituye por otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia o el grado de homología se puede ajustar después para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los seis grupos siguientes contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) Serina (S), Treonina (T); 2) Acido aspártico (D), Acido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Alanina (A), Valina (V), y 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W). La homología de secuencia para polipéptidos, que se denomina también como porcentaje de identidad de secuencia, se mide típicamente utilizando un software de análisis de secuencia.

El término “proteína de fusión” se refiere a un polipéptido que comprende un polipéptido o fragmento acoplado a secuencias de aminoácidos heterólogas. Las proteínas de fusión son útiles porque pueden construirse para contener dos o más elementos funcionales deseados de dos o más proteínas diferentes. Una proteína de fusión comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de un polipéptido de interés, más preferiblemente al menos 20 o 30 aminoácidos, incluso más preferiblemente al menos 40, 50 o 60 aminoácidos, aún más preferiblemente al menos 75, 100 o 125 aminoácidos. Las proteínas de fusión pueden producirse de forma recombinante mediante la construcción de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido o un fragmento del mismo en marco con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína o péptido diferente y que expresa después la proteína de fusión. Alternativamente, una proteína de fusión se puede producir químicamente mediante la reticulación del polipéptido o un fragmento del mismo a otra proteína.

El término “región” como se utiliza en la presente memoria se refiere a una porción contigua físicamente de la estructura primaria de una biomolécula. En el caso de proteínas, una región se define por una porción contigua de la secuencia de aminoácidos de esa proteína.

El término “dominio” como se utiliza en la presente memoria se refiere a una estructura de una biomolécula que contribuye a una función conocida o sospechada de la biomolécula. Los dominios pueden ser coextensivos con las regiones o partes de los mismos: los dominios pueden incluir también regiones distintas y no contiguas de una biomolécula. Los ejemplos de dominios de proteínas incluyen, pero no se limitan a, un dominio de Ig, un dominio extracelular, un dominio de membrana, un dominio catalítico y un dominio citoplásmico.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “molécula” significa cualquier compuesto, incluyendo, pero no limitado a, una molécula pequeña, péptido, proteína, azúcar, nucleótido, ácido nucleico, lípido, etc... y dicho compuesto puede ser natural o sintético.

II. La invención

El objetivo de la invención es proporcionar un nuevo sistema para producir polipéptidos N-glicosilados. La glicosilación depende de la maquinaria endógena presente en la célula huésped elegida para producir los polipéptidos glicosilados.

El solicitante encontró sorprendentemente que las microalgas son capaces de producir polipéptidos glicosilados que tienen un patrón de glicosilación adecuado para fines terapéuticos en animales con alto rendimiento a través de su maquinaria endógena de N-glicosilación.

Por lo tanto, un aspecto de la invención es la producción de polipéptidos que albergan de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ a $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ en las microalgas y otro aspecto de la invención es la producción de N-glicanos complejos en microalgas modificadas.

Se describen en la presente memoria las microalgas transformadas, en donde dichas microalgas comprenden una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido glicosilado que se expresa en las microalgas transformadas.

Las microalgas, como se utilizan en la presente memoria, son organismos fotosintéticos unicelulares acuáticos, que comprenden:

- Algas verdes: Clorofitos tales como *Chlorella marina* (por ejemplo, CCMP2333), *Chlorella sorokiniana* (por ejemplo, UTEX 1663), *Chlorella sp.* (CCMP 2251), *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella protothecoides*, nanocloropsis tales como *Nannochloropsis salina* (por ejemplo, CCAP849/2), y *Nannochloropsis goditana* (por ejemplo, CCAP849/5), Trebouxiófitas, Ulvofitas, Prasinofitas tales como *Tetraselmis suecica* (por ejemplo, CCMP904), *tetraselmis marina* (por ejemplo, CCMP898), *Prasinococcus capsulatus* (por ejemplo, CCMP1192), *Nephroselmis rotunda* (por ejemplo, UTEXLB996), *Ostreococcus tauri*, y Mesostigma;

- algas rojas: Rodofitina tal como *Porphyridium omentum* (por ejemplo, CCAP1320/3 y CCMP 675) o *Rhodella violacea* (por ejemplo, SAG-115.79), Cianidiofitas y Glaucocofitas;

- cromalveolados: Dinoflagelados tales como *Heterocapsa triquetra* (por ejemplo, CCMP448), Oxyhrris, Perkinsus, Diatomeas tales como *Thalassiosira pseudonana* (por ejemplo, CCMP1335), *Phaeodactylum tricornutum* (por ejemplo, CCAP1052/1A, P.t. 1.8.6, y CCMP632), *Cylindrotheca fusiformis* (por ejemplo, CCMP344), *Skeletonema costatum* (CCMP1332), *Chaetoceros calcitrans* (por ejemplo, CCMP1315), *Nitzschia punctata* (por ejemplo, CCMP561), *Amphora coffeaceiformis* (por ejemplo, CCMP127), *Odontella aurita* (por ejemplo, CCMP 145), y *naviculas*, Rafidiofitas, Crisofitas, tales como *Pavlova lutheri* (por ejemplo, CCMP1325), Faeofitas, Bolidofitas, Actinofridas, Traustrocitridas, Haptofitas tales como *Isochrysis galbana* (por ejemplo, CCAP927/14), Eustigmatofitas, y Criptomonadas;

- Euglenidos tales como *Eutreptiella gymnastica* (por ejemplo, CCMP1594).

Preferiblemente, dichas microalgas no son parte de *Ostreococcus sp.*, lo más preferiblemente, dichas microalgas no son *Ostreococcus tauri* o *Ostreococcus oceánica*.

Preferiblemente, dichas microalgas no son parte de Clamidomonadales.

5 Las microalgas no comparten ninguna actividad de la beta (1,2)-xilosil transferasa y/o alfa (1,3)-fucosil transferasa antes de ser transformadas. De hecho, y sorprendentemente, los inventores han establecido que las microalgas en comparación con las plantas, no añaden xilosa con enlaces β (1,2) y/o fucosa con enlaces α (1,3) a los N-glicanos de la proteína que son inmunogénicos en mamíferos.

10 Por consiguiente, no es necesario, en comparación con las plantas, inactivar la beta (1,2)-xilosil transferasa y/o la alfa fucosil transferasa para producir en las microalgas glicoproteínas terapéuticas que no comprenden xilosa con enlaces β (1,2) y/o fucosa con enlaces α (1,3).

El experto puede identificar simplemente las microalgas que no comparten ninguna actividad de la beta (1,2)-xilosil transferasa y/o alfa (1,3)-fucosil transferasa antes de transformarse mediante métodos bien conocidos, como los métodos descritos a continuación en los ejemplos.

15 Por ejemplo, la persona experta puede identificar simplemente las microalgas que no comparten ninguna actividad de la beta (1,2)-xilosil transferasa y/o alfa (1,3)-fucosil transferasa utilizando los anticuerpos anti-alfa (1,3) fucosa (ref: AS07268) y anti-beta (1,2) xilosa (ref: AS07267) de AGRISERA.

20 Ventajosamente, dichas microalgas permiten la producción de dicho polipéptido glicosilado con un patrón de glicosilación adecuado para fines terapéuticos en animales sin necesidad de la supresión de los genes responsables de la adición de epítomos inmunogénicos tales como en plantas, que añaden xilosa con enlaces β (1,2) y/o fucosa con enlaces α (1,3) a los N-glicanos de la proteína dando como resultado glicoproteínas que difieren en la estructura de los animales y son inmunogénicas en mamíferos, o levaduras que expresan los genes de la manosiltransferasa añadiendo manosa a la estructura del glicano y produciendo proteínas hipermanosiladas.

25 De hecho, el polipéptido glicosilado expresado en las microalgas transformadas no comprende xilosa con enlaces β (1,2) y/o fucosa con enlaces α (1,3) y dichas microalgas no comparten ninguna actividad de la beta (1,2)-xilosil transferasa y/o alfa fucosil transferasa antes de transformarse.

También, dichas microalgas no comparten la actividad de la manosiltransferasa que conduce a proteínas hipermanosiladas que resultan de la adición de manosa a la estructura de glicano como se observa en levaduras y hongos.

Las microalgas se seleccionan entre Diatomeas, Euglénidos, Haptofitas, Prasinofitas y Clorofitas.

30 Las microalgas se seleccionan entre Clorofitas y Prasinofitas.

Las microalgas se seleccionan entre Diatomeas y Haptofitas.

Las microalgas se seleccionan entre Euglénidos.

Las proteínas glicosiladas producidas en las microalgas transformadas se pueden utilizar terapéuticamente en animales, especialmente en mamíferos y más particularmente en humanos.

35 En una realización de la invención, el polipéptido glicosilado producido por el método de la invención se selecciona del grupo que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos primaria de un polipéptido glicosilado humano, una secuencia de aminoácidos primaria de un polipéptido glicosilado de mamífero no humano, una secuencia de aminoácidos primaria de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo, y/o una secuencia de aminoácidos primaria de un polipéptido glicosilado no mamífero.

40 En una realización preferida de la invención, el polipéptido glicosilado producido por el método de la invención es un polipéptido de animal.

En una realización preferida de la invención, el polipéptido glicosilado producido por el método de la invención es un polipéptido de mamífero.

45 En una realización más preferida de la invención, el polipéptido glicosilado producido por el método de la invención es un polipéptido humano.

Ejemplos de proteínas glicosiladas adecuadas incluyen sin limitación: eritropoyetina, citoquinas tales como interferones, anticuerpos, factores de coagulación, hormonas, beta-glucocerebrosidasa, pentraxina-3, anti-TNFs...

50 Ejemplos de promotores que impulsan la expresión de una proteína recombinante en las microalgas incluyen, pero no se limitan a, promotores nucleares tales como los descritos en la Tabla 1; promotores cloroplásticos tales como promotores del gen *rbcl* (la subunidad principal de la ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa) y del gen *atpA*

(subunidad de λ-ATP sintasa) de *Chlamydomonas reinhardtii*, o 5'UTR del gen *rrn*, del gen *atpB*, del gen *psbA*, del gen *psbD*; y promotores de plantas o animales.

Tabla 1

Microalgas	Promotor	Referencias
<i>Chlamydomonas sp.</i>	<i>rbcS2</i>	(Sizova et al. 2001) (Fuhrmann et al. 1999) (Kovar et al. 2002) (Stevens et Purton 1997) (Cerutti 1997) (Auchincloss et al. 1999)
	<i>cabII-1</i>	(Blankenship et Kindle 1992)
	β2 tubulina	(Davies 1992)
	CaMV 35S	(Tang et al. 1995)
	Nitrato reductasa Nit 1	(Ohresser 1997)
	Complejo Psad	(Fischer et Rochaix 2001)
	Fotosistema I	
	HSP70	(Schroda et al. 2002)
Nopalina sintasa	(Hall et al. 1993)	
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	FCPA, FCPB	(Apt et al. 1996) (Falciatore et al. 1999) (Zaslavskaja et al. 2000)
	Anhidrasa carbónica	(Harada et al. 2005)
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	Nitrato reductasa	(Poulsen et Kroger 2005)
	Frua 3	(Fischer et al. 1999)
<i>Dunaliella salina</i>	Actina	(Jiang et al. 2005)
<i>Chlorrella ellipsoidea</i>	CaMV 35S	(Kim et al. 2002)
<i>Amphidinium sp.</i> , <i>Symbiodinium microadriaticum</i>	p1\2\	(ten Lohuis et Miller 1998)
<i>Cyclotella cryptica</i>	ACC1	(Dunahay et al. 1995)
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	HLCF9 del gen <i>fcp</i>	(Poulsen et al. 2006)

5 En una realización preferida de la invención, el polipéptido glicosilado expresado en las microalgas transformadas utilizadas en el método de la invención comprende un patrón de glicosilación adecuado para fines terapéuticos, especialmente un patrón de glicosilación animal, preferiblemente un patrón de glicosilación de mamíferos, y más preferiblemente un patrón de glicosilación de tipo humano.

10 En una realización más preferida, el polipéptido glicosilado expresado en las microalgas transformadas utilizadas en el método de la invención comprende al menos una estructura de Man₅GlcNAc₂.

En una realización de la invención, el polipéptido glicosilado que tiene al menos una estructura de Man₅GlcNAc₂ obtenida por el método de la invención se somete además a al menos una reacción de glicosilación adicional in vitro, después de su aislamiento de las microalgas transformadas.

Esta solicitud también describe microalgas transformadas capaces de producir N-glicanos complejos.

- 5 Microalgas transformadas como las que se describen aquí anteriormente, expresan además una N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnT I) capaz de añadir un resto de N-acetilglucosamina (GlcNAc) a Man₅GlcNAc₂, para producir un GlcN AcMan₅GlcNAc₂. Las N-acetilglucosaminiltransferasas I (GnT I) son bien conocidas por los expertos en la técnica, y también se conocen como manosido acetilglucosaminiltransferasas 1 (MGAT1). Como un ejemplo de GnTI, se puede citar el GnTI del *Mus musculus* (SEQ ID NO: 18, número de acceso NP_034924) o del *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 19, número de acceso NP_002397). Preferiblemente, dicha N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnT I) corresponde a SEQ ID NO: 19 (número de acceso NP_002397).
- 10 Las microalgas transformadas como se describen aquí anteriormente; expresan además una N-acetilglucosaminiltransferasa (GnT I, GnT II, GnT III, Gn T IV, GnT V, GnT VI), una manosidasa II y una fucosiltransferasa, galactosiltransferasa (GalT) o sialiltransferasa (ST), para producir N-glicanos complejos.
- GnT I, GnT II, GnT III, Gn T IV, GnT V, GnT VI, manosidasa II, fucosiltransferasa, galactosiltransferasa (GalT) y sialiltransferasa (ST) son bien conocidas por un experto en la técnica.
- 15 Ejemplos de GnT II, también conocido como manosil (alfa-1,6-)-glicoproteína beta-1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa (MGAT2), incluyen GnT II de *Mus musculus* (SEQ ID NO: 20, número de acceso NP_666147) o de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 21, número de acceso NP_002399). Preferiblemente, dichas N-acetilglucosaminiltransferasa II (GnT II) corresponden a SEQ ID NO: 21 (número de acceso NP_02399).
- 20 Ejemplos de GnT III, también conocida como manosil (beta-1,4-)-glicoproteína beta-1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa (MGAT3), incluyen GnT III de *Mus musculus* (SEQ ID NO: 22, número de acceso NP_034925) o de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 23, número de acceso NP_002400). Preferiblemente, dichas N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT III) corresponden a SEQ ID NO: 22 (número de acceso NP_002400).
- 25 Ejemplos de GnT IV, también conocida como manosil (alfa-1,3-)-glicoproteína beta-1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa (MGAT4), incluyen la isoenzima A GnT IV de *Mus musculus* (SEQ ID NO: 24, número de acceso NP_776295), isoenzima B de *Mus musculus* (SEQ ID NO: 25, número de acceso NP_666038), isoenzima C de *Mus musculus* (SEQ ID NO: 26, número de acceso NP_080519), isoenzima A de GnT IV de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 27, número de acceso NP_036346), isoenzima B de GnT IV de *Homo sapiens* (isoforma 1, SEQ ID NO: 28, número de acceso NP_055090 o isoforma 2, SEQ ID NO: 29, número de acceso NP_463459) o isoenzima C de GnT IV de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 30, número de acceso NP_037376).
- 30 Ejemplos de GnT V, incluyen GnT V de *Mus musculus* (SEQ ID NO:31, número de acceso NP_660110), isoenzima B de GnT V de *Mus musculus* (SEQ ID NO: 32, número de acceso NP_766536), GnT V de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 33, número de acceso NP_002401), isoenzima B de GnT V de *Homo sapiens* (isoforma 1, SEQ ID NO: 34, número de acceso NP_653278 o isoforma 2, SEQ ID NO: 35, número de acceso NP_945193).
- Ejemplos de GnT VI incluyen GnT VI de *Gallus gallus* (SEQ ID NO: 36, número de acceso NP_990012).
- 35 Ejemplos de manosidasa II (MAN II), también conocida como manosidasa 2, alfa 1 (MAN2A1), incluye MAN II de *Mus musculus* (SEQ ID NO: 37, número de acceso NP_032575) o de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 38, número de acceso NP_002363). Preferiblemente, dicha manosidasa II (MAN II) corresponde a SEQ ID NO: 38 (número de acceso NP_002363).
- 40 Las fucosiltransferasas son bien conocidas por los expertos e incluyen, como un ejemplo, la alfa (1,6) fucosiltransferasa (fucosiltransferasa 8 (FUT8)), como el FUT8 de *Mus musculus* (SEQ ID NO: 39, número de acceso NP_058589) o FUT8 de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 40, número de acceso Q9BYC5). Preferiblemente, dicha fucosil transferasa corresponde a SEQ ID NO: 40 (número de acceso Q9BYC5).
- 45 Las galactosiltransferasas son bien conocidas por los expertos e incluyen, como un ejemplo, una beta (1,4) galactosiltransferasa (B4GALT1), como B4GALT1 de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 66, número de acceso NP_001488), o B4GALT1 de *Mus musculus* (SEQ ID NO: 67, número de acceso CAM14782). Preferiblemente, dicha galactosiltransferasa corresponde a SEQ ID NO: 66 (número de acceso NP_001488).
- 50 Las sialiltransferasas son bien conocidas por los expertos e incluyen, como un ejemplo Alfa 2,6-sialiltransferasa (ST6 beta-galactosamida alfa-2,6-sialiltransferasa 1 (ST6GAL1) o beta galactosida alfa 2,6 sialiltransferasa 2 (ST6GAL2), como ST6GAL2 de *Mus musculus* (SEQ ID NO: 41, número de acceso NP_766417) o ST6GAL1 de *Homo sapiens* (isoforma a, SEQ ID NO: 42, número de acceso NP_775323 o isoforma b, SEQ ID NO: 43, número de acceso NP_775324), o Alfa 2, 3 sialiltransferasa (ST3 beta galactosido alfa-2,3-sialiltransferasa 6 (ST3GAL6), ST3 beta-galactosido alfa-2,3-sialiltransferasa 1 (ST3GAL1), ST3 beta-galactosido alfa-2,3-sialiltransferasa 2 (ST3GAL2), ST3 beta-galactosido alfa-2,3-sialiltransferasa 3 (ST3GAL3), como ST3GAL1 de *Mus musculus* (SEQ ID NO: 44, número de acceso NP_033203) o de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 45, número de acceso NP_003024), ST3GAL2 de *Homo sapiens* (SEQ ID NO:46, número de acceso NP_008858), ST3GAL3 de *Homo sapiens* (isoforma a, SEQ ID NO: 47, número de acceso NP_777623, isoforma b, SEQ ID NO: 48, número de acceso NP_777624, isoforma c, SEQ ID NO:
- 55

49, número de acceso NP_777625, isoforma f, SEQ ID NO: 50, número de acceso NP_777628, isoforma j, SEQ ID NO: 51, número de acceso NP_006270, isoforma d, SEQ ID NO: 52, número de acceso NP_777626, isoforma e, SEQ ID NO: 53, número de acceso NP_777627, isoforma i, SEQ ID NO: 54, número de acceso NP_777631, isoforma g, SEQ ID NO: 55, número de acceso NP_777629, isoforma h, SEQ ID NO: 56, número de acceso NP_777630), o ST3GAL6 de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 57, número de acceso NP_006091).

5 Las microalgas transformadas como se describen aquí anteriormente, que expresan además la enzima GnT I y una actividad de la α -1,3/ α -1,6-manosidasa, tal como Manosidasa II capaz de recortar GlcNAcMan₅GlcNAc₂, para producir GlcNAcMan₃GlcNAc₂.

10 Las microalgas transformadas como se describen aquí anteriormente, que expresan además la enzima GnT I, una actividad de la α -1,3/ α -1,6-manosidasa, tal como Manosidasa II, y la enzima GnT II capaz de transferir β 1,2GlcNAc sobre sustratos, para producir GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂.

15 Las microalgas transformadas como se describen aquí anteriormente, que expresan además la enzima GnT I, una actividad de la α -1,3/ α -1,6-manosidasa, tal como Manosidasa II, y la enzima GnT III capaz de transferir β 1-4-GlcNAc sobre sustratos que son capaces de aceptar la bisección de GlcNAc biseccionada, para producir GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ biseccionada.

Las microalgas transformadas como se describen aquí anteriormente, que expresan además la enzima GnT I, una actividad de la α -1,3/ α -1,6-manosidasa, tal como las enzimas Manosidasa II, Gn T II y GnT III, para producir una GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ biseccionada.

20 Las microalgas transformadas como se describen aquí anteriormente, expresan además la enzima GnT I, una actividad de la α -1,3/ α -1,6-manosidasa, tal como las enzimas Manosidasa II, y uno o más enzimas de glicosilación entre GnT IV, GnT V y GnT VI, para producir glicanos unidos a N tri-antenarios o tetra-antenarios.

Las microalgas transformadas como se describen aquí anteriormente, expresan además la enzima GnT I, una actividad de la α -1,3/ α -1,6-manosidasa, tal como las enzimas Manosidasa II, la enzima GnT II y una o más glicosiltransferasas seleccionadas entre fucosiltransferasas, galactosiltransferasas o sialiltransferasas.

25 Con la información de secuencia de DNA, un experto en la técnica puede clonar moléculas de DNA que codifican actividades de GnT. Utilizando técnicas estándar bien conocidas en la técnica, las moléculas de ácido nucleico que codifican GnT I, II, III, IV, V o VI, manosidasa II o una glicosiltransferasa tal como fucosiltransferasa, galactosiltransferasa o sialiltransferasa (o que codifican fragmentos catalíticamente activos de las mismas) se pueden insertar en vectores de expresión apropiados bajo el control transcripcional de promotores y otras
30 secuencias de control de la expresión capaces de conducir la transcripción en microalgas seleccionadas, de manera que una o más de estas enzimas puedan expresarse activamente en las microalgas.

Preferiblemente, las enzimas son de origen humano, aunque también son útiles otras enzimas de animales, mamíferos, plantas o microalgas.

35 Los genes se cortan para dar fragmentos que codifican los dominios catalíticos de las enzimas. Al eliminar las secuencias de direccionamiento endógenas, las enzimas pueden redirigirse y expresarse en otra localización celular. La elección de dichos dominios catalíticos puede guiarse por el conocimiento del entorno particular en el que el dominio catalítico posteriormente estará activo. Por ejemplo, si una enzima de glicosilación particular tiene que estar activa en el Golgi tardío, y todas las enzimas conocidas del organismo huésped en el Golgi tardío tienen un cierto pH óptimo, entonces se elige un dominio catalítico que muestre una actividad adecuada a ese pH. El DNA que codifica
40 los fragmentos catalíticamente activos de las enzimas se unen luego al DNA que codifica los péptidos señal para localizar las enzimas dentro de la red del ER, Golgi, o trans-Golgi. Estas secuencias de señales pueden seleccionarse del organismo huésped, así como de otros organismos relacionados o no relacionados. Las proteínas unidas a la membrana del ER o Golgi pueden incluir típicamente, por ejemplo, secuencias N-terminales que codifican una cola citosólica (ct), un dominio de transmembrana (tmd) y una región troncal (sr). Las secuencias ct,
45 tmd y sr son suficientes individualmente o en combinación para anclar proteínas a la membrana interna (lumenal) del orgánulo. Otra fuente de secuencias de señales incluye péptidos de señales de recuperación, por ejemplo, los tetrapéptidos HDEL, KDEL, DDEL o una señal de recuperación equivalente, que se encuentra típicamente en el extremo C de las proteínas que indujeron un transporte retrógrado en el ER o Golgi.

La secuencia de nucleótidos operativamente unida a un promotor que impulsa la expresión de GnT I, II, III, IV, V, o VI, Manosidasa II, o una glicosiltransferasa tal como fucosiltransferasa, galactosiltransferasa o sialiltransferasa en dichas microalgas, comprende dicho dominio catalítico del enzima que tiene una actividad óptima en dicho ER y Golgi a un pH entre 5,1 y 8, unida a una señal de direccionamiento celular no asociado normalmente con el dominio catalítico.

55 Para que una glicosiltransferasa funcione satisfactoriamente en el aparato de Golgi, es necesario para la enzima que se proporcionen con concentraciones suficientes de un azúcar de nucleótido apropiado, que es el donante de alta energía del resto de azúcar añadido a una glicoproteína naciente. En los seres humanos, la gama completa de

precursores de azúcar de nucleótido generalmente se sintetiza en el citosol y se transportan al aparato de Golgi, donde se unen al oligosacárido central mediante glicosiltransferasas.

El solicitante observó en microalgas una concentración suficiente de GlcNAc, manosa, fucosa y galactosa, pero no de ácido siálico.

- 5 Por lo tanto, para que una sialiltransferasa funcione satisfactoriamente en el aparato de Golgi, es necesario expresar en la microalga una o más enzimas necesarias para la síntesis de ácido siálico, su activación y su transporte dentro del aparato de Golgi entre UDP-GlcNAc 2-epimerasa, GlcNAc2-epimerasa, GlcNAc-6P 2-epimerasa, NeuAc sintasa, NeuAc-9P sintasa, CMP-NeuAc sintasa y CMP- transportador de ácido siálico (véase, por ejemplo, los trabajos hechos en plantas: Misaki R et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jan 27;339(4):1184-9; Paccalet T et al. *Plant Biotechnol J*. 2007 Jan; 5(1): 16-25).

UDP-GlcNAc 2-epimerasa, que también se conoce como glucosamina (UDP-N-acetil)-2-epimerasa/N-acetilmanosamina quinasa (GNE), es bien conocida por los expertos e incluye, como un ejemplo GNE de *Mus musculus* (SEQ ID NO: 58, número de acceso NP_056643) o GNE de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 59, número de acceso NP_005467). Preferiblemente, dicho GNE corresponde a SEQ ID NO: 59 (número de acceso NP_005467).

- 15 GlcNAc 2-epimerasa es bien conocida por los expertos e incluye, como un ejemplo, la proteína de unión a renina (RENBP) de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 60, número de acceso NP_002901).

NeuAc-9P sintasa, también denominada ácido N-acetilneuramínico sintasa (NANS), es bien conocida por los expertos e incluyen, como un ejemplo, NANS de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 61, número de acceso NP_061819).

- 20 CMP-NeuAc sintasa, que es también conocida como citidina ácido monofosfo-N-acetilneuramínico sintetasa (CMAS), es bien conocida por los expertos e incluye, como un ejemplo CMAS de *Mus musculus* (SEQ ID NO: 62, número de acceso NP_034038) o de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 63, número de acceso NP_061156). Preferiblemente, dicha CMAS corresponde a SEQ ID NO: 63 (número de acceso NP_061156).

- 25 CMP-transportadores de ácido siálico son también bien conocidos por los expertos e incluyen, como un ejemplo, la familia de portadores de soluto 35 (CMP-transportador de ácido siálico), miembro A1 (SLC35A1) de *Mus musculus* (SEQ ID NO: 64, número de acceso NP_036025) o de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 65, número de acceso NP_006407). Preferiblemente, dicho CMP-transportador de ácido siálico corresponde a SLC35A1 de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 65, número de acceso NP_006407).

- 30 La proteína transportadora añadida transporta un azúcar de nucleótido de citosol al aparato de Golgi, donde la glicosiltransferasa puede hacer reaccionar al azúcar de nucleótido, por ejemplo, para alargar un N-glicano. La reacción libera un difosfato o monofosfato del nucleósido, por ejemplo, UDP, GDP, o CMP. Como la acumulación de un difosfato del nucleósido inhibe la actividad adicional de una glicosiltransferasa, con frecuencia es también deseable proporcionar una copia expresada de un gen que codifica un nucleótido difosfatasa. La difosfatasa (específica para UDP o GDP, según corresponda) hidroliza el difosfonucleósido para producir un monofosfato del nucleósido y un fosfato inorgánico. El monofosfato de nucleósido no inhibe la glicosiltransferasa y, en cualquier caso, se exporta del Golgi mediante un sistema celular endógeno.

Las microalgas transformadas utilizadas en el método de la invención expresan una N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnT I) capaz de añadir un resto de N-acetilglucosamina (GlcNAc) a $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ para producir $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$.

- 40 Las microalgas transformadas utilizadas en el método de la invención expresan una N-acetilglucosaminiltransferasa (GnT I, GnT II, GnT III, GnT IV, GnT V, GnT VI), una manosidasa II y una fucosiltransferasa, galactosiltransferasa (GalT) o sialiltransferasas (ST), para producir N-glicanos complejos.

Las microalgas transformadas utilizadas en el método de la invención expresan una enzima GnT I y una actividad de α -1,3/ α -1,6-manosidasa, tal como Manosidasa II capaz de recortar $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ para producir $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$.

- 45 Las microalgas transformadas utilizadas en el método de la invención expresan una enzima GnT I, una actividad de α -1,3/ α -1,6-manosidasa, tal como Manosidasa II, y una enzima GnT II capaz de transferir β 1,2-GlcNAc sobre sustratos, para producir $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$.

- 50 Las microalgas transformadas utilizadas en el método de la invención expresan una enzima GnT I, una actividad de α -1,3/ α -1,6-manosidasa, tal como Manosidasa II, y una enzima GnT III capaz de transferir β 1,4-GlcNAc sobre sustratos que son capaces de aceptar la bisección de GlcNAc, para producir $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ biseccionado.

Las microalgas transformadas utilizadas en el método de la invención expresan una enzima GnT I, una actividad de α -1,3/ α -1,6-manosidasa, tal como las enzimas Manosidasa II, GnT II y GnT III, para producir $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ biseccionado.

Las microalgas transformadas utilizadas en el método de la invención expresan además la enzima GnT I, una actividad de α -1,3/ α -1,6-manosidasa, tal como Manosidasa II, y una o más enzimas de glicosilación entre GnT IV, GnT V y GnT VI, para producir glicoproteínas tri-antenarias o tetra-antenarias.

5 Las microalgas transformadas utilizadas en el método de la invención expresan la enzima GnT I, una actividad de α -1,3/ α -1,6-manosidasa, tal como Manosidasa II, la enzima GnT II y una o más glicosiltransferasas seleccionadas entre fucosiltransferasas, galactosiltransferasas o sialiltransferasas.

10 Las microalgas transformadas utilizadas en el método de la invención expresan la enzima GnT I, una actividad de α -1,3/ α -1,6-manosidasa, tal como Manosidasa II, la enzima GnT II y una o más glicosiltransferasas seleccionadas entre fucosiltransferasas, galactosiltransferasas o sialiltransferasas, siempre que exprese además una o más enzimas necesarias para la síntesis del ácido siálico, su activación y su transporte dentro del aparato de Golgi entre UDP-GlcNAc 2-epimeras, GlcNAc 2-epimerasa, GlcNAc-6P 2-epimerasa, NeuAc sintasa, NeuAc-9P sintasa, CMP-NeuAc sintasa y CMP-transportador de ácido siálico, cuando la glicosiltransferasa seleccionada es una sialiltransferasa.

15 La secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión de GnT I, II, III, IV, V, o VI, Manosidasa II, o una glicosiltransferasa tal como fucosiltransferasa, galactosiltransferasa o sialiltransferasa en dichas células de microalgas, comprende dicho dominio catalítico de la enzima que tiene la actividad óptima en dicho ER o Golgi a un pH entre 5,1 y 8, unida a una señal de direccionamiento celular no asociada normalmente con el dominio catalítico.

20 Las células de microalgas utilizadas en el método de la invención se seleccionan entre algas verdes, algas rojas, cromalveolados, y euglenidos.

Un objetivo de la invención es un método para producir al menos un polipéptido glicosilado que tiene un patrón de glicosilación adecuado para fines terapéuticos, que comprende las etapas de:

25 (i) cultivar una microalga transformada de *Phaeodactylum tricornutum*, que comprende una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión en dicha microalga, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido glicosilado que se expresa en la microalga transformada para obtener la expresión de dicho al menos un polipéptido glicosilado; y

30 (ii) seleccionar dicho al menos un polipéptido glicosilado para determinar el patrón de glicosilación de dicho al menos un polipéptido glicosilado y para seleccionar el al menos un polipéptido glicosilado que tiene al menos una estructura de Man₉GlcNAc₂ a Man₅GlcNAc₂ y no comprende xilosa con enlaces β (1,2) y/o fucosa con enlaces α (1,3),

en donde dichas microalgas transformadas no comparten ninguna actividad de la β (1,2) xilosil transferasa y/o α (1,3) fucosil transferasa antes de transformarse, y no comparte ninguna actividad de la manosiltransferasa que conduce a proteínas hipermanosiladas que resultan de la adición de manosa a la estructura de glicano.

35 Ventajosamente, el método de la invención comprende además la etapa de transformar una microalga previa a la etapa (i) para obtener una microalga como se definió anteriormente.

40 Ventajosamente, el al menos un polipéptido glicosilado presenta un patrón de glicosilación adecuado para fines terapéuticos en animales y es producido por dichas microalgas transformadas sin necesitar en dichas microalgas transformadas la supresión de los genes responsables de la adición de epítomos inmunogénicos tales como en plantas, que añaden xilosa con enlaces β (1,2) y/o fucosa con enlaces α (1,3) a los N-glicanos de proteínas dando como resultado glicoproteínas que difieren en la estructura de los animales y son inmunogénicas en mamíferos, o levaduras que expresan genes de manosiltransferasas añadiendo una manosa a la estructura de glicano y conduciendo a proteínas hipermanosiladas.

45 Por lo tanto, dicho al menos un polipéptido glicosilado no comprende xilosa con enlaces β (1,2) y/o fucosa con enlaces α (1,3) y dichas microalgas no comparten ninguna actividad de la beta (1,2)-xilosisil transferasa y/o alfa fucosil transferasa antes de transformarse.

Además, dichas microalgas no comparten ninguna actividad de la manosiltransferasa que conduce a proteínas hipermanosiladas que resultan de la adición de manosa a la estructura de glicano como se observa en levaduras y hongos.

50 En una realización preferida, dichas microalgas transformadas utilizadas en el método de la invención expresan al menos una enzima seleccionada entre GnT I, II, III, IV, V, o VI, Manosidasa II, o una glicosiltransferasa tal como fucosiltransferasa, galactosiltransferasa o sialiltransferasa, con una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido glicosilado que se expresa en las microalgas transformadas.

En una realización preferida, dicho polipéptido glicosilado producido por dicho método comprende un patrón de glicosilación adecuado para fines terapéuticos, especialmente un patrón de glicosilación animal, preferiblemente un patrón de glicosilación de mamíferos, y más preferiblemente un patrón de glicosilación del tipo humano.

5 Para purificar un polipéptido glicosilado que tiene un patrón de glicosilación adecuado para fines terapéuticos, el método de la invención comprende una etapa para determinar el patrón de glicosilación de dicho al menos un polipéptido glicosilado.

El patrón de glicosilación se puede determinar por un método bien conocido por los expertos.

10 Como ejemplo, se pueden obtener informaciones preliminares sobre la N-glicosilación de la glicoproteína recombinante mediante el análisis de afino- y inmunotransferencia utilizando sondas tales como lectinas (CON A; ECA; SNA; MAA...) y anticuerpos de N-glicanos específicos (anti- β 1,2-xilosa; anti- α -1,3-fucosa; anti-Neu5Gc, anti-Lewis...). Esto se hace según FITCHETTE et al., (Plant proteomics and glycosylation, Methods Mol. Biol., vol.355, p:317-342, 2007) y podría completarse mediante ensayos de desglucosilación.

15 Para investigar el perfil detallado del N-glicano de la proteína recombinante, los oligosacáridos unidos al N se liberan después de la proteína de una manera no específica utilizando digestión enzimática o tratamiento químico (FITCHETTE et al., anteriormente mencionado, 2007; SÉVENO et al., Plant N-glycan profiling of minute amounts of material, Anal. Biochem., vol. 379 (1), p: 66-72, 2008). La mezcla resultante de los oligosacáridos reductores se puede perfilar por HPLC y/o los enfoques de espectrometría de masas (ESI-MS-MS y MALDI-TOF esencialmente, BARDOR et al., Analytical strategies to investigate plant N-glycan profiles in the context of plant-made pharmaceuticals, Curr Opin Struct Biol., vol. 16(5), p: 576-583, 2006, SÉVENO et al., anteriormente mencionado, 2008). Estas estrategias, junto con la digestión con exoglicosidasa, permiten la identificación y cuantificación de N-glicanos (Séveno et al., 2008).

20 Otra alternativa para estudiar el perfil de N-glicosilación de la proteína recombinante es trabajar directamente sobre sus glicopéptidos después de la digestión con proteasa de la proteína, purificación y análisis por espectrometría de masas de los glicopéptidos como se describe en BARDOR et al. (Monoclonal C5-1 antibody produced in transgenic alfalfa plants exhibits a N-glycosylation that is homogenous and suitable for glyco-engineering into human-compatible structures, Plant Biotechnol J., vol. 1(6), p: 451-462, 2003).

25 Todavía para purificar un polipéptido glicosilado que tiene un patrón de glicosilación adecuado para fines terapéuticos, el método de la invención comprende la etapa de seleccionar al menos un polipéptido glicosilado que comparte un patrón de glicosilación adecuado para fines terapéuticos, tal como un patrón de glicosilación que no comprende xilosa con enlaces β (1,2) y/o fucosa con enlaces α (1,3). Más preferiblemente, dicho al menos un polipéptido glicosilado comprende al menos una estructura $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$.

Las microalgas utilizadas en dicho método descrito previamente, se seleccionan entre Diatomeas.

35 En una realización preferida de la invención, el polipéptido glicosilado producido por dicho método se selecciona del grupo que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos primaria de un polipéptido glicosilado humano, una secuencia de aminoácidos primaria de un polipéptido glicosilado de mamífero no humano, una secuencia de aminoácidos primaria de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo, y/o una secuencia de aminoácidos primaria de un polipéptido glicosilado no mamífero.

40 En una realización más preferida, ejemplos de dichos polipéptidos glicosilados expresados en las microalgas transformadas incluyen, pero no se limitan a, eritropoyetina, citoquinas tal como interferones, anticuerpos, factores de coagulación, hormonas, beta-glucocerebrosidasa, pentraxina-3, anti-TNFs...

En otra realización de la invención, dicho método comprende la etapa de aislar el polipéptido glicosilado recombinante después del paso de dicho polipéptido glicosilado recombinante a través del ER y aparato de Golgi de las microalgas transformadas.

45 En otra realización de la invención, las microalgas transformadas utilizadas en el método de la invención comprenden además una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una enzima N-acetilglucosaminiltransferasa que se expresa en las microalgas transformadas.

50 En otra realización de la invención, las microalgas transformadas utilizadas en el método de la invención comprenden además secuencias de nucleótidos unidas operativamente a promotores que impulsan la expresión en dichas microalgas, en donde dichas secuencias de nucleótidos codifican una enzima N-acetilglucosaminiltransferasa I y una enzima manosidasa II que se expresan en las microalgas transformadas.

En otra realización de la invención, las microalgas transformadas utilizadas en el método de la invención comprenden además secuencias de nucleótidos unidas operativamente a promotores que impulsan la expresión en dichas microalgas, en donde dichas secuencias de nucleótidos codifican una enzima N-acetilglucosaminiltransferasa

I, una enzima manosidasa II y una enzima N-acetilglucosaminiltransferasa II que se expresan en las microalgas transformadas.

5 En otra realización de la invención, las microalgas transformadas utilizadas en el método de la invención comprenden además secuencias de nucleótidos unidas operativamente a promotores que impulsan la expresión en dichas microalgas, en donde dichas secuencias de nucleótidos codifican una enzima N-acetilglucosaminiltransferasa I, una manosidasa II y al menos una enzima seleccionada entre N-acetilglucosaminiltransferasa II, IV, V y VI, que se expresan en las microalgas transformadas.

10 En otra realización de la invención, las microalgas transformadas utilizadas en el método de la invención comprenden además secuencias de nucleótidos unidas operativamente a promotores que impulsan la expresión en dichas microalgas, en donde dichas secuencias de nucleótidos codifican una enzima N-acetilglucosaminiltransferasa, una enzima manosidasa II, al menos una enzima seleccionada entre N-acetilglucosaminiltransferasa II, IV, V y VI que se expresan en las microalgas, y al menos una enzima glicosiltransferasa seleccionada entre galactosiltransferasa, fucosiltransferasa y sialiltransferasa, que se expresan en la microalgas transformadas.

15 Cuando las sialiltransferasas se expresan en las microalgas transformadas, dichas microalgas se transforman también con secuencias de nucleótidos que codifican una o más enzimas necesarias para la síntesis del ácido siálico, su activación y su transporte dentro del aparato de Golgi entre UDP-GlcNAc 2-epimerasa, GlcNAc 2-epimerasa, GlcNAc-6P 2-epimerasa, NeuAc sintasa, NeuAc-9P sintasa, CMP-NeuAc sintasa y CMP-transportador del ácido siálico.

20 En una realización preferida de la invención, dicha secuencia de nucleótidos operativamente unida a un promotor que impulsa la expresión de N-acetilglucosaminiltransferasas, manosidasa II o glicosiltransferasas en dichas microalgas, comprende dicho dominio catalítico de la enzima que tiene una actividad óptima en dicho ER y Golgi a un pH entre 5,1 y 8, unida a una señal de direccionamiento celular no asociada normalmente con el dominio catalítico.

25 En una realización de la invención, previo a la transformación de las microalgas, dichas secuencias de nucleótidos se pueden someter a una o más rondas de barajado de genes, PCR propensa a errores o mutagénesis in vitro.

La transformación de las microalgas se puede realizar mediante métodos convencionales tales como bombardeo de micropartículas, electroporación, perlas de vidrio, polietilenglicol (PEG), patillas de carburo de silicio, o uso de virus o agrobacterias.

30 En una realización de la invención, las secuencias de nucleótidos se pueden introducir en las microalgas mediante plásmidos, secuencias víricas, DNA bicatenario o monocatenario, DNA circular o lineal.

35 En otra realización de la invención, es generalmente deseable incluir en cada secuencia de nucleótidos o vectores al menos un marcador seleccionable para permitir la selección de microalgas que se han transformado de manera estable. Ejemplos de dichos marcadores son los genes resistentes a antibióticos, tales como los genes sh ble que permiten la resistencia a zeocina, los genes nat o sat-1 que permiten la resistencia nouseotricina, el gen bar que permite la resistencia a glufosinato.

40 Después de la transformación de las microalgas, se seleccionan transformantes que muestran las proteínas que muestran el fenotipo de glicosilación deseado. La selección se puede llevar a cabo mediante uno o más métodos convencionales que comprenden: espectrometría de masas tal como MALDI-TOF-MS, cromatografía ESI-MS, caracterización de células utilizando un clasificador de células activadas por fluorescencia, espectrofotómetro, fluorímetro o contador de centelleo; exposición de las células a una lectina o anticuerpo que tiene una afinidad específica por un resto de oligosacárido deseado; exposición de las células a una molécula citotóxica o radioactiva seleccionada del grupo que consiste en azúcares, anticuerpos o lectinas.

45 La solicitud también describe el uso de una microalga transformada como se describió anteriormente para producir al menos un polipéptido glicosilado.

Dicha microalga y al menos un polipéptido glicosilado se describen anteriormente.

50 Ventajosamente, dichas microalgas permiten la producción de dicho polipéptido glicosilado con un patrón de glicosilación adecuado para fines terapéuticos en animales sin necesitar la supresión, en dichas microalgas, de los genes responsables de la adición de epítomos inmunogénicos tales como en plantas, que añaden xilosa con enlaces $\beta(1,2)$ y fucosa con enlaces $\alpha(1,3)$ a los N-glicanos de la proteína dando como resultado glicoproteínas que difieren en estructura de animales y son inmunogénicos en mamíferos, o levaduras que expresan los genes de manosiltransferasa añadiendo manosa a la estructura de glicano y que conducen a proteínas hipermanosiladas.

55 De hecho, dicho al menos un polipéptido glicosilado no comprende xilosa con enlaces $\beta(1,2)$ y/o fucosa con enlaces $\alpha(1,3)$ y dichas microalgas no comparten ninguna actividad de la beta (1,2)-xilosil transferasa y/o alfa (1,3)-fucosil transferasa antes de transformarse.

Por lo tanto, dichas microalgas no comparten ninguna actividad de la manosiltransferasa que conduce a proteínas hipermanosiladas que resultan de la adición de manosa a la estructura de glicano como se observa en levaduras y en hongos.

5 Todavía ventajosamente, dicho al menos un polipéptido glicosilado comprende al menos una estructura $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$.

Un objetivo de la invención son los polipéptidos glicosilados producidos por el método como se describió aquí anteriormente.

La solicitud también describe una composición farmacéutica que comprende al menos un polipéptido glicosilado producido por el método descrito aquí anteriormente.

10 La solicitud describe también una composición veterinaria que comprende el polipéptido glicosilado producido por el método de la invención.

Ejemplos

En la siguiente descripción, todos los experimentos para los que no se proporciona un protocolo detallado se realizan de acuerdo con el protocolo estándar.

15 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deberían apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor para que funcionen bien en la práctica de la invención y, por lo tanto, se pueden considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente descripción, apreciar que pueden realizarse muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y seguir obteniendo un resultado similar o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

Materiales y métodos

Análisis del genoma en silicio

25 La identificación de genes en el genoma de *Phaeodactylum tricornutum* se llevó a cabo mediante el análisis BLAST con los genes específicos de *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Physcomitrella patens*, *Medicago truncatula*, *Zea mays* y *Medicago sativa* (<http://genome.jgi-psf.org/Phatr2/Phatr2.home.html>). Las búsquedas de péptidos señal y la localización/direccionamiento celular de las proteínas putativas maduras se realizaron utilizando SignalP (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) y TargetP (www.cbs.dtu.dk/services/TargetP).

30 La presencia del dominio de transmembrana predicho así como la búsqueda para dominios pfam específicos se llevaron a cabo respectivamente con www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM y <http://smart.embl-heidelberg.de>.

Condiciones de cultivo estándar de *Phaeodactylum tricornutum* y *Tetraselmis suecica*

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron CCAP 1052/1A de *Phaeodactylum tricornutum*, el clon P.t.1.8.6 de *Phaeodactylum tricornutum* y CCMP 904 de la Prasinofita *Tetraselmis suecica*.

35 Las microalgas se cultivaron a 20°C bajo iluminación continua (280-350 μmol fotones m^2s^{-1}), en agua de mar natural costera (origen St. Malo, Francia) esterilizada mediante filtración de 0,22 μm .

Esta agua de mar está enriquecida con medios nutritivos Conway (Walne, 1966) con adición para las diatomeas de sílice (40 g/L de metasilicato de sodio; 1 ml/L). Para grandes volúmenes (de 2 litros a 300 litros) los cultivos se airearon con una mezcla CO_2 /aire al 2% para mantener el pH en un intervalo de 7,5-8,1.

40 Para la transformación genética, las microalgas se extendieron en gelosa que contiene 1% de agar. Después de la concentración por centrifugación, las microalgas se extendieron en placas de Petri selladas y se incubaron a 20°C bajo iluminación constante. La concentración de cultivos se estimó en células de conteo de Mallassez después de la fijación de las microalgas con una solución de Lugol.

Condiciones de cultivo estándar de *Chlorella*

La cepa utilizada en este trabajo fue *Chlorella sorokiniana*.

45 Las microalgas se cultivaron a 28°C bajo iluminación continua (280-350 μmol fotones m^2s^{-1}), en medio Kuhl (Kuhl y Lorenzen 1964). Para grandes volúmenes (de 2 litros a 300 litros) los cultivos se airearon con una mezcla CO_2 /aire al 2% para mantener el pH en un intervalo de 7,5-8,1.

Para la transformación genética, las microalgas se extendieron en gelosa que contiene 1% de agar. Después de la concentración por centrifugación, las microalgas se extendieron en placas de Petri selladas y se incubaron a 28°C

bajo iluminación constante. La concentración de cultivos se estimó en células de conteo de Mallassez después de la fijación de las microalgas con una solución de Lugol.

Extracción de proteínas de *Phaeodactylum tricornutum* para el análisis de N-glicosilación

5 El cultivo concentrado ($20 \cdot 10^6$ células/L) se centrifugó primero a 5000 g durante 20 minutos a 4°C. El sedimento se liofilizó después. Dos gramos de microalga liofilizada se molieron en un mortero en presencia de arena utilizando un
 10 tampón Tris-HCl 750 mM pH 8 que contiene 15% (peso/volumen) de sacarosa, 2% (volumen/volumen) de β -mercaptoetanol y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 1 mM y después se centrifugó durante 30 minutos a 11500 gramos, a 4°C. Las proteínas del sobrenadante se precipitaron con sulfato de amonio al 90% durante 2 horas a temperatura ambiente (RT) bajo agitación y se centrifugó durante 30 minutos a 11500 gramos. El sedimento se
 15 solubilizó en agua y después, se dializó frente a agua, durante una noche a 4°C. Finalmente, el extracto de proteína total se ultracentrifugó a 30000 gramos durante 1 hora a 4°C y se resuspendió en el menor volumen de agua, antes de la cuantificación de proteínas y posterior análisis.

Cuantificación de proteínas

15 La cuantificación de proteínas se llevó a cabo sobre los extractos de proteínas totales de *Phaeodactylum tricornutum* utilizando el conjunto de ensayos de proteínas BCA de Pierce según las instrucciones del fabricante.

Análisis de inmuno- y afinotransferencia

20 Cincuenta μ g del extracto de proteínas totales de las microalgas se separaron mediante SDS-PAGE utilizando un gel de poliacrilamida al 12%. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se tiñeron con Ponceau Red para el control de la eficiencia de transferencia. La membrana de nitrocelulosa se bloqueó durante la
 25 noche a temperatura ambiente con disolución salina Tris-tamponada (TBS) que contiene 0,1% de Tween 20 (TBS-T) para la afinodetección y durante la noche en gelatina al 3% disuelta en TBS para la inmunodetección. La inmunodetección se llevó a cabo utilizando anticuerpos específicos de fabricación casera del núcleo- β 1,2-xilosa y núcleo- α 1,3-fucosa (1:3000 en TBS que contiene 1% de gelatina, 2 horas, temperatura ambiente). Después de lavar con TBS-T (6 veces, 5 minutos), la unión de los anticuerpos se detectó utilizando un anticuerpo IgG anti-conejo de
 30 cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante secundario diluido a 1:3000 en TBS que contenía 1% de gelatina durante 1,5 horas a temperatura ambiente (Bio-Rad). El desarrollo final de las transferencias se realizó utilizando 4-cloro 1-naftol como se describió previamente (Fitchette et al., 2007). La afinodetección utilizando concanavalina A se llevó a cabo por incubación con la lectina a 25 μ g/mL, 2 horas, temperatura ambiente en TBS-T, complementado con
 35 CaCl_2 1 mM y MgCl_2 1 mM. Después del lavado con TBS-T complementado con CaCl_2 y MgCl_2 (6 veces, 5 minutos), la unión de esta lectina se detectó utilizando una peroxidasa de rábano picante diluida a 50 μ g/mL, 1 hora a temperatura ambiente en TBS-T complementada con CaCl_2 1 mM y MgCl_2 1 mM. Después de lavar con el mismo TBS-T y después, TBS, el desarrollo final de las transferencias se realizó utilizando 4-cloro-1-naftol como se describió previamente (Fitchette et al., 2007). La afinodetección con fitohemaglutinina E y L biotiniladas (PHA-E y L),
 40 Aglutinina biotinilada de *Erythrina Crista Galli* (ECA) y aglutinina de cacahuete biotinilada (PNA) se realizaron mediante la incubación de estas lectinas a 20 μ g/mL en respectivamente TBS-T para PHA-E y L y TBS-T complementada con CaCl_2 0,1 mM y MnCl_2 0,5 mM. Después del lavado con TBS-T adecuado, la unión de estas lectinas se detectó utilizando estreptavidina acoplada con peroxidasa de rábano picante diluido a 1/3000, 45 minutos a temperatura ambiente en TBS-T adecuado. El desarrollo final de las transferencias se llevó a cabo como para la afinodetección de concanavalina A.

40 La oxidación del resto de glicano de las glicoproteínas se llevó a cabo en una transferencia utilizando periodato de sodio según Fitchette-Lainé et al., 1998.

Desglicosilación mediante PNGasa F o Endo H

El ensayo de desglicosilación se realizó sobre el extracto de proteínas total utilizando péptido N-glicosidasa F aislada de *Flavobacterium meningosepticum* (PNGasa F) o utilizando Endoglicosidasa H (Endo H).

45 1 mg de proteínas totales se disolvieron primero en 2 ml de tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5 que contiene 0,1% de SDS. La muestra se calentó 5 minutos a 100°C para la desnaturalización de la proteína. Después de enfriar, se añadieron 2 mL de tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, que contiene 0,5% de Nonidet P-40 a la muestra, así como 10 unidades de PNGasa F. La digestión se incubó durante 24 horas a 37°C. Después de la digestión, las proteínas se precipitaron con 4 volúmenes de etanol 24 horas a -20°C, antes de la separación por SDS-PAGE, la transferencia y
 50 la afinodetección con concanavalina A.

Galactosilación *in vitro*

La galactosilación *in vitro* se llevó a cabo tratando 50 μ g de un extracto de proteína total con 50 mU de β (1,4)galactosiltransferasa de leche bovina (Fluka) en 1 mL de tampón de cacodilato de sodio 100 mM pH 6,4 en presencia de 5 μ mol de UDP-galactosa y 5 μ mol de MnCl_2 a 37°C durante 24 horas (Bardor et al., 2003). La muestra

se liofilizó. Después, las proteínas y glicoproteínas se separaron por SDS-PAGE y el gel se electrotransfirió sobre nitrocelulosa. Las proteínas se afinodetectaron utilizando lectina ECA biotinilada, como se describió anteriormente.

Composición del monosacárido

5 Los extractos de proteínas totales se sometieron a una metanolisis de 16 horas a 80°C con 500 µL de HCl metanólico 1 M. Después de la evaporación y etapas adicionales de lavado con metanol, las muestras se re-acetilaron por adición en 200 µL de metanol de 20 µL de ácido acético anhidro y 20 µL de piridina. Los N-acetil metil glicósidos resultantes (metil éster) se secaron y se convirtieron después en sus trimetilsilil derivados y se separaron por cromatografía de gases (GC). El cromatógrafo de gases se equipó con un detector de ionización de llama, un WCOT unido a la columna capilar de sílice (longitud 25 m, diámetro interno 0,25 mm) con CP-Sil 5 CP como fase estacionaria y helio como gas vector. El programa de temperatura del horno fue: 2 minutos a 120°C, 10°C/min a 160°C, y 1,5°C/min a 220°C y después 20°C/min a 280°C. La cuantificación del azúcar se realizó por integración de los picos y determinación de los valores molares correspondientes utilizando factores de respuesta establecidos con monosacáridos estándar. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de impacto electrónico (GC-EI MS) se llevó a cabo utilizando una cromatografía de gases Hewlett-Packard serie 6890 acoplado con un espectrómetro de masas Autospec de geometría EBE (Micromass, Manchester, UK) equipado con un sistema de datos Opus 3.1. Las separaciones cromatográficas se obtuvieron utilizando una columna capilar de sílice CP-sil 5CB (25 m, 0,25 mm de diámetro interno, 0,25 µm de espesor de película, Chrompack) recubierta con polidimetilsiloxano. El helio fue el gas portador y la velocidad de flujo fue de 0,8 mL min⁻¹. La temperatura del horno se programó como sigue: inicialmente se estableció a 120°C durante 2 min, se aumentó a una velocidad de 10°C min⁻¹ a 160°C, después se aumentó a una velocidad de 1,5°C min⁻¹ a 220°C y finalmente se aumentó a 280°C a una velocidad de 15°C min⁻¹. Las temperaturas del inyector, la interfaz y las líneas fueron 250°C. Las inyecciones de 0,5 µL se realizaron con una relación de división de 5. El espectro de masas de impacto electrónico se registró utilizando una energía de electrones de 70eV, un voltaje de aceleración de 8kV y un poder de resolución de 1000. La corriente de la trampa fue de 200 µA y la velocidad de escaneo de imán fue 1s/década en un intervalo m/z de 800-4000. La temperatura de la fuente de iones fue 250°C.

Análisis del ácido siálico

30 Los ácidos siálicos unidos de los extractos de proteínas totales se liberaron utilizando hidrólisis con ácido acético 2M, 3h a 80°C (Varki y Diaz, 1984). Los ácidos siálicos liberados se pasaron a través de Microcon® YM-10 (Fisher Scientific) antes de la derivatización con DMB. La derivatización con DMB se realizó según Hara et al., 1989. Los derivados DMB-ácido siálico de las diferentes fracciones fueron después, analizados mediante cromatografía líquida de alta eficacia utilizando una columna C18 (C18 monomérica S/N E000930-10-2) y las condiciones de elución como se reportaron anteriormente (Klein et al., 1997). El eluyente se monitorizó por fluorescencia. Los derivados resultantes se recogieron, secaron y se analizaron por MALDI-TOF MS como se describió anteriormente.

Aislamiento de glicanos unidos a N

35 Las proteínas totales se digirieron por sucesivos tratamientos con pepsina y PNGasa A como se describió previamente en Fitchette et al., 2007. Brevemente, 4 mg de proteínas se digirieron con 6 mg de pepsina en 2 mL de HCl 10 mM, pH 2,2, a 37°C durante 48 horas. Después de neutralización con hidróxido de amonio 1 M, la disolución se calentó durante 5 minutos a 100°C y se liofilizó. Los glicopéptidos se desglicosilaron después durante una noche a 37°C con PNGasa A (10 mU, Boehringer Mannheim) en un tampón de acetato de sodio 100 mM, pH 5,0. Los N-glicanos se purificaron por sucesivas eluciones a través de una columna AG 50W-X2 (Bio-RAD) y un cartucho C18 (Varian).

Preparación y digestión con exoglicosidasa de oligosacáridos 2-AB

45 Los N-glicanos purificados se marcaron con 2-aminobenzamida (2-AB) utilizando el protocolo optimizado descrito en Bigge et al., 1995. Brevemente, los N-glicanos se disolvieron en 10 µL de 2-AB en dimetilsulfóxido-ácido acético glacial 0,35 M (7:3 volumen/volumen) que contiene cianoborohidruro de sodio 1 M. Después de la incubación a 60°C durante 2 horas, la mezcla se aplicó a una tira de papel cromatográfico (Whatmann 3MM, longitud, 10 cm; ancho, 3 cm). La cromatografía de papel ascendente se realizó utilizando n-butanol/etanol/agua (4/1/1 volumen/volumen/volumen) a temperatura ambiente durante 45 minutos en un recipiente de vidrio. Después de la migración, el papel se secó utilizando un secador de pelo. Después, los N-glicanos marcados se detectaron utilizando una luz ultravioleta y se eluyeron utilizando agua y después se liofilizaron. Para la digestión con exoglicosidasa, 200 miliunidades de α-manosidasa de frijol Jack (Sigma-Aldrich) se desalaron por ultrafiltración y se incubaron durante una noche a 37°C con aproximadamente 50 pmoles de una mezcla de N-glicano marcado con 2-AB. Después, la digestión se analizó directamente mediante espectrometría de masas del tiempo de ionización de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF) utilizando las condiciones descritas anteriormente.

55 Análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF de N-glicanos marcados con 2-AB

Los espectros de masas de MALDI-TOF de los N-glicanos marcados con 2-AB se adquirieron en un instrumento Voyager DE-Pro MALDI-TOF (Applied Biosystems, USA) equipado con un láser de nitrógeno de 337 nm. Los

espectros de masas se realizaron de modo de extracción retardada con reflector utilizando ácido 2,5-dihidroxibenzoico (Sigma-Aldrich) como matriz. La matriz, recién disuelta a 5 mg/mL en acetonitrilo/0,1% de TFA 70:30, se mezcló con los oligosacáridos solubilizados en agua en una relación 1:1 (volumen/volumen). Estos espectros se registraron en un modo positivo, utilizando un voltaje de aceleración de 20000 V con un tiempo de retardo de 100 ns. Se suavizaron una vez y se calibraron externamente utilizando mezclas disponibles comercialmente de péptidos y proteínas (Applied Biosystems). En este estudio, el espectro ha sido calibrado externamente utilizando des-Arg¹-bradicinina (904,4681 Da), angiotensina I (1296,6853), Glu¹-fibrinopéptido B (1570,6774 Da), ACTH₁₈₋₃₉ (2465,1989 Da) e insulina bovina (5730,6087 Da). Se acumularon tomas de láser para cada espectro con el fin de obtener una relación señal/ruido aceptable.

10 Constructos de expresión para EPOm

El vector de clonación pPHA-T1 construido por Zavlaskaia et al., (2000) incluye secuencias de los promotores fcp-A y fcp-B de *P. tricornutum* (fucoxantina-clorofila a/c-proteínas de unión A y B) y el terminador de fcpA. Contiene un casete de selección con el gen she ble y un MCS que flanquea el promotor fcpA. La eritropoyetina murina (EPO) se codifica por un gen de 600 pares de base (secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1). El plásmido pCMV-EPO, proporcionado por B. Pitard, Inserm UMR533 Nantes Francia, contiene la secuencia del gen de la EPO posterior a un promotor de citomegalovirus. El gen de la EPO se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando pCMV-EPO como platilla y los cebadores FE1epo, RH3epo o RH3His6epo, permitiendo la adición de sitios de restricción EcoRI y HindIII. Después de la digestión con EcoRI y HindIII, el inserto se introdujo en el vector pPHA-T1.

FE1epo	CATgAATTCATgggggTgCCCgAACgTC	SEQ ID N°2
RH3epo	CATAAgCTTTCACCTgTCCCCTCTCCTg	SEQ ID N°3
RH3His6epo	CATAAgCTTTCAgTggTggTggTggTggTgC CTgTCCCCTCTCCTgCAG	SEQ ID N°4

20

Constructos de expresión para PTX3 humano

El vector de clonación pPHA-T1 construido por Zavlaskaia et al., (2000) incluye secuencias de los promotores fcpA y fcpB de *P. tricornutum* (fucoxantina-clorofila a/c-proteínas de unión A y B) y el terminador de fcpA. Contiene un casete de selección con el gen she ble y un MCS que flanquea el promotor fcpA. La Pentraxina 3 humana (PTX3) se codifica por un gen de 1146 pares de bases (secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 5 CCDS3180.1). El plásmido pPTX3 (cDNA) se compró a la compañía alemana RPDZ. El gen PTX3 se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando pPTX3 como plantilla y los siguientes cebadores que permiten la adición de sitios de restricción EcoRV y HindIII. Después de la digestión con EcoRV y HindIII, el inserto se introdujo en el vector pPHA-T1.

25

FE5PTX3	CATgATATCATGCATCTCCTTGCGATTCT	SEQ ID N°6
RH3PTX3	CCTAAgCTTTTATgAAACATACTgAgCTCC	SEQ ID N°7

30

Constructos para la transformación de *P. tricornutum*: modificación de las vías de síntesis de N-glicanos

Se diseñaron tres vectores para introducir los genes humanos de las vías de N-glicosilación en *P. tricornutum*.

El esqueleto de estos vectores es pPHA-T1.

El primer vector es pG1. Este vector comprende:

- el gen cat (cloranfenicol acetiltransferasa que confiere resistencia al cloranfenicol) bajo el control del promotor del citomegalovirus (pCMV) y el terminador fcpA: [pCMV-cat-tfcpA]
- un sitio de clonación múltiple rodeado por el promotor del virus del mosaico de la coliflor (p35S) y el terminador fcpA: [p35S-MCS-tfcpA].

35

El vector pG2 comprende:

- el gen nat (resistencia a Nourseotricina) bajo el control del promotor del citomegalovirus (pCMV) y el terminador fcpA: [pCMV-nat-tfcpA]

40

- un sitio de clonación múltiple rodeado por el promotor del virus del mosaico de la coliflor (p35S) y el terminador fcpA: [p35S-MCS-tfcpA].

El tercer vector, pG3, comprende un sitio de clonación múltiple rodeado por el promotor del virus del mosaico de la coliflor (p35S) y el terminador fcpA: [p35S-MCS-tfcpA].

5 Los siguientes genes humanos de las vías de glicosilación se insertaron en MCS de los vectores pG1, pG2 o pG3:

- GNTI humano (SEQ ID NO: 19, ID del gen humano: 4245) se insertó en pG1. Este vector se nombró entonces como pG1 GNT1.
- Manosidasa II humana (SEQ ID NO: 38, ID del gen humano: 4124) se insertó en pG3. Este vector se nombró entonces como pG3ManII.

- 10
- GNTII humano (SEQ ID NO: 21, ID del gen humano: 4247) se insertó en pG2. Este vector se nombró entonces como pG2GNTII.
 - Alfa 1,6-fucosil transferasa humana (SEQ ID NO: 40, ID del gen humano: 2530) se insertó en pG3. Este vector se nombró después como pG3FucTransf.

Constructos para la expresión de sh ble en *Tetraselmis suecica* y *Chlorella sorokiniana*

- 15 El vector p35SshbleTnos se construyó en los laboratorios PBA (IFREMER) utilizando un plásmido pUC19. Incluye el promotor del virus del mosaico de la coliflor (p35S), el gen sh ble que confiere resistencia a la zeocina y el terminador de la nopalina sintasa (Tnos).

- 20 El vector pUbi1barTnos se construyó en los laboratorios PBA (IFREMER) utilizando un plásmido pUC19. Incluye el promotor ubiquitina 1 del maíz (Ubi1), el gen bar que confiere resistencia al glufosinato y el terminador de la nopalina sintasa (Tnos).

Transformación genética

La transformación genética se llevó a cabo mediante bombardeo de partículas utilizando el aparato BIORAD PDS-1000/He según Thomas et al., (2001).

- 25 Los cultivos de microalgas (ccapIO52/1A de *P. tricornutum*, ccmp904 de *Tetraselmis suecica* o *Chlorella sorokiniana*) en fase de crecimiento exponencial se concentraron por centrifugación (10 minutos, 2150 g, 20°C), se diluyeron en agua estéril (agua de mar para *P. tricornutum* y *T. suecica*, agua destilada para *C. sorokiniana*), y se esparcieron en geloslas a 10⁸ células por placa. Los microportadores fueron partículas de oro (diámetro 0,6 µm). Los microportadores se prepararon según el protocolo del proveedor (BIORAD). Los parámetros utilizados para la prueba fueron los siguientes:

- 30
- uso de la boquilla larga,
 - uso del anillo de parada con el agujero más grande,
 - 15 cm entre el anillo de parada y el objetivo (células de microalgas),
 - precipitación del DNA con CaCl₂ 1,25 M y espermidina 20 mM,
 - una relación de 1,25 µg de DNA para 0,75 mg de partículas de oro por toma,
- 35
- disco de ruptura de 900 psi con una distancia de escape de 0,2 cm para la microalga *Phaeodactylum tricornutum*, disco de ruptura de psi con una distancia de escape de 0,4 cm para *Tetraselmis suecica*, disco de ruptura de 650 psi y una distancia de escape de 0,1 cm para *Chlorella sorokiniana*.
 - un vacío de 30 Hg, y
 - cuatro tomas por placa Petri.

- 40 Las microalgas se incubaron 48 horas antes de la adición del antibiótico zeocina (100 µg/ml para *Phaeodactylum tricornutum* o 500 µg/ml para *Tetraselmis suecica* o 200 µg/ml para *Chlorella sorokiniana*) o adición de glufosinato (1 mg/ml) para *Chlorella sorokiniana* y se mantuvieron después a 20°C (o 28°C para *Chlorella sorokiniana*) bajo iluminación constante.

Extracción del DNA de las microalgas

- 45 5.10⁸ células de microalgas se sedimentaron por centrifugación (2150 g, 15 minutos, 4°C). Las células de microalgas se incubaron durante la noche a 4°C con 4 mL de tampón TE NaCl 1X (Tris-HCl 0,1 M, EDTA 0,05 M, NaCl 0,1 M,

pH 8). 1% de SDS, 1% de Sarkosyl y 0,4 mg. mL⁻¹ de proteinasa K se añadieron después a la muestra, seguido por 90 minutos de incubación a 40°C. Se llevó a cabo una primera extracción con fenol-cloroformo de alcohol isoamílico para extraer una fase acuosa que comprende los ácidos nucleicos.

5 El RNA presente en la muestra se eliminó mediante una hora de incubación a 60°C en presencia de RNasa (1 µg.mL⁻¹). Una segunda extracción con fenol-cloroformo se llevó a cabo, seguido por una precipitación con etanol.

Finalmente, el sedimento se secó y se solubilizó en 200 µl de agua estéril ultrapura. La cuantificación del DNA se realizó por espectrometría (260 nm) y se analizó por electroforesis.

Extracción del RNA

10 10⁷ células se sedimentaron a partir de un cultivo en una fase de crecimiento exponencial por centrifugación a 2150 g durante 10 minutos a 4°C, el sedimento se congeló con nitrógeno líquido y las extracciones del RNA se realizaron con un kit Gen ELute™ Mammalian Total RNA Miniprep kit (Sigma).

Detección de RNA recombinante por transcripción inversa y PCR

RT-PCRs se llevaron a cabo con el equipo Enhanced Avian RT First Strand Synthesis Kit (Sigma) según las instrucciones del fabricante, utilizando cebadores polydT y los siguientes cebadores específicos.

FrEPO	TCTTAgAggCCAaggAggCagAAA	SEQ ID N°8
RrEPO	ACCCggAAgAgCTTgCagAAAgTA	SEQ ID N°9
FrPTX3	CTAGAGGAGCTGCGGCAGA	SEQ ID N°10
RrPTX3	CACCCACCACAAACACTATGGAT	SEQ ID N°11

15

Preparación del extracto crudo de microalgas para la detección de EPO o PTX3

20 10⁷ células se sedimentaron a partir de un cultivo en fase de crecimiento exponencial por centrifugación a 2150 g durante 10 minutos a 4°C. Después del lavado con tampón TBS 1X, las células se congelaron en nitrógeno líquido, después se resuspendieron con 1 mL de tampón TBS. La suspensión celular se sometió a sonicación después durante 30 minutos a 4°C y se centrifugó a 4500 g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se recogió finalmente y correspondió a los extractos crudos de las microalgas.

25 En algunos casos, las proteínas de los extractos crudos se precipitaron con sulfato de amonio al 90% (NH₄)₂SO₄ mientras se incubaban a 4°C bajo agitación durante 2h30min. Después de una centrifugación a 9000 g a 4°C durante 30 min, la disolución se suspendió en agua milliQ y se homogeneizó antes de dializarse durante la noche a 4°C frente a agua.

La concentración de proteína de las muestras se midió utilizando el "BCA™ Protein Assay Kit" (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante. La separación electroforética de las proteínas se realizó en un gel de poliacrilamida al 15%. Después del SDS-PAGE, la inmunodetección se llevó a cabo con un anticuerpo anti-murino de EPO murino, un anticuerpo anti-humano PTX3 o un anticuerpo anti-His-tag (R&D systems).

30 Ensayo ELISA

El análisis de las muestras de proteínas por ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima) se llevó a cabo sobre los extractos celulares crudos.

Los ensayos se realizaron con el Kit de inmunoensayos ELISA Quantikine Mouse/Rat EPO (R&D Systems) o con el Kit Human Pentraxin 3/TSG-14 Quantikine ELISA (R&D Systems), según las instrucciones del fabricante.

35 Purificación de proteínas recombinantes marcadas en His

40 1 ml de resina (perlas de Ni-NTA, Hi-Trap chelating HP Amersham Biosciences) se mezcla en una disolución acuosa que contiene imidazol 0,1 M durante 2 horas a temperatura ambiente y bajo agitación. Las muestras de proteínas liofilizadas se mezclan en un pequeño volumen de tampón (Tris pH 7,6, 30 mM, glicerol al 20%, NaCl 50 mM, PMSF 1 mM, β-mercaptoetanol 1 mM) que contiene imidazol 0,1 M. La resina y las muestras se mezclan después y se incuban 2 horas a 4°C bajo agitación. Después de 10 minutos de centrifugación (4000 g a 4°C), el sobrenadante se desecha y se añaden 20 ml de tampón de lavado (Na₂HPO₄ 20 mM, glicerol al 20%, NaCl 0,5 M, PMSF 1 mM, β-mercaptoetanol 1 mM, que contiene imidazol 0,250 M). Después de una mezcla suave y centrifugación (10 min a 4000 g 4°C), el sedimento se resuspende en 3 ml de tampón de elución (Na₂HPO₄ 20 mM, glicerol al 20%, NaCl 0,5 M, PMSF 1 mM, β-mercaptoetanol 1 mM) que contiene imidazol 1 M. La muestra se incuba después bajo agitación durante 2 horas a 4°C. Después de 10 minutos de centrifugación (4000 g a 4°C), el sobrenadante se recoge y el imidazol se elimina después de las muestras utilizando columnas centricon de 3 kDa (Millipore) según las instrucciones del fabricante.

45

Bioensayo de EPO

El bioensayo de la EPO recombinante producida en *Phaeodactylum tricornutum* se realizó utilizando la línea celular TF-I de eritroleucemia humana adquirida de ATCC. Cuando se cultivan con EPO, las células TF-I se diferencian por producir hemoglobina.

- 5 Las células se cultivaron (37°C, 5% de CO₂) en RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, L-glutamina 2mM, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin y 5 ng/mL del factor estimulante de la colonia de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). 24 horas antes del bioensayo de EPO, GM-CSF se eliminó del medio de cultivo celular. Las células se incubaron después durante 3 días con 0,1-10 ng/mL de EPO de ratón recombinante (control positivo) o 0,1-10 ng/mL de EPO murino recombinante de *Phaeodactylum tricornutum* (basado en la cuantificación por ELISA). Las células se incubaron también con un volumen similar de extracto de *Phaeodactylum tricornutum* como un control negativo (*Phaeodactylum tricornutum* transformado por el plásmido pPHA-T1).

- 15 El día 3, las células diferenciadas que producen hemoglobina se tiñeron utilizando el método de bencidina descrito en Matsubara et al., (J. Biol. Chem., vol 284 (6), p: 3480-3487, 2009). Las células con el citoplasma con tinción azul-marrón se contaron como células hemoglobinizadas. La viabilidad celular se evaluó también utilizando azul tripán. Se contaron 200 células en cada análisis y los experimentos se repitieron tres veces.

Los resultados se expresaron como un porcentaje de células diferenciadas y viables (+/- SEM).

Resultados

Análisis en silicio del genoma de *Phaeodactylum tricornutum*

- 20 La vía biosintética de N-glicanos se puede dividir en tres etapas en eucariotas: 1- la síntesis del donante de oligosacárido unido a pirofosfato de dolicol Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol y su transferencia mediante la oligosacaryltransferasa (OST) a los restos de asparagina de los polipéptidos nacientes que ingresan al lumen de retículo endoplásmico rugoso, 2- la desglucosilación/reglucosilación del N-glicano precursor en el retículo endoplásmico (ER) que permite la interacción con los chaperones responsables del plegamiento y la oligomerización adecuados y finalmente 3- la maduración en el aparato de Golgi en oligosacáridos unidos a N del tipo de manosa alta y después N-glicanos del tipo complejo. Basados en homologías de secuencia con genes que codifican estas diferentes etapas en organismos eucarióticos, identificamos en el genoma de *Phaeodactylum tricornutum* un conjunto de secuencias putativas para las etapas de la biosíntesis y maduración de N-glicanos del tipo de manosa alta (véase Fig. 1 y Table 2). La mayoría de estos genes identificados tienen soporte EST (Fig. 1, Tabla 2).

Tabla 2

Referencias y características de las proteínas putativas implicadas en la biosíntesis de N-glicanos en *P. tricornutum*

Nº ¹	Proteína ²	Longitud de proteína	EST		Péptido de señal	TMD ⁵	Pfam
			P.t.1.8.6 ³	P.t.3 ⁴			
35	Síntesis del precursor del fosfato de dolicol						
	9724 GlcNAcT PF00953	372	Sí	No	Sí	7	
	9427 β(1,4)-GlcNAcT PF04101	123	No	No	Sí	0	
	14444 β(1,4)-GlcNAcT PF00249	181	No	No	No	2	
	14002 β(1,4)-ManT PF00534	398	Sí	Sí	Sí	2	
	48588 α(1,3)-ManT PF00534	518	Sí	No	Sí	1	
	44447 α(1,3)-ManT PF05208	440	Sí	Sí	Sí	9	

44425	$\alpha(1,2)$ -ManT PF03901	581	Sí	No	Sí	6
44574	$\alpha(1,2)$ -ManT PF03901	557	Sí	No	No	10
44905	$\alpha(1,3)$ -GlcT PF03155	437	No	Sí	No	7
44117	$\alpha(1,3)$ -GlcT PF03155	533	No	Sí	Sí	10
19705	P-Dol ManT PF00535	237	Sí	No	Sí	0
34317	P-Dol GlcT PF00535	321	No	No	No	0

Transferencia del precursor

55197	STT3 PF02516	911	Sí	Sí	No	9
55198	STT3 PF02516	894	Sí	Sí	Sí	10

Control de calidad en el ER

50836	α -GlcII Subunidad- α PF01055	712	Sí	Sí	No	0
54169	α -GlcII Subunidad- β PF07915	802	Sí	No	Sí	0
50260	calreticulina PF00262	410	Sí	Sí	Sí	0
38004	UGGT PF06427	1653	Sí	Sí	No	0

Maduración de Golgi

52346	α -Man I PF01532	509	No	No	No	0
-------	----------------------------	-----	----	----	----	---

¹Número de secuencia en el genoma de *Phaeodactylum tricornutum*

10 ²Función biológica putativa de la proteína codificada por el gen

³ESTs de la cepa P.t.1.8.6 de *Phaeodactylum tricornutum* cultivada en condiciones estándar

⁴ESTs de la cepa P.t.3 de *Phaeodactylum tricornutum* cultivada en condiciones estándar

⁵Dominios de transmembrana

Biosíntesis y transferencia de los oligosacáridos unidos a pirofosfato de dolicol

15 Todos los enzimas implicados en la biosíntesis de los oligosacáridos unidos a pirofosfato de dolicol en la cara citosólica y en el lumen del ER se identificaron en el genoma de *Phaeodactylum tricornutum*. Estas secuencias y topologías de las proteínas predichas comparten fuertes homologías con los homólogos de glicosilación (alg) unidos a asparagina correspondientes descritos en otros eucariotas. También se predicen transferasas putativas capaces de catalizar la formación de manosa y glucosa activada con dolicol. Estos dos azúcares activados son necesarios para las etapas de alargamiento que surgen en el lumen del ER. Además de las secuencias implicadas en la biosíntesis del oligosacárido unido a pirofosfato de dolicol, se identificaron dos genes putativos homólogos a la subunidad catalítica STT3 del complejo de multisubunidades de oligosacariltransferasa (OST) en el genoma de *P. tricornutum* (Tabla 2). Estas secuencias de múltiples extensiones, que tienen respectivamente 34% y 37% de

20

identidad con las subunidades STT3 de *Arabidopsis thaliana* y *Homo sapiens*, contienen el dominio WWDYG necesario para la transferencia del precursor a los restos asn.

Control de calidad de la proteína en el ER

5 Solo se encontraron secuencias putativas que codifican las subunidades α y β de la α -glucosidasa II en el genoma de *P. tricornutum*. Las subunidades α y β albergan la secuencia DMNE característica y un dominio de lectina del tipo C implicado en la unión a manosa. Una UDP-glucosa putativa: también se predicen glucosiltransferasa de glicoproteína (UGGT) y una calreticulina, dos moléculas que aseguran el control de calidad de las proteínas en el ER. La calreticulina es una proteína soluble que es una de las principales proteínas de unión a Ca^{2+} del lumen del ER que está implicada en la retención de proteínas plegadas de forma incorrecta o incompleta. La calreticulina de *P.*
10 *tricornutum* es similar en tamaño a las calreticulinas conocidas (aproximadamente 400 aminoácidos) y muestran más del 50% de identidad con las respectivas proteínas de *Nicotiana glauca* (56%), *Chlamydomonas reinhardtii* (56%), *Ricinus communis* (54%) y *Arabidopsis thaliana* (53%). Estructuralmente, la calreticulina de *P. tricornutum* contiene los tres dominios específicos necesarios para su función biológica: un dominio N-terminal de aproximadamente 180 aminoácidos, un dominio central de aproximadamente 70 restos que contiene tres repeticiones de unos motivos ácidos de 17 aminoácidos responsables de la unión a Ca^{2+} con una baja capacidad y una alta afinidad y un dominio C-terminal rico en restos ácidos y de lisina que se pueden unir a Ca^{2+} con una alta capacidad pero una baja afinidad. La calreticulina de *P. tricornutum* también alberga un péptido señal predicho y un tetrapéptido YDEF C-terminal que podría asegurar su retención en el ER.

Maduración de los glicanos unidos a N en el aparato de Golgi

20 Una secuencia que codifica una $\alpha(1,2)$ -manosidasa I putativa en Golgi se identificó en el genoma (Tabla 2). Esta glicosidasa es capaz de convertir $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ en $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$.

Composición del azúcar y análisis por transferencia de Western de las proteínas de *P. tricornutum*

25 La composición del azúcar de las proteínas de *P. tricornutum* aisladas de la cepa Pt 1.8.6 fusiforme se determinó para investigar la presencia de monosacáridos específicos para N-glicanos. Las proteínas se hidrolizaron y los monosacáridos resultantes se convirtieron en derivados 1-O-metil persililo y se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de impacto electrónico (GC-EI MS). Como se presenta en la Tabla 3, la manosa y la N-acetilglucosamina, dos monómeros constitutivos de los glicanos unidos a N, se identificaron en el extracto de proteínas de *P. tricornutum*. Se identificaron otros monosacáridos, tales como ramnosa, xilosa, fucosa, glucosa y galactosa. Sin embargo, no se puede concluir si estos monómeros surgen de glicanos unidos a proteínas o de polisacáridos contaminantes. Por el contrario, no se detectaron ácido N-acetilnramínico ni su precursor N-acetilmanosamina. Para asegurar la ausencia de una vía de sialilación en las proteínas de *P. tricornutum*, las proteínas de *P. tricornutum* se sometieron a una hidrólisis ácida suave. El hidrolizado se acopló a 1,2-diamino-4,5-metilen dioxibenceno (DMB) y los derivados resultantes se analizaron por cromatografía de líquidos como se describió anteriormente. Los picos detectados por fluorescencia se recogieron y se analizaron mediante espectrometría de masas del tiempo de ionización de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS). No se identificaron ácidos siálicos que confirmen la ausencia en estas diatomeas de una vía de sialilación detectable (no se muestra).

Tabla 3

Composición de azúcares de las proteínas de *P. tricornutum*

Monosacárido	% en moles ¹
Arabinosa	0,2+/-0,2
Ramnosa	29,3+/-1,6
Fucosa	5,3+/-1,0
Xilosa	18,6+/-2,0
Manosa	16,7+/-8,4
Galactosa	20,6+/-2,5
GalNAc	5,1+/-2,9
GlcNAc	6,2+/-3,1
ManNAc	n.d. ²

Neu5Ac

n.d.²¹Proporción relativa entre monómeros²No detectado

5 El análisis estructural de los glicanos unidos a N de las proteínas de *P. tricornutum* se investigaron después mediante el análisis de transferencia de Western en un extracto de proteínas totales utilizando sondas específicas para epítomos de glicano. Como se ilustra en la Fig. 2a, las proteínas de *P. tricornutum* se afinodetectan por concanavalina A, una lectina específica para secuencias de alta manosa. Esta afinodetección se suprime tras el tratamiento con Endo H o PNGasa, dos enzimas capaces de escindir los N-glicanos, lo que confirma que esta lectina reconoció las secuencias de glicanos unidos a N de las proteínas de *P. tricornutum* (Fig. 2b). Por el contrario, la afinodetección con ECA y PHA, dos lectinas específicas para epítomos de glicanos unidos a N complejos, fue negativa (no se muestra). Después se llevaron a cabo las inmunodetecciones utilizando anticuerpos producidos frente a los glicoeptomos de plantas. Los anticuerpos específicos para los epítomos del núcleo- $\alpha(1,3)$ -fucosa o núcleo- $\beta(1,2)$ -xilosa unidos al núcleo común de $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ no se detectaron en ninguna proteína de *P. tricornutum* (Fig. 2a).

15 Los N-glicanos de tipo complejo resultan de la adición de una GlcNAc terminal en $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ por adición de GnT I y después maduración de este oligosacárido. Para investigar la presencia en las proteínas de *P. tricornutum* de glicanos complejos, tratamos un extracto de proteína con una galactosiltransferasa, una enzima capaz de transferir un resto de galactosa a unidades de GlcNAc terminales, y después analizamos la preparación de proteína resultante con ECA, una lectina que se une a secuencias de $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$. No se detectó ninguna señal después de este tratamiento, lo que indica que las proteínas de *P. tricornutum* no presentan GlcNAc terminal de una manera detectable.

Identificación estructural de glicanos unidos a N de *P. tricornutum*

25 Los N-glicanos se liberaron de las proteínas de *P. tricornutum* aisladas de la cepa Pt 1.8.6 mediante tratamiento con PNGasa A como se describió anteriormente para proteínas aisladas de plantas. PNGasa A se prefirió a PNasa F ya que esta enzima de desglucosilación es capaz de liberar una gran variedad de oligosacáridos unidos a N, incluyendo glicanos que albergan fucosa con enlaces $\alpha(1,3)$ al resto de glucosamina proximal. Los N-glicanos resultantes se acoplaron después a la 2-aminobenzamida (2-AB) para facilitar su detección y el análisis por espectrometría de masas. El MALDI-TOF MS del conjunto resultante de N-glicanos marcados se muestra en la Figura 3. Los iones principales corresponden a iones $(\text{M}+\text{Na})^+$ de los derivados 2-AB de $\text{Hexosa}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$. El conjunto de glicanos se sometieron después a una digestión con exoglicosidasa. Consistente con la presencia de restos de manosa α -unidas, la mezcla de oligosacáridos se convirtió en $\text{Hexosa}_2\text{GlcNAc}_2$ en $\text{Hexosa}_4\text{GlcNAc}_2$ después del tratamiento con α -manosidasa del frijol Jack (no mostrado). Como consecuencia, los iones detectados en MALDI-TOF MS se asignaron a N-glicanos de alta manosa que varían de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ descritos anteriormente en otros eucariotas.

35 En conjunto, el análisis bioquímico de los glicanos unidos a N de *P. tricornutum* demostró que las proteínas de este organismo albergan N-glicanos del tipo de alta manosa que varían de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. Estos análisis no revelaron la presencia de epítomos de N-glicanos de plantas, es decir epítomos de núcleo- $\alpha(1,3)$ -fucosa o núcleo- $\beta(1,2)$ -xilosa unidos al núcleo común de $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Se sabe que estos epítomos son altamente inmunogénicos en humanos y necesitan el desarrollo de la estrategia de desactivación de los genes correspondientes antes de cualquier uso de proteínas derivadas de plantas en terapia humana.

Análisis de N-glicosilación de proteínas de microalgas representativas del filo principal

45 La N-glicosilación de proteínas aisladas de las microalgas representativas del filo principal se analizó mediante la transferencia de Western utilizando sondas específicas de glicanos (Figura 4). Las proteínas de *Tetraselmis*, *Rhodella*, *Euglena* y *Pavlova* (Figura 4A), de *Skeuletonema*, *Heterocapsa*, *Amphora*, *Chaetoceros*, *Naviculas*, *Nanochloropsis* (Figura 4B, C, D) y de *Chlorella*, *Nanochloropsis salina*, *Chlorella sorokiniana*, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans*, *Nitzschia punctata*, *Thalassiosira pseudonana*, *Heterocapsa triquetra*, *Porphyridium cruentum* (datos no mostrados) se afinodetectaron por la concanavalina A pero no por otras sondas tales como anticuerpos producidos frente a epítomos de $\alpha(1,3)$ -fucosa y $\beta(1,2)$ -xilosa, específicos para N-glicanos complejos de plantas. La afinodetección desapareció después del tratamiento con Endo H lo que confirma que las señales positivas de concanavalina A surgieron de los glicanos unidos a N. Como consecuencia, como se observó en *P. tricornutum*, concluimos que las microalgas representativas ensayadas:

- Algas verdes: *Tetraselmis* (Prasinofitas), *Nanochloropsis* (por ejemplo, *Nanochloropsis salina*) y *Chlorella* (Clorofitas; por ejemplo, *Chlorella sorokiniana*),
- algas rojas: *Rhodella* y *Porphyridium cruentum* (Rodofitina),

- cromalveolados: *Pavlova* (Crisofitas), *Skeuletonema*, *Amphora*, *Chaetoceros* (por ejemplo, *Chaetoceros calcitrans*), *Nitzschia punctata*, *Thalassiosira pseudonana*, *Naviculas* (Diatomeas), *Isochrysis galbana* (Haptofitas), *Heterocapsa triquetra* (Dinoflagelados);

- Euglenidos: *Euglena*,

5 en este estudio abarcan los N-glicanos de alta manosa en sus proteínas y no abarcan los epítomos de $\alpha(1,3)$ -fucosa y $\beta(1,2)$ -xilosa.

Expresión de la EPO murina recombinante en *P. tricornutum*

10 La cepa CCAP 1052/1A de *P. tricornutum* se transformó por bombardeo de partículas con los plásmidos pZEPO o pZEPOHis (Figura 5). Entre los transformantes resistentes a zeocina, se probaron 80 clones (para cada constructo) para determinar la presencia del gen de interés, EPO. La presencia del gen EPO se verificó mediante PCR con los siguientes cebadores: un par de cebadores específicos del transgén y un par de cebadores FpZ y RpZ que se hibridan antes y después del transgén dentro del vector pPHA-TL.

Fepo	ATgggggTgCCCgAACgTC	SEQ ID N°12
Repo	TCACCTgTCCCCTCTCCTg	SEQ ID N°13
FpZ	TCAgTTCTgCACAAATTTgTCTgCCg	SEQ ID N°14
RpZ	CACgTCCCTggTTgAgTTCgATAgCA	SEQ ID N°15

15 Los clones de *P. tricornutum* transformados por pZEPO se denominaron E1 a E80 y los resultantes de las transformaciones por pZEPOHis se denominaron H1 a H80.

En la Figura 6, las amplificaciones se llevaron a cabo con los cebadores FpZ y RpZ que se hibridan respectivamente en el extremo 5' del promotor fcpA y 3' de la terminación del fcpA, permitiendo la amplificación del transgén insertado en el MCS de pPHA-TI. Las muestras E3 y H6 presentan una amplificación de aproximadamente 600 pares de bases que corresponde al tamaño del transgén de la EPO.

20 La Figura 6B muestra los productos de PCR realizados con cebadores específicos de EPO. El control positivo de la PCR (realizado sobre el vector pZEPO) presenta una banda de amplificación a aproximadamente 600 pares de bases. Las muestras E3, E5, H6, H7 presentan una amplificación de aproximadamente 600 pares de bases que corresponde al tamaño de la EPO.

25 Entre todos los clones de *P. tricornutum* resistentes a zeocina, aproximadamente el 90% integró el transgén de EPO en su genoma.

También se analizó la expresión del transgén a nivel de RNA. La Figura 6C muestra que las muestras E1, E2, H1 y H2 presentan una amplificación de aproximadamente 385 pares de bases que corresponden a los transcritos de EPO.

30 Entre todos los clones de *P. tricornutum* resistentes a zeocina, aproximadamente el 76% expresó transcritos de EPO.

Después se analizó la presencia de la proteína EPO.

La presencia de EPO murina recombinante se ensayó en extractos crudos mediante ensayos ELISA. La EPO murina recombinante se detectó en un 60% de los clones ensayados.

35 Para aumentar la cantidad de proteína EPO en las células, se llevó a cabo una inducción del promotor fcpA. Las microalgas se incubaron 36 horas en la oscuridad y después se colocaron en la luz (TO). Las muestras se recogieron a T3, T6, T9, T12 y T15 horas y se cargaron en SDS-PAGE. El análisis por inmunodetección con un anticuerpo anti-EPO mostró que la proteína recombinante de EPO se produce en las células de las microalgas (Figura 7).

40 Como el peso molecular de la proteína EPO no glicosilada es de aproximadamente 18 kDa, la EPO recombinante detectada por transferencia de Western muestra una migración electroforética (aproximadamente 25 kDa) consistente con la presencia de estructuras de glicano (Figura 7). La EPO recombinante producida en células CHO (columna EPO en la Figura 7) muestra una migración electroforética de aproximadamente 30,1 kDa debido a la presencia de glicanos complejos.

Como demostramos que las células de *Phaeodactylum* introdujeron Man₅ a Man₉ en sus proteínas, postulamos que dichas estructuras de glicanos están unidas a la EPO recombinante y son responsables de la disminución de la movilidad electroforética observada en SDS-PAGE.

5 Para verificar esta hipótesis, digerimos la EPO recombinante mediante la PNGasa F que escinde específicamente los N-glicanos que carecen del núcleo de fucosa con enlaces alfa-(1,3). Cargamos las muestras en SDS-PAGE y las EPO murinas recombinantes producidas en CHO, antes y después de la digestión por PNGasa. Después de la inmunodetección con anticuerpos anti-EPO, podemos comparar los perfiles electroforéticos. Todas las muestras digeridas tienen alrededor de 18-19 kDa, lo que concuerda con la digestión efectiva de la N-glicosilaciones que dan una proteína no glicosilada de aproximadamente 18 kDa. Este experimento muestra que algo de N-glicosilación está presente en la EPO murina recombinante producida por *Phaeodactylum tricornutum* y confirma que dicha EPO no contiene el núcleo de fucosa con enlaces alfa-(1,3).

Para caracterizar aún más las estructuras de N-glicano, estamos analizando los perfiles de N-glicosilación de esta EPO murina recombinante producida por *Phaeodactylum tricornutum* por espectrometría de masas. Se están realizando ensayos de actividad sobre la EPO recombinante.

15 Bioensayos de EPO

Los ensayos preliminares del experimento en curso revelaron la producción de hemoglobina cuando las células TF-1 se incubaron con EPO murina de *Phaeodactylum tricornutum* que lleva el plásmido pZEPO en comparación con las células incubadas con extracto de *P. tricornutum* que lleva el plásmido pPHA-T1. La viabilidad celular se mantuvo similar a lo largo del experimento.

20 Estos resultados revelaron que la EPO murina recombinante producida por *Phaeodactylum tricornutum* retuvo su actividad biológica medida como la capacidad para inducir la diferenciación de células TF-1.

Inmunogenicidad de EPO

25 La actividad y la inmunogenicidad de la EPO producida por *P. tricornutum* se ensayó in vivo en ratones: después de la inyección de la EPO recombinante, la cantidad de eritrocitos se analizó para determinar la actividad de EPO. Además, la respuesta inmune se analizó para determinar que dicha EPO recombinante no presenta ninguna incompatibilidad con un uso terapéutico.

Transformación de las vías de N-glicosilación de *P. tricornutum*:

Dos cepas de *P. tricornutum* se transformaron con varios genes humanos: algas de tipo nativo y recombinantes que expresan EPO de ratón.

30 Estas microalgas se transformaron en dos tiempos.

35 Primero, las células de *Phaeodactylum tricornutum* se co-transformaron mediante dos vectores: PG1GNTI que confiere resistencia al cloranfenicol (y con el gen GNTI humano) y con el vector pG3ManII (con el gen manosidasa II humano). Después de la selección de los transformantes con cloranfenicol, se analizaron las vías de glicosilación de las algas: EPO recombinante se purificó y la N-glicosilación se analizó mediante espectrometría de masas. Las algas que presentan una actividad de GNTI y ManII se aislaron y co-transformaron otra vez, pero con: pG2GNTII que confiere resistencia a la Nourseotricina (con el gen GNTII humano) y con el vector pG3Fuctransf (con Alfa 1,6 fucosil transferasa humana). Se seleccionaron las microalgas transformadas con nourseotricina, y se analizó la N-glicosilación de EPO recombinante por espectrometría de masas.

40 Actualmente estamos terminando estos experimentos antes de introducir otros genes para ir más allá en la "humanización" de los N-glicanos de *P. tricornutum*.

Expresión de PTX3 humana recombinante en *P. tricornutum*:

La cepa CCAP 1052/1 A de *P. tricornutum* se transformó por bombardeo de partículas con el plásmido pZPTX3. Entre los transformantes resistentes a zeocina, se ensayaron 50 clones para la presencia del gen de interés, PTX3.

45 La presencia del gen PTX3 se verificó mediante PCR con los siguientes cebadores: un par de cebadores específicos del transgén, y un par de cebadores FpZ y RpZ que se hibridan antes y después del transgén dentro del vector pPHA-TI.

FpZ	TCAgTTCTgCACAAATTTgTCTgCCg	SEQ ID N°14
RpZ	CACgTCCCTggTTgAgTTCgATAgCA	SEQ ID N°15
FPTX3	ATGCATCTCCTTGCGATTCT	SEQ ID N°16
RPTX3	TGA AAC ATA CTG AGC TCC TC	SEQ ID N°17

Entre todos los clones resistentes a zeocina de *P. tricornutum*, aproximadamente el 90% integró el transgén PTX3 en su genoma.

5 El análisis de la presencia de transcritos y proteína de PTX3 en clones resistentes a zeocina de *P. tricornutum* está actualmente bajo investigación.

Transformación de la Prasinofita *Tetraselmis suecica*:

10 El *Tetraselmis suecica* ccmp904 se transformó por bombardeo de partículas con el constructo p35SshbleNos. Obtuvimos clones resistentes a zeocina, lo que indica que la proteína Sh Ble se expresa en las microalgas. A pesar de que Sh Ble no es una proteína glicosilada, este experimento muestra la viabilidad de producir proteínas recombinantes en *Tetraselmis suecica*. Como *Tetraselmis suecica* es capaz de proteínas endógenas N-glicosiladas (véase página 45), podemos asumir que un polipéptido que presenta sitios de N-glicosilación, cuando se expresa en estas microalgas, presentará estructuras de N-glicanos.

Transformación de la Clorofita *Chlorella sorokiniana*:

15 La *Chlorella sorokiniana* UTEX 1330 se transformó por bombardeo de partículas con los constructos p35SshbleTnos y pUbilbarTnos. Se obtuvieron clones resistentes a zeocina, lo que indica que la proteína Sh ble se expresa en las microalgas, y clones resistentes a glufosinato lo que indica que el gen bar se expresa en las microalgas. Esto resalta el hecho de que tenemos herramientas para transformar la clorofita *Chlorella sorokiniana*, especialmente los vectores con promotores funcionales.

20 A pesar de que Sh ble no es una proteína glicosilada, este experimento muestra la factibilidad de producir proteínas recombinantes en *Chlorella sorokiniana*. Como esta alga es capaz de proteínas N-glicosiladas endógenas (datos no mostrados), podemos suponer que un polipéptido que presenta sitios de N-glicosilación, cuando se expresa en estas microalgas, presentará estructura de N-glicanos.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> IFREMER
 Université de Rouen
 CNRS
 5 Jean-Paul, Cadoret
 Aude Carlier
 Patrice Lerouge
 Muriel bardor
 Carole Burel
 10 Florian Maury
- <120> Producción de polipéptidos glicosilados en microalgas
 <130> BCT090027
- 15 <150> EP 08300090.1
 <151> 12-02-2007
- <160> 67
- 20 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
 <211> 579
 <212> DNA
 25 <213> Mus musculus
- <400> 1
 atgggggtgc ccgaacgtcc caccctgctg cttttactct ccttgetact gattcctctg 60
 ggccctccag tctctgtgct tcccccaagc ctcatctgag acagtcgagt tctggagagg 120
 tacatcttag aggccaagga ggcagaaaat gtcacgatgg gttgtgcaga aggtcccaga 180
 ctgagtgaaa atattacagt ccagatacc aaagtcaact tctatgcttg gaaaagaatg 240
 gaggtggaag aacaggccat agaagtttgg caaggcctgt ccttgetctc agaagccatc 300
 ctgcaggccc aggccctgct agccaattcc tcccagccac cagagaccct tcagcttcat 360
 atagacaaag ccatcagtgg tctacgtagc ctcaattcac tgcttcgggt actgggagct 420
 cagaaggaat tgatgtgcc tccagatacc accccacctg ctccactccg aacctcaca 480
 gtggatactt tctgcaagct cttccgggtc tacgccaact tctccggggg gaaactgaag 540
 ctgtacacgg gagaggtctg caggagaggg gacaggtga 579
- 30 <210> 2
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial
- 35 <220>
 <223> cebador FE1epo
- <400> 2
 40 catgaattca tgggggtgcc cgaacgtc 28
- <210> 3
 <211> 28
 <212> DNA
 45 <213> secuencia artificial

ES 2 734 276 T3

<220>
 <223> cebador RH3epo

5 <400> 3
 cataagcttt cacctgtccc ctctcctg 28

10 <210> 4
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> cebador RH3His6epo

20 <400> 4
 cataagcttt cagtggtggg ggtggtggg cctgtcccct ctctgcaga 50

<210> 5
 <211> 980
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 atgcatctcc ttgcgattct gttttgtgct ctctgggtctg cagtgttggc cgagaactcg 60
 gatgattatg atctcatgta tgtgaatttg gacaacgaaa tagacaatgg actccatccc 120
 actgaggacc ccacgccgtg cgcctgcggt caggagcact cggaatggga caagctcttc 180
 atcatgctgg agaactcgca gatgagagag cgcattgctgc tgcaagccac ggacgacgtc 240
 ctgcgggggc agctgcagag gctgcgggag gagctgggccc ggctcgcgga aagcctggcg 300
 agggcgtgcg cgccgggggc tcccgcagag gccaggctga ccagtgtctt ggacgagctg 360
 ctgcaggcga cccgcgacgc gggccgcagg ctggcgcgta tggagggcgc ggagggcgag 420
 cgcccagagg aggcggggcg cgccctggcc gcggtgctag aggagctgcg gcagacgcga 480
 gccgacctgc acgcgggtgca gggctgggct gcccgagct ggctgccggc aggttgtgaa 540
 acagctatct tattcccatt gcgttccaag aagatctttg gaagcgtgca tccagtgaga 600
 ccaatgagggc ttgagtcttt tagtgctgct atttgggtca aagccacaga tgtattaaac 660
 aaaaccatcc tgttttccta tggcacaag aggaatccat atgaaatcca gctgtatctc 720
 agctaccaat ccatagtgtt tgtggtgggt ggagaggaga acaaactggt tgctgaagcc 780
 atggtttccc tgggaaggtg gaccacactg tgcggcacct ggaattcaga ggaagggctc 840
 25 acatccttgt gggtaaattg tgaactggcg gctaccactg ttgagatggc cacaggtcac 900
 attgttctg agggaggaat cctgcagatt ggccaagaaa agaattggctg ctgtgtgggt 960
 ggtggctttg atgaaacatt 980

30 <210> 6
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador FE5PTX3

<400> 6
 catgatatca tgcatctcct tgcgattct 29

<210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 5 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador RH3PTX3

 10 <400> 7
 cctaagcttt tatgaaacat actgagctcc 30

 <210> 8
 <211> 24
 15 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador FRTepo
 20
 <400> 8
 tcttagaggc caaggaggca gaaa 24

 <210> 9
 <211> 24
 25 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador Rrtepo
 30
 <400> 9
 acccggaaga gctgcagaa agta 24

 <210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial
 35

 <220>
 <223> cebador FrtPTX3
 40
 <400> 10
 ctagaggagc tgcggcaga 19
 45
 <210> 11
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> cebador RrtPTX3

 <400> 11
 55 caccaccac aaactatg gat 23

 <210> 12
 <211> 19
 <212> DNA
 60 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador Fepo
 65 <400> 12

atgggggtgc ccgaacgtc 19
 <210> 13
 <211> 19
 5 <212> DNA
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador Repo
 10
 <400> 13
 tcacctgtcc cctctcctg 19
 <210> 14
 15 <211> 26
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial
 <220>
 20 <223> cebador FpZ
 <400> 14
 tcagttctgc acaaattgt ctgccg 26
 25 <210> 15
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cebador RpZ
 <400> 15
 35 cacgtccctg gttgagttcg atagca 26
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial
 40 <220>
 <223> cebador FPTX3
 <400> 16
 45 atgcatctcc ttgcgattct 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 50 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador RPTX3
 55 <400> 17
 tgaaacatac tgagctcctc 20
 <210> 18
 <211> 447
 60 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 18

ES 2 734 276 T3

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

Phe Val Gly Trp Asn Ala Leu Leu Leu Phe Phe Trp Thr Arg Pro
20 25 30

Ala Pro Gly Arg Leu Pro Ser Asp Ser Ala Leu Gly Asp Asp Pro Ala
35 40 45

Ser Leu Thr Arg Glu Val Ile His Leu Ala Glu Asp Ala Glu Ala Glu
50 55 60

Leu Glu Arg Gln Arg Gly Leu Leu Gln Gln Ile Lys Glu His Tyr Ala
65 70 75 80

Leu Trp Arg Gln Arg Trp Arg Val Pro Thr Val Ala Pro Pro Ala Trp
85 90 95

Pro Arg Val Pro Val Thr Pro Ser Pro Val Gln Ile Pro Ile Leu Val
100 105 110

ES 2 734 276 T3

Ile Ala Cys Asp Arg Ser Thr Val Arg Arg Cys Leu Asp Lys Leu Leu
 115 120 125

His Tyr Arg Pro Ser Ala Glu Arg Phe Pro Ile Ile Val Ser Gln Asp
 130 135 140

Cys Gly His Glu Glu Thr Ala Gln Val Ile Ala Ser Tyr Gly Thr Ala
 145 150 155 160

Val Thr His Ile Arg Gln Pro Asp Leu Ser Asn Ile Ala Val Gln Pro
 165 170 175

Asp His Arg Lys Phe Gln Gly Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His Tyr Arg
 180 185 190

Trp Ala Leu Gly Gln Ile Phe Asn Lys Phe Lys Phe Pro Ala Ala Val
 195 200 205

Val Val Glu Asp Asp Leu Glu Val Ala Pro Asp Phe Phe Glu Tyr Phe
 210 215 220

Gln Ala Thr Tyr Pro Leu Leu Arg Thr Asp Pro Ser Leu Trp Cys Val
 225 230 235 240

Ser Ala Trp Asn Asp Asn Gly Lys Glu Gln Met Val Asp Ser Ser Lys
 245 250 255

Pro Glu Leu Leu Tyr Arg Thr Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Leu
 260 265 270

Leu Leu Ala Asp Leu Trp Ala Glu Leu Glu Pro Lys Trp Pro Lys Ala
 275 280 285

Phe Trp Asp Asp Trp Met Arg Arg Pro Glu Gln Arg Lys Gly Arg Ala
 290 295 300

Cys Ile Arg Pro Glu Ile Ser Arg Thr Met Thr Phe Gly Arg Lys Gly
 305 310 315 320

Val Ser His Gly Gln Phe Phe Asp Gln His Leu Lys Phe Ile Lys Leu
 325 330 335

Asn Gln Gln Phe Val Pro Phe Thr Gln Leu Asp Leu Ser Tyr Leu Gln
 340 345 350

ES 2 734 276 T3

Gln Glu Ala Tyr Asp Arg Asp Phe Leu Ala Gln Val Tyr Gly Ala Pro
 355 360 365

Gln Leu Gln Val Glu Lys Val Arg Thr Asn Asp Gln Lys Glu Leu Gly
 370 375 380

Glu Val Arg Val Gln Tyr Thr Ser Arg Asp Ser Phe Lys Ala Phe Ala
 385 390 395 400

Lys Ala Leu Gly Val Met Asp Asp Leu Lys Ser Gly Val Pro Arg Ala
 405 410 415

Gly Tyr Arg Gly Ile Val Thr Phe Gln Phe Arg Gly Arg Arg Val His
 420 425 430

Leu Ala Pro Pro Gln Thr Trp Thr Gly Tyr Asp Pro Ser Trp Asn
 435 440 445

<210> 19

<211> 445

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 19

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

Phe Val Ala Trp Asn Ala Leu Leu Leu Leu Phe Phe Trp Thr Arg Pro
 20 25 30

Ala Pro Gly Arg Pro Pro Ser Val Ser Ala Leu Asp Gly Asp Pro Ala
 35 40 45

Ser Leu Thr Arg Glu Val Ile Arg Leu Ala Gln Asp Ala Glu Val Glu
 50 55 60

Leu Glu Arg Gln Arg Gly Leu Leu Gln Gln Ile Gly Asp Ala Leu Ser
 65 70 75 80

Ser Gln Arg Gly Arg Val Pro Thr Ala Ala Pro Pro Ala Gln Pro Arg
 85 90 95

Val Pro Val Thr Pro Ala Pro Ala Val Ile Pro Ile Leu Val Ile Ala
 100 105 110

Cys Asp Arg Ser Thr Val Arg Arg Cys Leu Asp Lys Leu Leu His Tyr
 115 120 125

10

ES 2 734 276 T3

Arg Pro Ser Ala Glu Leu Phe Pro Ile Ile Val Ser Gln Asp Cys Gly
 130 135 140

His Glu Glu Thr Ala Gln Ala Ile Ala Ser Tyr Gly Ser Ala Val Thr
 145 150 155 160

His Ile Arg Gln Pro Asp Leu Ser Ser Ile Ala Val Pro Pro Asp His
 165 170 175

Arg Lys Phe Gln Gly Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His Tyr Arg Trp Ala
 180 185 190

Leu Gly Gln Val Phe Arg Gln Phe Arg Phe Pro Ala Ala Val Val Val
 195 200 205

Glu Asp Asp Leu Glu Val Ala Pro Asp Phe Phe Glu Tyr Phe Arg Ala
 210 215 220

Thr Tyr Pro Leu Leu Lys Ala Asp Pro Ser Leu Trp Cys Val Ser Ala
 225 230 235 240

Trp Asn Asp Asn Gly Lys Glu Gln Met Val Asp Ala Ser Arg Pro Glu
 245 250 255

Leu Leu Tyr Arg Thr Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Leu Leu Leu
 260 265 270

Ala Glu Leu Trp Ala Glu Leu Glu Pro Lys Trp Pro Lys Ala Phe Trp
 275 280 285

Asp Asp Trp Met Arg Arg Pro Glu Gln Arg Gln Gly Arg Ala Cys Ile
 290 295 300

Arg Pro Glu Ile Ser Arg Thr Met Thr Phe Gly Arg Lys Gly Val Ser
 305 310 315 320

His Gly Gln Phe Phe Asp Gln His Leu Lys Phe Ile Lys Leu Asn Gln
 325 330 335

Gln Phe Val His Phe Thr Gln Leu Asp Leu Ser Tyr Leu Gln Arg Glu
 340 345 350

Ala Tyr Asp Arg Asp Phe Leu Ala Arg Val Tyr Gly Ala Pro Gln Leu
 355 360 365

ES 2 734 276 T3

Gln Val Glu Lys Val Arg Thr Asn Asp Arg Lys Glu Leu Gly Glu Val
 370 375 380

Arg Val Gln Tyr Thr Gly Arg Asp Ser Phe Lys Ala Phe Ala Lys Ala
 385 390 395 400

Leu Gly Val Met Asp Asp Leu Lys Ser Gly Val Pro Arg Ala Gly Tyr
 405 410 415

Arg Gly Ile Val Thr Phe Gln Phe Arg Gly Arg Arg Val His Leu Ala
 420 425 430

Pro Pro Leu Thr Trp Glu Gly Tyr Asp Pro Ser Trp Asn
 435 440 445

<210> 20

<211> 442

5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Met Arg Phe Arg Ile Tyr Lys Arg Lys Val Leu Ile Leu Thr Leu Val
 1 5 10 15

Val Ala Ala Cys Gly Phe Val Leu Trp Ser Ser Asn Gly Arg Gln Arg
 20 25 30

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

Gly Ala Gly His Leu Ala Val Ser Val Gly Ile Arg Arg Val Ser Asn
 50 55 60

Glu Ser Ala Ala Pro Leu Val Pro Ala Val Pro Arg Pro Glu Val Asp
 65 70 75 80

Asn Leu Thr Leu Arg Tyr Arg Ser Leu Val Tyr Gln Leu Asn Phe Asp
 85 90 95

Gln Met Leu Arg Asn Val Gly Asn Asp Gly Thr Trp Ser Pro Gly Glu
 100 105 110

Leu Val Leu Val Val Gln Val His Asn Arg Pro Glu Tyr Leu Arg Leu
 115 120 125

Leu Ile Asp Ser Leu Arg Lys Ala Gln Gly Ile Gln Glu Val Leu Val

10

ES 2 734 276 T3

Thr Gln Ser Ala Gln Ile Glu Ser Leu Leu Asn Ser Asn Lys Gln Tyr
 385 390 395 400

Leu Phe Pro Glu Thr Leu Val Ile Gly Glu Lys Phe Pro Met Ala Ala
 405 410 415

Ile Ser Pro Pro Arg Lys Asn Gly Gly Trp Gly Asp Ile Arg Asp His
 420 425 430

Glu Leu Cys Lys Ser Tyr Arg Arg Leu Gln
 435 440

<210> 21

<211> 447

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Met Arg Phe Arg Ile Tyr Lys Arg Lys Val Leu Ile Leu Thr Leu Val
 1 5 10 15

Val Ala Ala Cys Gly Phe Val Leu Trp Ser Ser Asn Gly Arg Gln Arg
 20 25 30

Lys Asn Glu Ala Leu Ala Pro Pro Leu Leu Asp Ala Glu Pro Ala Arg
 35 40 45

Gly Ala Gly Gly Arg Gly Gly Asp His Pro Ser Val Ala Val Gly Ile
 50 55 60

Arg Arg Val Ser Asn Val Ser Ala Ala Ser Leu Val Pro Ala Val Pro
 65 70 75 80

Gln Pro Glu Ala Asp Asn Leu Thr Leu Arg Tyr Arg Ser Leu Val Tyr
 85 90 95

Gln Leu Asn Phe Asp Gln Thr Leu Arg Asn Val Asp Lys Ala Gly Thr
 100 105 110

Trp Ala Pro Arg Glu Leu Val Leu Val Val Gln Val His Asn Arg Pro
 115 120 125

Glu Tyr Leu Arg Leu Leu Leu Asp Ser Leu Arg Lys Ala Gln Gly Ile
 130 135 140

10

ES 2 734 276 T3

Asp Asn Val Leu Val Ile Phe Ser His Asp Phe Trp Ser Thr Glu Ile
 145 150 155 160

Asn Gln Leu Ile Ala Gly Val Asn Phe Cys Pro Val Leu Gln Val Phe
 165 170 175

Phe Pro Phe Ser Ile Gln Leu Tyr Pro Asn Glu Phe Pro Gly Ser Asp
 180 185 190

Pro Arg Asp Cys Pro Arg Asp Leu Pro Lys Asn Ala Ala Leu Lys Leu
 195 200 205

Gly Cys Ile Asn Ala Glu Tyr Pro Asp Ser Phe Gly His Tyr Arg Glu
 210 215 220

Ala Lys Phe Ser Gln Thr Lys His His Trp Trp Trp Lys Leu His Phe
 225 230 235 240

Val Trp Glu Arg Val Lys Ile Leu Arg Asp Tyr Ala Gly Leu Ile Leu
 245 250 255

Phe Leu Glu Glu Asp His Tyr Leu Ala Pro Asp Phe Tyr His Val Phe
 260 265 270

Lys Lys Met Trp Lys Leu Lys Gln Gln Glu Cys Pro Glu Cys Asp Val
 275 280 285

Leu Ser Leu Gly Thr Tyr Ser Ala Ser Arg Ser Phe Tyr Gly Met Ala
 290 295 300

Asp Lys Val Asp Val Lys Thr Trp Lys Ser Thr Glu His Asn Met Gly
 305 310 315 320

Leu Ala Leu Thr Arg Asn Ala Tyr Gln Lys Leu Ile Glu Cys Thr Asp
 325 330 335

Thr Phe Cys Thr Tyr Asp Asp Tyr Asn Trp Asp Trp Thr Leu Gln Tyr
 340 345 350

Leu Thr Val Ser Cys Leu Pro Lys Phe Trp Lys Val Leu Val Pro Gln
 355 360 365

Ile Pro Arg Ile Phe His Ala Gly Asp Cys Gly Met His His Lys Lys
 370 375 380

Thr Cys Arg Pro Ser Thr Gln Ser Ala Gln Ile Glu Ser Leu Leu Asn

ES 2 734 276 T3

Glu Arg Leu Gly Ser Arg Gly Thr Arg Arg Lys Trp Val Glu Cys Val
 165 170 175
 Cys Leu Pro Gly Trp His Gly Pro Ser Cys Gly Val Pro Thr Val Val
 180 185 190
 Gln Tyr Ser Asn Leu Pro Thr Lys Glu Arg Leu Val Pro Arg Glu Val
 195 200 205
 Pro Arg Arg Val Ile Asn Ala Ile Asn Ile Asn His Glu Phe Asp Leu
 210 215 220
 Leu Asp Val Arg Phe His Glu Leu Gly Asp Val Val Asp Ala Phe Val
 225 230 235 240
 Val Cys Glu Ser Asn Phe Thr Ala Tyr Gly Glu Pro Arg Pro Leu Lys
 245 250 255
 Phe Arg Glu Met Leu Thr Asn Gly Thr Phe Glu Tyr Ile Arg His Lys
 260 265 270
 Val Leu Tyr Val Phe Leu Asp His Phe Pro Pro Gly Gly Arg Gln Asp
 275 280 285
 Gly Trp Ile Ala Asp Asp Tyr Leu Arg Thr Phe Leu Thr Gln Asp Gly
 290 295 300
 Val Ser Arg Leu Arg Asn Leu Arg Pro Asp Asp Val Phe Ile Ile Asp
 305 310 315 320
 Asp Ala Asp Glu Ile Pro Ala Arg Asp Gly Val Leu Phe Leu Lys Leu
 325 330 335
 Tyr Asp Gly Trp Thr Glu Pro Phe Ala Phe His Met Arg Lys Ser Leu
 340 345 350
 Tyr Gly Phe Phe Trp Lys Gln Pro Gly Thr Leu Glu Val Val Ser Gly
 355 360 365
 Cys Thr Met Asp Met Leu Gln Ala Val Tyr Gly Leu Asp Gly Ile Arg
 370 375 380
 Leu Arg Arg Arg Gln Tyr Tyr Thr Met Pro Asn Phe Arg Gln Tyr Glu
 385 390 395 400

ES 2 734 276 T3

Asn Arg Thr Gly His Ile Leu Val Gln Trp Ser Leu Gly Ser Pro Leu
 405 410 415

His Phe Ala Gly Trp His Cys Ser Trp Cys Phe Thr Pro Glu Gly Ile
 420 425 430

Tyr Phe Lys Leu Val Ser Ala Gln Asn Gly Asp Phe Pro Arg Trp Gly
 435 440 445

Asp Tyr Glu Asp Lys Arg Asp Leu Asn Tyr Ile Arg Ser Leu Ile Arg
 450 455 460

Thr Gly Gly Trp Phe Asp Gly Thr Gln Gln Glu Tyr Pro Pro Ala Asp
 465 470 475 480

Pro Ser Glu His Met Tyr Ala Pro Lys Tyr Leu Leu Lys Asn Tyr Asp
 485 490 495

Gln Phe Arg Tyr Leu Leu Glu Asn Pro Tyr Arg Glu Pro Lys Ser Thr
 500 505 510

Glu Glu Gly Gly Arg Arg Asn Gln Gly Ser Asp Gly Arg Pro Ser Ala
 515 520 525

Val Arg Gly Lys Leu Asp Thr Val Glu Gly
 530 535

<210> 23

<211> 533

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Lys Met Arg Arg Tyr Lys Leu Phe Leu Met Phe Cys Met Ala Gly
 1 5 10 15

Leu Cys Leu Ile Ser Phe Leu His Phe Phe Lys Thr Leu Ser Tyr Val
 20 25 30

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

Phe Phe Trp Asn Asn Ala Pro Val Thr Pro Gln Ala Ser Pro Glu Pro
 50 55 60

Gly Gly Pro Asp Leu Leu Arg Thr Pro Leu Tyr Ser His Ser Pro Leu
 65 70 75 80

10

ES 2 734 276 T3

Leu Gln Pro Leu Pro Pro Ser Lys Ala Ala Glu Glu Leu His Arg Val
85 90 95

Asp Leu Val Leu Pro Glu Asp Thr Thr Glu Tyr Phe Val Arg Thr Lys
100 105 110

Ala Gly Gly Val Cys Phe Lys Pro Gly Thr Lys Met Leu Glu Arg Pro
115 120 125

Pro Pro Gly Arg Pro Glu Glu Lys Pro Glu Gly Ala Asn Gly Ser Ser
130 135 140

Ala Arg Arg Pro Pro Arg Tyr Leu Leu Ser Ala Arg Glu Arg Thr Gly
145 150 155 160

Gly Arg Gly Ala Arg Arg Lys Trp Val Glu Cys Val Cys Leu Pro Gly
165 170 175

Trp His Gly Pro Ser Cys Gly Val Pro Thr Val Val Gln Tyr Ser Asn
180 185 190

Leu Pro Thr Lys Glu Arg Leu Val Pro Arg Glu Val Pro Arg Arg Val
195 200 205

Ile Asn Ala Ile Asn Val Asn His Glu Phe Asp Leu Leu Asp Val Arg
210 215 220

Phe His Glu Leu Gly Asp Val Val Asp Ala Phe Val Val Cys Glu Ser
225 230 235 240

Asn Phe Thr Ala Tyr Gly Glu Pro Arg Pro Leu Lys Phe Arg Glu Met
245 250 255

Leu Thr Asn Gly Thr Phe Glu Tyr Ile Arg His Lys Val Leu Tyr Val
260 265 270

Phe Leu Asp His Phe Pro Pro Gly Gly Arg Gln Asp Gly Trp Ile Ala
275 280 285

Asp Asp Tyr Leu Arg Thr Phe Leu Thr Gln Asp Gly Val Ser Arg Leu
290 295 300

Arg Asn Leu Arg Pro Asp Asp Val Phe Ile Ile Asp Asp Ala Asp Glu
305 310 315 320

ES 2 734 276 T3

Ile Pro Ala Arg Asp Gly Val Leu Phe Leu Lys Leu Tyr Asp Gly Trp
 325 330 335

Thr Glu Pro Phe Ala Phe His Met Arg Lys Ser Leu Tyr Gly Phe Phe
 340 345 350

Trp Lys Gln Pro Gly Thr Leu Glu Val Val Ser Gly Cys Thr Val Asp
 355 360 365

Met Leu Gln Ala Val Tyr Gly Leu Asp Gly Ile Arg Leu Arg Arg Arg
 370 375 380

Gln Tyr Tyr Thr Met Pro Asn Phe Arg Gln Tyr Glu Asn Arg Thr Gly
 385 390 395 400

His Ile Leu Val Gln Trp Ser Leu Gly Ser Pro Leu His Phe Ala Gly
 405 410 415

Trp His Cys Ser Trp Cys Phe Thr Pro Glu Gly Ile Tyr Phe Lys Leu
 420 425 430

Val Ser Ala Gln Asn Gly Asp Phe Pro Arg Trp Gly Asp Tyr Glu Asp
 435 440 445

Lys Arg Asp Leu Asn Tyr Ile Arg Gly Leu Ile Arg Thr Gly Gly Trp
 450 455 460

Phe Asp Gly Thr Gln Gln Glu Tyr Pro Pro Ala Asp Pro Ser Glu His
 465 470 475 480

Met Tyr Ala Pro Lys Tyr Leu Leu Lys Asn Tyr Asp Arg Phe His Tyr
 485 490 495

Leu Leu Asp Asn Pro Tyr Gln Glu Pro Arg Ser Thr Ala Ala Gly Gly
 500 505 510

Trp Arg His Arg Gly Pro Glu Gly Arg Pro Pro Ala Arg Gly Lys Leu
 515 520 525

Asp Glu Ala Glu Val
 530

<210> 24

<211> 535

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

ES 2 734 276 T3

Met Arg Leu Arg Asn Gly Thr Val Ala Thr Ala Leu Val Phe Val Thr
 1 5 10 15

Ser Phe Leu Thr Leu Ser Trp Tyr Thr Thr Trp Gln Asn Gly Lys Glu
 20 25 30

Lys Leu Ile Ala Tyr Gln Arg Glu Phe Leu Ala Leu Lys Glu Arg Leu
 35 40 45

Arg Val Ala Glu His Arg Ile Ser Gln Arg Ser Ser Glu Leu Asn Thr
 50 55 60

Ile Val Gln Gln Phe Arg Arg Ala Gly Ala Glu Thr Asn Gly Ser Lys
 65 70 75 80

Thr Ala Leu Ser Thr Ile Ser Asp Asn Thr Ile Lys Leu Leu Lys Glu
 85 90 95

Leu Thr Ser Lys Lys Ser Leu Arg Val Pro Ser Ile Tyr Tyr His Leu
 100 105 110

Pro His Leu Leu Gln Asn Glu Arg Ser Leu Gln Pro Ala Val Gln Ile
 115 120 125

Gly Ser Gly Arg Thr Gly Val Ser Ile Val Met Gly Ile Pro Thr Val
 130 135 140

Lys Arg Glu Val Lys Ser Tyr Leu Val Glu Thr Leu His Ser Leu Ile
 145 150 155 160

Asp Asn Leu Tyr Pro Glu Glu Lys Leu Asp Cys Val Ile Val Val Phe
 165 170 175

Ile Gly Glu Thr Asp Leu Asp Tyr Val His Ser Val Val Ala Asn Leu
 180 185 190

Glu Lys Glu Phe Ser Arg Glu Ile Ser Ser Gly Leu Leu Glu Ile Ile
 195 200 205

Ser Pro Pro Glu Ser Tyr Tyr Pro Asp Leu Thr Asn Leu Lys Glu Thr
 210 215 220

Phe Gly Asp Ser Lys Glu Arg Val Arg Trp Arg Thr Lys Gln Asn Leu
 225 230 235 240

ES 2 734 276 T3

Asp	Tyr	Cys	Phe	Leu	Met	Met	Tyr	Ala	Gln	Glu	Lys	Gly	Ile	Tyr	Tyr	245 250 255
Ile	Gln	Leu	Glu	Asp	Asp	Ile	Ile	Val	Lys	Gln	Asn	Tyr	Phe	Asn	Thr	260 265 270
Ile	Lys	Asn	Phe	Ala	Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Glu	Glu	Trp	Met	Ile	Leu	275 280 285
Glu	Phe	Ser	Gln	Leu	Gly	Phe	Ile	Gly	Lys	Met	Phe	Gln	Ala	Pro	Asp	290 295 300
Leu	Ala	Leu	Val	Val	Glu	Phe	Ile	Leu	Met	Phe	Tyr	Lys	Glu	Lys	Pro	305 310 315 320
Ile	Asp	Trp	Leu	Leu	Asp	His	Ile	Leu	Trp	Val	Lys	Val	Cys	Asn	Pro	325 330 335
Glu	Lys	Asp	Ala	Lys	His	Cys	Asp	Arg	Gln	Lys	Ala	Asn	Leu	Arg	Ile	340 345 350
Arg	Phe	Arg	Pro	Ser	Leu	Phe	Gln	His	Val	Gly	Leu	His	Ser	Ser	Leu	355 360 365
Ser	Gly	Lys	Ile	Gln	Lys	Leu	Thr	Asp	Lys	Asp	Tyr	Met	Lys	Pro	Leu	370 375 380
Leu	Leu	Lys	Val	His	Val	Asn	Pro	Pro	Ala	Glu	Val	Ser	Thr	Ser	Leu	385 390 395 400
Lys	Val	Tyr	Gln	Gly	His	Thr	Leu	Glu	Lys	Thr	Tyr	Met	Gly	Glu	Asp	405 410 415
Phe	Phe	Trp	Ala	Ile	Thr	Pro	Thr	Ala	Gly	Asp	Tyr	Ile	Leu	Phe	Lys	420 425 430
Phe	Asp	Lys	Pro	Val	Asn	Val	Glu	Ser	Tyr	Leu	Phe	His	Ser	Gly	Asn	435 440 445
Gln	Glu	His	Pro	Gly	Asp	Ile	Leu	Leu	Asn	Thr	Thr	Val	Asp	Val	Leu	450 455 460
Pro	Leu	Lys	Ser	Asp	Ser	Leu	Glu	Ile	Ser	Lys	Glu	Thr	Lys	Asp	Lys	465 470 475 480

ES 2 734 276 T3

Arg Leu Glu Asp Gly Tyr Phe Arg Ile Gly Lys Phe Glu Tyr Gly Val
 485 490 495

Ala Glu Gly Ile Val Asp Pro Gly Leu Asn Pro Ile Ser Ala Phe Arg
 500 505 510

Leu Ser Val Ile Gln Asn Ser Ala Val Trp Ala Ile Leu Asn Glu Ile
 515 520 525

His Ile Lys Lys Val Thr Ser
 530 535

<210> 25

<211> 548

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Met Arg Leu Arg Asn Gly Thr Phe Leu Thr Leu Leu Phe Cys Leu
 1 5 10 15

Cys Ala Phe Leu Ser Leu Ser Trp Tyr Ala Ala Leu Ser Gly Gln Lys
 20 25 30

Gly Asp Val Val Asp Ile Tyr Gln Arg Glu Phe Leu Ala Leu Arg Asp
 35 40 45

Arg Leu His Ala Ala Glu Gln Glu Ser Leu Lys Arg Ser Lys Glu Leu
 50 55 60

Asn Leu Val Leu Glu Glu Ile Lys Arg Ala Val Ser Glu Arg Gln Ala
 65 70 75 80

Leu Arg Asp Gly Glu Gly Asn Arg Thr Trp Gly Arg Leu Thr Glu Asp
 85 90 95

Pro Arg Leu Lys Pro Trp Asn Val Ser His Arg His Val Leu His Leu
 100 105 110

Pro Thr Val Phe His His Leu Pro His Leu Leu Ala Lys Glu Ser Ser
 115 120 125

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

Val Met Gly Ile Pro Ser Val Arg Arg Glu Val His Ser Tyr Leu Thr

10

ES 2 734 276 T3

145	150	155	160
Asp Thr Leu His Ser Leu Ile Ser Glu Leu Ser Pro Gln Glu Lys Glu	165	170	175
Asp Ser Val Ile Val Val Leu Ile Ala Glu Thr Asp Pro Gln Tyr Thr	180	185	190
Ser Ala Val Thr Glu Asn Ile Lys Ala Leu Phe Pro Thr Glu Ile His	195	200	205
Ser Gly Leu Leu Glu Val Ile Ser Pro Ser Pro His Phe Tyr Pro Asp	210	215	220
Phe Ser Arg Leu Arg Glu Ser Phe Gly Asp Pro Lys Glu Arg Val Arg	225	230	235
Trp Arg Thr Lys Gln Asn Leu Asp Tyr Cys Phe Leu Met Met Tyr Ala	245	250	255
Gln Ser Lys Gly Ile Tyr Tyr Val Gln Leu Glu Asp Asp Ile Val Ala	260	265	270
Lys Pro Asn Tyr Leu Ser Thr Met Lys Asn Phe Ala Leu Gln Gln Pro	275	280	285
Ser Glu Asp Trp Met Ile Leu Glu Phe Ser Gln Leu Gly Phe Ile Gly	290	295	300
Lys Met Phe Lys Ser Leu Asp Leu Ser Leu Ile Val Glu Phe Ile Leu	305	310	315
Met Phe Tyr Arg Asp Lys Pro Ile Asp Trp Leu Leu Asp His Ile Leu	325	330	335
Trp Val Lys Val Cys Asn Pro Glu Lys Asp Ala Lys His Cys Asp Arg	340	345	350
Gln Lys Ala Asn Leu Arg Ile Arg Phe Lys Pro Ser Leu Phe Gln His	355	360	365
Val Gly Thr His Ser Ser Leu Ala Gly Lys Ile Gln Lys Leu Lys Asp	370	375	380
Lys Asp Phe Gly Lys His Ala Leu Arg Lys Ser Tyr Val Asn Pro Pro	385	390	395
			400

ES 2 734 276 T3

Ala Glu Val Ser Thr Ser Leu Lys Thr Tyr Gln His Phe Thr Leu Glu
405 410 415

Lys Ala Tyr Leu Arg Glu Asp Phe Phe Trp Ala Phe Thr Pro Ala Ala
420 425 430

Gly Asp Phe Ile Arg Phe Arg Phe Phe Gln Pro Leu Arg Leu Glu Arg
435 440 445

Phe Phe Phe Arg Ser Gly Asn Ile Glu His Pro Glu Asp Lys Leu Phe
450 455 460

Asn Thr Ser Val Glu Val Leu Pro Phe Asp Asn Pro Gln Ser Glu Lys
465 470 475 480

Glu Ala Leu Gln Glu Gly Arg Ser Ala Thr Leu Arg Tyr Pro Arg Ser
485 490 495

Pro Asp Gly Tyr Leu Gln Ile Gly Ser Phe Tyr Lys Gly Val Ala Glu
500 505 510

Gly Glu Val Asp Pro Ala Phe Gly Pro Leu Glu Ala Leu Arg Leu Ser
515 520 525

Ile Gln Thr Asp Ser Pro Val Trp Val Ile Leu Ser Glu Ile Phe Leu
530 535 540

Lys Lys Ala Asp
545

<210> 26

<211> 478

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Met Leu Lys Phe Tyr Gln Met Lys Tyr Ile Phe Gln Ile Leu Asp Lys
1 5 10 15

Met Arg Cys Leu Arg Lys Arg Ser Thr Val Ser Phe Leu Gly Val Leu
20 25 30

Val Val Phe Leu Leu Phe Met Asn Leu Tyr Ile Glu Asp Ser Tyr Val
35 40 45

10

ES 2 734 276 T3

Leu Glu Gly Asp Lys Gln Leu Ile Arg Glu Thr Ser Thr His Gln Leu
 50 55 60

Asn Ser Glu Arg Tyr Val His Thr Phe Lys Asp Leu Ser Asn Phe Ser
 65 70 75 80

Gly Thr Ile Asn Val Thr Tyr Arg Tyr Leu Ala Ala Thr Pro Leu Gln
 85 90 95

Arg Lys Arg Tyr Leu Thr Ile Gly Leu Ser Ser Val Lys Arg Lys Lys
 100 105 110

Gly Asn Tyr Leu Leu Asp Thr Ile Lys Ser Ile Phe Glu Gln Ser Ser
 115 120 125

Tyr Glu Glu Leu Lys Glu Ile Ser Val Val Val His Leu Ala Asp Phe
 130 135 140

Asn Ser Ser Trp Arg Asp Ala Met Val Gln Asp Ile Thr Gln Lys Phe
 145 150 155 160

Ala His His Ile Ile Ala Gly Arg Leu Met Val Ile His Ala Pro Glu
 165 170 175

Glu Tyr Tyr Pro Val Leu Asp Gly Leu Lys Arg Asn Tyr Asn Asp Pro
 180 185 190

Glu Asp Arg Val Arg Phe Arg Ser Lys Gln Asn Val Asp Tyr Ala Phe
 195 200 205

Leu Leu Asn Phe Cys Ala Asn Thr Ser Asp Tyr Tyr Val Met Leu Glu
 210 215 220

Asp Asp Val Arg Cys Ser Arg Asn Phe Leu Thr Ala Ile Lys Lys Val
 225 230 235 240

Ile Ala Ser Leu Glu Gly Thr Tyr Trp Val Thr Leu Glu Phe Ser Lys
 245 250 255

Leu Gly Tyr Ile Gly Lys Leu Tyr His Ser His Asp Leu Pro Arg Leu
 260 265 270

Ala His Phe Leu Leu Met Phe Tyr Gln Glu Met Pro Cys Asp Trp Leu
 275 280 285

Leu Thr His Phe Arg Gly Leu Leu Ala Gln Lys Asn Val Ile Arg Phe

ES 2 734 276 T3

290

295

300

Lys Pro Ser Leu Phe Gln His Met Gly Tyr Tyr Ser Ser Tyr Lys Gly
 305 310 315 320

Thr Glu Asn Lys Leu Lys Asp Asp Asp Phe Glu Glu Glu Ser Phe Asp
 325 330 335

Ile Pro Asp Asn Pro Pro Ala Ser Phe Tyr Thr Asn Met Asn Val Phe
 340 345 350

Glu Asn Tyr Glu Ala Ser Lys Ala Tyr Ser Ser Val Asp Glu Tyr Phe
 355 360 365

Trp Gly Lys Ser Pro Ser Met Gly Asp Thr Phe Val Ile Val Phe Glu
 370 375 380

Asn Pro Ile Thr Ile Lys Lys Ile Lys Val Asn Thr Gly Thr Glu Asp
 385 390 395 400

Arg Gln Asn Asp Ile Leu Gln His Gly Ala Leu Asp Val Gly Glu Lys
 405 410 415

Leu Ile Phe Ser Lys Gln Ile Arg Gln Cys Asp Thr Tyr Leu Arg Leu
 420 425 430

Gly Glu Phe Lys Asn Gly Tyr Phe Glu Met Ser Asp Val Asn Gln Lys
 435 440 445

Ile Pro Phe Asp Ile His Cys Met Arg Ile Cys Val Thr Lys Thr Gln
 450 455 460

Lys Glu Trp Leu Ile Ile Arg Ser Ile Ser Ile Trp Thr Ser
 465 470 475

<210> 27

<211> 535

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Met Arg Leu Arg Asn Gly Thr Val Ala Thr Ala Leu Ala Phe Ile Thr
 1 5 10 15

Ser Phe Leu Thr Leu Ser Trp Tyr Thr Thr Trp Gln Asn Gly Lys Glu
 20 25 30

10

ES 2 734 276 T3

Lys Leu Ile Ala Tyr Gln Arg Glu Phe Leu Ala Leu Lys Glu Arg Leu
 35 40 45

Arg Ile Ala Glu His Arg Ile Ser Gln Arg Ser Ser Glu Leu Asn Thr
 50 55 60

Ile Val Gln Gln Phe Lys Arg Val Gly Ala Glu Thr Asn Gly Ser Lys
 65 70 75 80

Asp Ala Leu Asn Lys Phe Ser Asp Asn Thr Leu Lys Leu Leu Lys Glu
 85 90 95

Leu Thr Ser Lys Lys Ser Leu Gln Val Pro Ser Ile Tyr Tyr His Leu
 100 105 110

Pro His Leu Leu Lys Asn Glu Gly Ser Leu Gln Pro Ala Val Gln Ile
 115 120 125

Gly Asn Gly Arg Thr Gly Val Ser Ile Val Met Gly Ile Pro Thr Val
 130 135 140

Lys Arg Glu Val Lys Ser Tyr Leu Ile Glu Thr Leu His Ser Leu Ile
 145 150 155 160

Asp Asn Leu Tyr Pro Glu Glu Lys Leu Asp Cys Val Ile Val Val Phe
 165 170 175

Ile Gly Glu Thr Asp Ile Asp Tyr Val His Gly Val Val Ala Asn Leu
 180 185 190

Glu Lys Glu Phe Ser Lys Glu Ile Ser Ser Gly Leu Val Glu Val Ile
 195 200 205

Ser Pro Pro Glu Ser Tyr Tyr Pro Asp Leu Thr Asn Leu Lys Glu Thr
 210 215 220

Phe Gly Asp Ser Lys Glu Arg Val Arg Trp Arg Thr Lys Gln Asn Leu
 225 230 235 240

Asp Tyr Cys Phe Leu Met Met Tyr Ala Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Tyr
 245 250 255

Ile Gln Leu Glu Asp Asp Ile Ile Val Lys Gln Asn Tyr Phe Asn Thr
 260 265 270

ES 2 734 276 T3

Ile Lys Asn Phe Ala Leu Gln Leu Ser Ser Glu Glu Trp Met Ile Leu
 275 280 285

Glu Phe Ser Gln Leu Gly Phe Ile Gly Lys Met Phe Gln Ala Pro Asp
 290 295 300

Leu Thr Leu Ile Val Glu Phe Ile Phe Met Phe Tyr Lys Glu Lys Pro
 305 310 315 320

Ile Asp Trp Leu Leu Asp His Ile Leu Trp Val Lys Val Cys Asn Pro
 325 330 335

Glu Lys Asp Ala Lys His Cys Asp Arg Gln Lys Ala Asn Leu Arg Ile
 340 345 350

Arg Phe Arg Pro Ser Leu Phe Gln His Val Gly Leu His Ser Ser Leu
 355 360 365

Ser Gly Lys Ile Gln Lys Leu Thr Asp Lys Asp Tyr Met Lys Pro Leu
 370 375 380

Leu Leu Lys Ile His Val Asn Pro Pro Ala Glu Val Ser Thr Ser Leu
 385 390 395 400

Lys Val Tyr Gln Gly His Thr Leu Glu Lys Thr Tyr Met Gly Glu Asp
 405 410 415

Phe Phe Trp Ala Ile Thr Pro Ile Ala Gly Asp Tyr Ile Leu Phe Lys
 420 425 430

Phe Asp Lys Pro Val Asn Val Glu Ser Tyr Leu Phe His Ser Gly Asn
 435 440 445

Gln Glu His Pro Gly Asp Ile Leu Leu Asn Thr Thr Val Glu Val Leu
 450 455 460

Pro Phe Lys Ser Glu Gly Leu Glu Ile Ser Lys Glu Thr Lys Asp Lys
 465 470 475 480

Arg Leu Glu Asp Gly Tyr Phe Arg Ile Gly Lys Phe Glu Asn Gly Val
 485 490 495

Ala Glu Gly Met Val Asp Pro Ser Leu Asn Pro Ile Ser Ala Phe Arg
 500 505 510

Leu Ser Val Ile Gln Asn Ser Ala Val Trp Ala Ile Leu Asn Glu Ile
 515 520 525

His Ile Lys Lys Ala Thr Asn
 530 535

5 <210> 28
 <211> 548
 <212> PRT

ES 2 734 276 T3

<213> Homo sapiens

<400> 28

```

Met Arg Leu Arg Asn Gly Thr Phe Leu Thr Leu Leu Leu Phe Cys Leu
1          5          10          15

Cys Ala Phe Leu Ser Leu Ser Trp Tyr Ala Ala Leu Ser Gly Gln Lys
20          25          30

Gly Asp Val Val Asp Val Tyr Gln Arg Glu Phe Leu Ala Leu Arg Asp
35          40          45

Arg Leu His Ala Ala Glu Gln Glu Ser Leu Lys Arg Ser Lys Glu Leu
50          55          60

Asn Leu Val Leu Asp Glu Ile Lys Arg Ala Val Ser Glu Arg Gln Ala
65          70          75          80

Leu Arg Asp Gly Asp Gly Asn Arg Thr Trp Gly Arg Leu Thr Glu Asp
85          90          95

Pro Arg Leu Lys Pro Trp Asn Gly Ser His Arg His Val Leu His Leu
100         105         110

Pro Thr Val Phe His His Leu Pro His Leu Leu Ala Lys Glu Ser Ser
115         120         125

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

Val Met Gly Ile Pro Ser Val Arg Arg Glu Val His Ser Tyr Leu Thr
145         150         155         160

Asp Thr Leu His Ser Leu Ile Ser Glu Leu Ser Pro Gln Glu Lys Glu
165         170         175

Asp Ser Val Ile Val Val Leu Ile Ala Glu Thr Asp Ser Gln Tyr Thr
180         185         190

```

5

ES 2 734 276 T3

Ser Ala Val Thr Glu Asn Ile Lys Ala Leu Phe Pro Thr Glu Ile His
 195 200 205

Ser Gly Leu Leu Glu Val Ile Ser Pro Ser Pro His Phe Tyr Pro Asp
 210 215 220

Phe Ser Arg Leu Arg Glu Ser Phe Gly Asp Pro Lys Glu Arg Val Arg
 225 230 235 240

Trp Arg Thr Lys Gln Asn Leu Asp Tyr Cys Phe Leu Met Met Tyr Ala
 245 250 255

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

Lys Pro Asn Tyr Leu Ser Thr Met Lys Asn Phe Ala Leu Gln Gln Pro
 275 280 285

Ser Glu Asp Trp Met Ile Leu Glu Phe Ser Gln Leu Gly Phe Ile Gly
 290 295 300

Lys Met Phe Lys Ser Leu Asp Leu Ser Leu Ile Val Glu Phe Ile Leu
 305 310 315 320

Met Phe Tyr Arg Asp Lys Pro Ile Asp Trp Leu Leu Asp His Ile Leu
 325 330 335

Trp Val Lys Val Cys Asn Pro Glu Lys Asp Ala Lys His Cys Asp Arg
 340 345 350

Gln Lys Ala Asn Leu Arg Ile Arg Phe Lys Pro Ser Leu Phe Gln His
 355 360 365

Val Gly Thr His Ser Ser Leu Ala Gly Lys Ile Gln Lys Leu Lys Asp
 370 375 380

Lys Asp Phe Gly Lys Gln Ala Leu Arg Lys Glu His Val Asn Pro Pro
 385 390 395 400

Ala Glu Val Ser Thr Ser Leu Lys Thr Tyr Gln His Phe Thr Leu Glu
 405 410 415

Lys Ala Tyr Leu Arg Glu Asp Phe Phe Trp Ala Phe Thr Pro Ala Ala
 420 425 430

ES 2 734 276 T3

Gly Asp Phe Ile Arg Phe Arg Phe Phe Gln Pro Leu Arg Leu Glu Arg
 435 440 445

Phe Phe Phe Arg Ser Gly Asn Ile Glu His Pro Glu Asp Lys Leu Phe
 450 455 460

Asn Thr Ser Val Glu Val Leu Pro Phe Asp Asn Pro Gln Ser Asp Lys
 465 470 475 480

Glu Ala Leu Gln Glu Gly Arg Thr Ala Thr Leu Arg Tyr Pro Arg Ser
 485 490 495

Pro Asp Gly Tyr Leu Gln Ile Gly Ser Phe Tyr Lys Gly Val Ala Glu
 500 505 510

Gly Glu Val Asp Pro Ala Phe Gly Pro Leu Glu Ala Leu Arg Leu Ser
 515 520 525

Ile Gln Thr Asp Ser Pro Val Trp Val Ile Leu Ser Glu Ile Phe Leu
 530 535 540

Lys Lys Ala Asp
 545

<210> 29

<211> 563

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Met Ser Arg Val Ala Gly Thr Arg Thr Asp Val Asn Glu Leu Leu Gln
 1 5 10 15

Arg Trp Thr Pro Arg Cys Val Arg Trp His Thr Gly Gly Ala Arg Arg
 20 25 30

Val Ala Leu Asp Arg Pro Leu Val Thr Ala Cys Leu Pro Pro Ala Gly
 35 40 45

Asp Val Val Asp Val Tyr Gln Arg Glu Phe Leu Ala Leu Arg Asp Arg
 50 55 60

Leu His Ala Ala Glu Gln Glu Ser Leu Lys Arg Ser Lys Glu Leu Asn
 65 70 75 80

Leu Val Leu Asp Glu Ile Lys Arg Ala Val Ser Glu Arg Gln Ala Leu
 85 90 95

10

ES 2 734 276 T3

Arg Asp Gly Asp Gly Asn Arg Thr Trp Gly Arg Leu Thr Glu Asp Pro
 100 105 110

Arg Leu Lys Pro Trp Asn Gly Ser His Arg His Val Leu His Leu Pro
 115 120 125

Thr Val Phe His His Leu Pro His Leu Leu Ala Lys Glu Ser Ser Leu
 130 135 140

Gln Pro Ala Val Arg Val Gly Gln Gly Arg Thr Gly Val Ser Val Val
 145 150 155 160

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

Thr Leu His Ser Leu Ile Ser Glu Leu Ser Pro Gln Glu Lys Glu Asp
 180 185 190

Ser Val Ile Val Val Leu Ile Ala Glu Thr Asp Ser Gln Tyr Thr Ser
 195 200 205

Ala Val Thr Glu Asn Ile Lys Ala Leu Phe Pro Thr Glu Ile His Ser
 210 215 220

Gly Leu Leu Glu Val Ile Ser Pro Ser Pro His Phe Tyr Pro Asp Phe
 225 230 235 240

Ser Arg Leu Arg Glu Ser Phe Gly Asp Pro Lys Glu Arg Val Arg Trp
 245 250 255

Arg Thr Lys Gln Asn Leu Asp Tyr Cys Phe Leu Met Met Tyr Ala Gln
 260 265 270

Ser Lys Gly Ile Tyr Tyr Val Gln Leu Glu Asp Asp Ile Val Ala Lys
 275 280 285

Pro Asn Tyr Leu Ser Thr Met Lys Asn Phe Ala Leu Gln Gln Pro Ser
 290 295 300

Glu Asp Trp Met Ile Leu Glu Phe Ser Gln Leu Gly Phe Ile Gly Lys
 305 310 315 320

Met Phe Lys Ser Leu Asp Leu Ser Leu Ile Val Glu Phe Ile Leu Met
 325 330 335

ES 2 734 276 T3

Phe Tyr Arg Asp Lys Pro Ile Asp Trp Leu Leu Asp His Ile Leu Trp
 340 345 350

Val Lys Val Cys Asn Pro Glu Lys Asp Ala Lys His Cys Asp Arg Gln
 355 360 365

Lys Ala Asn Leu Arg Ile Arg Phe Lys Pro Ser Leu Phe Gln His Val
 370 375 380

Gly Thr His Ser Ser Leu Ala Gly Lys Ile Gln Lys Leu Lys Asp Lys
 385 390 395 400

Asp Phe Gly Lys Gln Ala Leu Arg Lys Glu His Val Asn Pro Pro Ala
 405 410 415

Glu Val Ser Thr Ser Leu Lys Thr Tyr Gln His Phe Thr Leu Glu Lys
 420 425 430

Ala Tyr Leu Arg Glu Asp Phe Phe Trp Ala Phe Thr Pro Ala Ala Gly
 435 440 445

Asp Phe Ile Arg Phe Arg Phe Phe Gln Pro Leu Arg Leu Glu Arg Phe
 450 455 460

Phe Phe Arg Ser Gly Asn Ile Glu His Pro Glu Asp Lys Leu Phe Asn
 465 470 475 480

Thr Ser Val Glu Val Leu Pro Phe Asp Asn Pro Gln Ser Asp Lys Glu
 485 490 495

Ala Leu Gln Glu Gly Arg Thr Ala Thr Leu Arg Tyr Pro Arg Ser Pro
 500 505 510

Asp Gly Tyr Leu Gln Ile Gly Ser Phe Tyr Lys Gly Val Ala Glu Gly
 515 520 525

Glu Val Asp Pro Ala Phe Gly Pro Leu Glu Ala Leu Arg Leu Ser Ile
 530 535 540

Gln Thr Asp Ser Pro Val Trp Val Ile Leu Ser Glu Ile Phe Leu Lys
 545 550 555 560

Lys Ala Asp

<210> 30

<211> 478

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

ES 2 734 276 T3

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

ES 2 734 276 T3

Asp Asp Val Arg Cys Ser Lys Asn Phe Leu Thr Ala Ile Lys Lys Val
 225 230 235 240
 Ile Ala Ser Leu Glu Gly Thr Tyr Trp Val Thr Leu Glu Phe Ser Lys
 245 250 255
 Leu Gly Tyr Ile Gly Lys Leu Tyr His Ser His Asp Leu Pro Arg Leu
 260 265 270
 Ala His Phe Leu Leu Met Phe Tyr Gln Glu Met Pro Cys Asp Trp Leu
 275 280 285
 Leu Thr His Phe Arg Gly Leu Leu Ala Gln Lys Asn Val Ile Arg Phe
 290 295 300
 Lys Pro Ser Leu Phe Gln His Met Gly Tyr Tyr Ser Ser Tyr Lys Gly
 305 310 315 320
 Thr Glu Asn Lys Leu Lys Asp Asp Asp Phe Glu Glu Glu Ser Phe Asp
 325 330 335
 Ile Pro Asp Asn Pro Pro Ala Ser Leu Tyr Thr Asn Met Asn Val Phe
 340 345 350
 Glu Asn Tyr Glu Ala Ser Lys Ala Tyr Ser Ser Val Asp Glu Tyr Phe
 355 360 365
 Trp Gly Lys Pro Pro Ser Thr Gly Asp Val Phe Val Ile Val Phe Glu
 370 375 380
 Asn Pro Ile Ile Ile Lys Lys Ile Lys Val Asn Thr Gly Thr Glu Asp
 385 390 395 400
 Arg Gln Asn Asp Ile Leu His His Gly Ala Leu Asp Val Gly Glu Asn
 405 410 415
 Val Met Pro Ser Lys Gln Arg Arg Gln Cys Ser Thr Tyr Leu Arg Leu
 420 425 430
 Gly Glu Phe Lys Asn Gly Asn Phe Glu Met Ser Gly Val Asn Gln Lys
 435 440 445
 Ile Pro Phe Asp Ile His Cys Met Arg Ile Tyr Val Thr Lys Thr Gln
 450 455 460
 Lys Glu Trp Leu Ile Ile Arg Ser Ile Ser Ile Trp Thr Ser
 465 470 475

5 <210> 31
 <211> 740
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 31

ES 2 734 276 T3

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

ES 2 734 276 T3

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

ES 2 734 276 T3

Leu Val Tyr Gly Lys Val Asp Ser Phe Trp Lys Asn Lys Lys Ile Tyr
 450 455 460

Leu Asp Ile Ile His Thr Tyr Met Glu Val His Ala Thr Val Tyr Gly
 465 470 475 480

Ser Ser Thr Lys Asn Ile Pro Ser Tyr Val Lys Asn His Gly Ile Leu
 485 490 495

Ser Gly Arg Asp Leu Gln Phe Leu Leu Arg Glu Thr Lys Leu Phe Val
 500 505 510

Gly Leu Gly Phe Pro Tyr Glu Gly Pro Ala Pro Leu Glu Ala Ile Ala
 515 520 525

Asn Gly Cys Ala Phe Leu Asn Pro Lys Phe Asn Pro Pro Lys Ser Ser
 530 535 540

Lys Asn Thr Asp Phe Phe Ile Gly Lys Pro Thr Leu Arg Glu Leu Thr
 545 550 555 560

Ser Gln His Pro Tyr Ala Glu Val Phe Ile Gly Arg Pro His Val Trp
 565 570 575

Thr Val Asp Leu Asn Asn Arg Glu Glu Val Glu Asp Ala Val Lys Ala
 580 585 590

Ile Leu Asn Gln Lys Ile Glu Pro Tyr Met Pro Tyr Glu Phe Thr Cys
 595 600 605

Glu Gly Met Leu Gln Arg Ile Asn Ala Phe Ile Glu Lys Gln Asp Phe
 610 615 620

Cys His Gly Gln Val Met Trp Pro Pro Leu Ser Ala Leu Gln Val Lys
 625 630 635 640

Leu Ala Glu Pro Gly Gln Ser Cys Lys Gln Val Cys Gln Glu Ser Gln
 645 650 655

Leu Ile Cys Glu Pro Ser Phe Phe Gln His Leu Asn Lys Glu Lys Asp
 660 665 670

Leu Leu Lys Tyr Lys Val Thr Cys Gln Ser Ser Glu Leu Tyr Lys Asp
 675 680 685

ES 2 734 276 T3

Ile Leu Val Pro Ser Phe Tyr Pro Lys Ser Lys His Cys Val Phe Gln
 690 695 700

Gly Asp Leu Leu Leu Phe Ser Cys Ala Gly Ala His Pro Thr His Gln
 705 710 715 720

Arg Ile Cys Pro Cys Arg Asp Phe Ile Lys Gly Gln Val Ala Leu Cys
 725 730 735

Lys Asp Cys Leu
 740

<210> 32

<211> 792

5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Met Ile Thr Val Asn Pro Asp Gly Lys Ile Met Val Arg Arg Cys Leu
 1 5 10 15

Val Thr Leu Arg Pro Phe Arg Leu Phe Val Leu Gly Ile Gly Phe Phe
 20 25 30

Thr Leu Cys Phe Leu Met Thr Ser Leu Gly Gly Gln Phe Ser Ala Arg
 35 40 45

Arg Leu Gly Asp Ser Pro Phe Thr Ile Arg Thr Glu Val Pro Gly Ser
 50 55 60

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

Met Val Lys Arg Met Asp Met Leu Ala Arg Leu Glu Asn Ser Ser Glu
 85 90 95

Leu His Arg Thr Ala Ser Val Ala His Leu Ala Ala Asp Arg Leu Thr
 100 105 110

Pro Gly Ala Ser Leu Ile Glu Arg Ile Gln Ala Ile Ala Gln Asn Val
 115 120 125

Ser Asp Ile Ala Val Lys Val Asp Gln Ile Leu Arg His Ser Leu Ile
 130 135 140

Leu His Ser Lys Val Ser Glu Gly Arg Arg Asp Gln Cys Glu Ala Pro

10

ES 2 734 276 T3

145					150												155											160
Ser	Asp	Pro	Lys	Phe	Pro	Asp	Cys	Ser	Gly	Lys	Val	Glu	Trp	Met	Arg													
				165					170						175													
Ala	Arg	Trp	Thr	Ser	Asp	Pro	Cys	Tyr	Ala	Phe	Phe	Gly	Val	Asp	Gly													
			180					185							190													
Thr	Glu	Cys	Ser	Phe	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ser	Glu	Val	Glu	Trp	Phe	Cys													
		195					200								205													
Pro	Pro	Leu	Pro	Trp	Arg	Asn	Gln	Thr	Ala	Ala	Arg	Thr	Ala	Pro	Lys													
	210					215																						
Ser	Leu	Pro	Arg	Val	Gln	Ala	Val	Phe	Arg	Ser	Asn	Leu	Ser	His	Leu													
225					230					235					240													
Leu	Glu	Leu	Met	Gly	Ser	Gly	Lys	Glu	Ser	Leu	Ile	Phe	Met	Lys	Lys													
				245					250						255													
Arg	Thr	Arg	Arg	Phe	Thr	Ala	Gln	Trp	Thr	Lys	Ala	Ala	Lys	Tyr	Leu													
				260					265						270													
Ala	Gln	Lys	Leu	Gly	Asp	Ile	Arg	Arg	Asp	Gln	Lys	Gln	Ile	Leu	Val													
		275					280					285																
His	Ile	Gly	Phe	Leu	Thr	Glu	Glu	Ser	Gly	Asp	Val	Phe	Ser	Pro	Arg													
	290					295					300																	
Val	Leu	Lys	Gly	Gly	Pro	Leu	Gly	Glu	Met	Val	Gln	Trp	Ala	Asp	Ile													
305					310					315					320													
Leu	Ala	Ala	Leu	Tyr	Val	Leu	Gly	His	Ser	Leu	Arg	Ile	Thr	Val	Ser													
				325					330						335													
Leu	Lys	Glu	Leu	Gln	Ser	Asn	Leu	Gly	Val	Pro	Pro	Gly	Arg	Gly	Asn													
			340					345							350													
Cys	Pro	Leu	Thr	Val	Pro	Leu	Pro	Phe	Asp	Leu	Ile	Tyr	Thr	Asp	Tyr													
		355					360								365													
His	Gly	Leu	Gln	Gln	Met	Lys	Gln	His	Met	Gly	Leu	Ser	Phe	Lys	Lys													
	370					375					380																	
Tyr	Arg	Cys	Arg	Ile	Arg	Val	Ile	Asp	Thr	Phe	Gly	Thr	Glu	Pro	Ala													
385					390					395					400													

ES 2 734 276 T3

Tyr Asn His Glu Glu Tyr Ala Thr Leu His Gly Tyr Arg Thr Asn Trp
 405 410 415

Gly Tyr Trp Asn Leu Asn Pro Lys Gln Phe Met Thr Met Phe Pro His
 420 425 430

Thr Pro Asp Asn Ser Phe Met Gly Phe Val Ser Glu Glu Leu Asn Glu
 435 440 445

Thr Glu Lys Gln Leu Ile Lys Asp Gly Lys Ala Ser Asn Met Ala Val
 450 455 460

Val Tyr Gly Lys Glu Ala Ser Ile Trp Lys Leu Gln Gly Lys Glu Lys
 465 470 475 480

Phe Leu Ala Val Leu Asn Lys Tyr Met Glu Ile His Gly Thr Val Tyr
 485 490 495

Tyr Glu Ser Gln Arg Pro Pro Glu Val Pro Ala Phe Val Lys Asn His
 500 505 510

Gly Leu Leu Pro Gln Pro Glu Phe Gln Gln Leu Leu Arg Lys Ala Lys
 515 520 525

Leu Phe Ile Gly Phe Gly Phe Pro Tyr Glu Gly Pro Ala Pro Leu Glu
 530 535 540

Ala Ile Ala Asn Gly Cys Ile Phe Leu Gln Ser Arg Phe Ser Pro Pro
 545 550 555 560

His Ser Ser Leu Asn His Glu Phe Phe Arg Gly Lys Pro Thr Ser Arg
 565 570 575

Glu Val Phe Ser Gln His Pro Tyr Ala Glu Asn Phe Ile Gly Lys Pro
 580 585 590

His Val Trp Thr Val Asp Tyr Asn Asn Ser Asp Glu Phe Glu Thr Ala
 595 600 605

Ile Lys Ala Ile Met Asn Thr Gln Val Asp Pro Tyr Leu Pro Tyr Glu
 610 615 620

Tyr Thr Cys Ala Gly Met Leu Glu Arg Ile Asn Ala Tyr Ile Gln His
 625 630 635 640

ES 2 734 276 T3

Gln Asp Phe Cys Val Gly Pro Ser Pro Leu Pro Pro Gly Ala Ser Thr
 645 650 655

Ala Gln Ser Pro Phe Val Leu Ala Pro Asn Ala Thr His Leu Glu Trp
 660 665 670

Ala Gln Asn Ile Ser Ser Val Pro Gly Ala Trp Pro Pro Thr His Ser
 675 680 685

Leu Arg Ala Trp Leu Ala Ala Pro Gly Arg Ala Cys Thr Asp Ala Cys
 690 695 700

Leu Asp His Gly Leu Ile Cys Glu Pro Ser Phe Phe Pro Phe Leu Asn
 705 710 715 720

Ser Gln Asn Ser Phe Leu Lys Leu Gln Val Pro Cys Asp Ser Thr Glu
 725 730 735

Trp Glu Met His His Leu Tyr Pro Ala Phe Ala Gln Pro Gly Gln Glu
 740 745 750

Cys Tyr Leu Gln Lys Glu Pro Leu Leu Phe Ser Cys Ala Gly Ala Ser
 755 760 765

Thr Lys Tyr Gln Arg Leu Cys Pro Cys Arg Asp Phe Arg Lys Gly Gln
 770 775 780

Val Ala Leu Cys Gln Gly Cys Leu
 785 790

<210> 33
 <211> 741
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 Met Ala Leu Phe Thr Pro Trp Lys Leu Ser Ser Gln Lys Leu Gly Phe
 1 5 10 15

Phe Leu Val Thr Phe Gly Phe Ile Trp Gly Met Met Leu Leu His Phe
 20 25 30

Thr Ile Gln Gln Arg Thr Gln Pro Glu Ser Ser Ser Met Leu Arg Glu
 35 40 45

Gln Ile Leu Asp Leu Ser Lys Arg Tyr Ile Lys Ala Leu Ala Glu Glu

10

ES 2 734 276 T3

50	55	60
Asn Arg Asn Val Val Asp Gly Pro Tyr Ala Gly Val Met Thr Ala Tyr 65	70	75
Asp Leu Lys Lys Thr Leu Ala Val Leu Leu Asp Asn Ile Leu Gln Arg 85	90	95
Ile Gly Lys Leu Glu Ser Lys Val Asp Asn Leu Val Val Asn Gly Thr 100	105	110
Gly Thr Asn Ser Thr Asn Ser Thr Thr Ala Val Pro Ser Leu Val Ala 115	120	125
Leu Glu Lys Ile Asn Val Ala Asp Ile Ile Asn Gly Ala Gln Glu Lys 130	135	140
Cys Val Leu Pro Pro Met Asp Gly Tyr Pro His Cys Glu Gly Lys Ile 145	150	155
Lys Trp Met Lys Asp Met Trp Arg Ser Asp Pro Cys Tyr Ala Asp Tyr 165	170	175
Gly Val Asp Gly Ser Thr Cys Ser Phe Phe Ile Tyr Leu Ser Glu Val 180	185	190
Glu Asn Trp Cys Pro His Leu Pro Trp Arg Ala Lys Asn Pro Tyr Glu 195	200	205
Glu Ala Asp His Asn Ser Leu Ala Glu Ile Arg Thr Asp Phe Asn Ile 210	215	220
Leu Tyr Ser Met Met Lys Lys His Glu Glu Phe Arg Trp Met Arg Leu 225	230	235
Arg Ile Arg Arg Met Ala Asp Ala Trp Ile Gln Ala Ile Lys Ser Leu 245	250	255
Ala Glu Lys Gln Asn Leu Glu Lys Arg Lys Arg Lys Lys Val Leu Val 260	265	270
His Leu Gly Leu Leu Thr Lys Glu Ser Gly Phe Lys Ile Ala Glu Thr 275	280	285
Ala Phe Ser Gly Gly Pro Leu Gly Glu Leu Val Gln Trp Ser Asp Leu 290	295	300

ES 2 734 276 T3

Ile Thr Ser Leu Tyr Leu Leu Gly His Asp Ile Arg Ile Ser Ala Ser
 305 310 315 320

Leu Ala Glu Leu Lys Glu Ile Met Lys Lys Val Val Gly Asn Arg Ser
 325 330 335

Gly Cys Pro Thr Val Gly Asp Arg Ile Val Glu Leu Ile Tyr Ile Asp
 340 345 350

Ile Val Gly Leu Ala Gln Phe Lys Lys Thr Leu Gly Pro Ser Trp Val
 355 360 365

His Tyr Gln Cys Met Leu Arg Val Leu Asp Ser Phe Gly Thr Glu Pro
 370 375 380

Glu Phe Asn His Ala Asn Tyr Ala Gln Ser Lys Gly His Lys Thr Pro
 385 390 395 400

Trp Gly Lys Trp Asn Leu Asn Pro Gln Gln Phe Tyr Thr Met Phe Pro
 405 410 415

His Thr Pro Asp Asn Ser Phe Leu Gly Phe Val Val Glu Gln His Leu
 420 425 430

Asn Ser Ser Asp Ile His His Ile Asn Glu Ile Lys Arg Gln Asn Gln
 435 440 445

Ser Leu Val Tyr Gly Lys Val Asp Ser Phe Trp Lys Asn Lys Lys Ile
 450 455 460

Tyr Leu Asp Ile Ile His Thr Tyr Met Glu Val His Ala Thr Val Tyr
 465 470 475 480

Gly Ser Ser Thr Lys Asn Ile Pro Ser Tyr Val Lys Asn His Gly Ile
 485 490 495

Leu Ser Gly Arg Asp Leu Gln Phe Leu Leu Arg Glu Thr Lys Leu Phe
 500 505 510

Val Gly Leu Gly Phe Pro Tyr Glu Gly Pro Ala Pro Leu Glu Ala Ile
 515 520 525

Ala Asn Gly Cys Ala Phe Leu Asn Pro Lys Phe Asn Pro Pro Lys Ser
 530 535 540

ES 2 734 276 T3

Ser Lys Asn Thr Asp Phe Phe Ile Gly Lys Pro Thr Leu Arg Glu Leu
545 550 555 560

Thr Ser Gln His Pro Tyr Ala Glu Val Phe Ile Gly Arg Pro His Val
565 570 575

Trp Thr Val Asp Leu Asn Asn Gln Glu Glu Val Glu Asp Ala Val Lys
580 585 590

Ala Ile Leu Asn Gln Lys Ile Glu Pro Tyr Met Pro Tyr Glu Phe Thr
595 600 605

Cys Glu Gly Met Leu Gln Arg Ile Asn Ala Phe Ile Glu Lys Gln Asp
610 615 620

Phe Cys His Gly Gln Val Met Trp Pro Pro Leu Ser Ala Leu Gln Val
625 630 635 640

Lys Leu Ala Glu Pro Gly Gln Ser Cys Lys Gln Val Cys Gln Glu Ser
645 650 655

Gln Leu Ile Cys Glu Pro Ser Phe Phe Gln His Leu Asn Lys Asp Lys
660 665 670

Asp Met Leu Lys Tyr Lys Val Thr Cys Gln Ser Ser Glu Leu Ala Lys
675 680 685

Asp Ile Leu Val Pro Ser Phe Asp Pro Lys Asn Lys His Cys Val Phe
690 695 700

Gln Gly Asp Leu Leu Leu Phe Ser Cys Ala Gly Ala His Pro Arg His
705 710 715 720

Gln Arg Val Cys Pro Cys Arg Asp Phe Ile Lys Gly Gln Val Ala Leu
725 730 735

Cys Lys Asp Cys Leu
740

<210> 34

<211> 790

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Met Ile Thr Val Asn Pro Asp Gly Lys Ile Met Val Arg Arg Cys Leu

10

ES 2 734 276 T3

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

ES 2 734 276 T3

Arg Thr Lys Arg Leu Thr Ala Gln Trp Ala Leu Ala Ala Gln Arg Leu
 260 265 270

Ala Gln Lys Leu Gly Ala Thr Gln Arg Asp Gln Lys Gln Ile Leu Val
 275 280 285

His Ile Gly Phe Leu Thr Glu Glu Ser Gly Asp Val Phe Ser Pro Arg
 290 295 300

Val Leu Lys Gly Gly Pro Leu Gly Glu Met Val Gln Trp Ala Asp Ile
 305 310 315 320

Leu Thr Ala Leu Tyr Val Leu Gly His Gly Leu Arg Val Thr Val Ser
 325 330 335

Leu Lys Glu Leu Gln Ser Asn Leu Gly Val Pro Pro Gly Arg Gly Ser
 340 345 350

Cys Pro Leu Thr Met Pro Leu Pro Phe Asp Leu Ile Tyr Thr Asp Tyr
 355 360 365

His Gly Leu Gln Gln Met Lys Arg His Met Gly Leu Ser Phe Lys Lys
 370 375 380

Tyr Arg Cys Arg Ile Arg Val Ile Asp Thr Phe Gly Thr Glu Pro Ala
 385 390 395 400

Tyr Asn His Glu Glu Tyr Ala Thr Leu His Gly Tyr Arg Thr Asn Trp
 405 410 415

Gly Tyr Trp Asn Leu Asn Pro Lys Gln Phe Met Thr Met Phe Pro His
 420 425 430

Thr Pro Asp Asn Ser Phe Met Gly Phe Val Ser Glu Glu Leu Asn Glu
 435 440 445

Thr Glu Lys Arg Leu Ile Lys Gly Gly Lys Ala Ser Asn Met Ala Val
 450 455 460

Val Tyr Gly Lys Glu Ala Ser Ile Trp Lys Gly Lys Glu Lys Phe Leu
 465 470 475 480

Gly Ile Leu Asn Lys Tyr Met Glu Ile His Gly Thr Val Tyr Tyr Glu
 485 490 495

ES 2 734 276 T3

Ser Gln Arg Pro Pro Glu Val Pro Ala Phe Val Lys Asn His Gly Leu
 500 505 510

Leu Pro Gln Pro Glu Phe Gln Gln Leu Leu Arg Lys Ala Lys Leu Phe
 515 520 525

Ile Gly Phe Gly Phe Pro Tyr Glu Gly Pro Ala Pro Leu Glu Ala Ile
 530 535 540

Ala Asn Gly Cys Ile Phe Leu Gln Ser Arg Phe Ser Pro Pro His Ser
 545 550 555 560

Ser Leu Asn His Glu Phe Phe Arg Gly Lys Pro Thr Ser Arg Glu Val
 565 570 575

Phe Ser Gln His Pro Tyr Ala Glu Asn Phe Ile Gly Lys Pro His Val
 580 585 590

Trp Thr Val Asp Tyr Asn Asn Ser Glu Glu Phe Glu Ala Ala Ile Lys
 595 600 605

Ala Ile Met Arg Thr Gln Val Asp Pro Tyr Leu Pro Tyr Glu Tyr Thr
 610 615 620

Cys Glu Gly Met Leu Glu Arg Ile His Ala Tyr Ile Gln His Gln Asp
 625 630 635 640

Phe Cys Arg Ala Pro Asp Pro Ala Leu Pro Glu Ala His Ala Pro Gln
 645 650 655

Ser Pro Phe Val Leu Ala Pro Asn Ala Thr His Leu Glu Trp Ala Arg
 660 665 670

Asn Thr Ser Leu Ala Pro Gly Ala Trp Pro Pro Ala His Ala Leu Arg
 675 680 685

Ala Trp Leu Ala Val Pro Gly Arg Ala Cys Thr Asp Thr Cys Leu Asp
 690 695 700

His Gly Leu Ile Cys Glu Pro Ser Phe Phe Pro Phe Leu Asn Ser Gln
 705 710 715 720

Asp Ala Phe Leu Lys Leu Gln Val Pro Cys Asp Ser Thr Glu Ser Glu
 725 730 735

ES 2 734 276 T3

Met Asn His Leu Tyr Pro Ala Phe Ala Gln Pro Gly Gln Glu Cys Tyr
 740 745 750

Leu Gln Lys Glu Pro Leu Leu Phe Ser Cys Ala Gly Ser Asn Thr Lys
 755 760 765

Tyr Arg Arg Leu Cys Pro Cys Arg Asp Phe Arg Lys Gly Gln Val Ala
 770 775 780

Leu Cys Gln Gly Cys Leu
 785 790

<210> 35

<211> 801

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Met His Ser Phe Val Lys His Leu Cys Ser Arg Tyr Val Val Glu Arg
 1 5 10 15

Gln Gly Thr Met Ala Leu Pro Ala Leu Leu Thr Arg Leu Leu Pro Leu
 20 25 30

Arg Arg Leu Phe Val Leu Gly Ile Gly Phe Phe Thr Leu Cys Phe Leu
 35 40 45

Met Thr Ser Leu Gly Gly Gln Phe Ser Ala Arg Arg Leu Gly Asp Ser
 50 55 60

Pro Phe Thr Ile Arg Thr Glu Val Met Gly Gly Pro Glu Ser Arg Gly
 65 70 75 80

Val Leu Arg Lys Met Ser Asp Leu Leu Glu Leu Met Val Lys Arg Met
 85 90 95

Asp Ala Leu Ala Arg Leu Glu Asn Ser Ser Glu Leu His Arg Ala Gly
 100 105 110

Gly Asp Leu His Phe Pro Ala Asp Arg Met Pro Pro Gly Ala Gly Leu
 115 120 125

Met Glu Arg Ile Gln Ala Ile Ala Gln Asn Val Ser Asp Ile Ala Val
 130 135 140

Lys Val Asp Gln Ile Leu Arg His Ser Leu Leu Leu His Ser Lys Val
 145 150 155 160

10

ES 2 734 276 T3

Ser Glu Gly Arg Arg Asp Gln Cys Glu Ala Pro Ser Asp Pro Lys Phe
 165 170 175

Pro Asp Cys Ser Gly Lys Val Glu Trp Met Arg Ala Arg Trp Thr Ser
 180 185 190

Asp Pro Cys Tyr Ala Phe Phe Gly Val Asp Gly Thr Glu Cys Ser Phe
 195 200 205

Leu Ile Tyr Leu Ser Glu Val Glu Trp Phe Cys Pro Pro Leu Pro Trp
 210 215 220

Arg Asn Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Pro Lys Pro Leu Pro Lys Val
 225 230 235 240

Gln Ala Val Phe Arg Ser Asn Leu Ser His Leu Leu Asp Leu Met Gly
 245 250 255

Ser Gly Lys Glu Ser Leu Ile Phe Met Lys Lys Arg Thr Lys Arg Leu
 260 265 270

Thr Ala Gln Trp Ala Leu Ala Ala Gln Arg Leu Ala Gln Lys Leu Gly
 275 280 285

Ala Thr Gln Arg Asp Gln Lys Gln Ile Leu Val His Ile Gly Phe Leu
 290 295 300

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

Pro Leu Gly Glu Met Val Gln Trp Ala Asp Ile Leu Thr Ala Leu Tyr
 325 330 335

Val Leu Gly His Gly Leu Arg Val Thr Val Ser Leu Lys Glu Leu Gln
 340 345 350

Ser Asn Leu Gly Val Pro Pro Gly Arg Gly Ser Cys Pro Leu Thr Met
 355 360 365

Pro Leu Pro Phe Asp Leu Ile Tyr Thr Asp Tyr His Gly Leu Gln Gln
 370 375 380

Met Lys Arg His Met Gly Leu Ser Phe Lys Lys Tyr Arg Cys Arg Ile
 385 390 395 400

ES 2 734 276 T3

Arg Val Ile Asp Thr Phe Gly Thr Glu Pro Ala Tyr Asn His Glu Glu
 405 410 415

Tyr Ala Thr Leu His Gly Tyr Arg Thr Asn Trp Gly Tyr Trp Asn Leu
 420 425 430

Asn Pro Lys Gln Phe Met Thr Met Phe Pro His Thr Pro Asp Asn Ser
 435 440 445

Phe Met Gly Phe Val Ser Glu Glu Leu Asn Glu Thr Glu Lys Arg Leu
 450 455 460

Ile Lys Gly Gly Lys Ala Ser Asn Met Ala Val Val Tyr Gly Lys Glu
 465 470 475 480

Ala Ser Ile Trp Lys Gly Lys Glu Lys Phe Leu Gly Ile Leu Asn Lys
 485 490 495

Tyr Met Glu Ile His Gly Thr Val Tyr Tyr Glu Ser Gln Arg Pro Pro
 500 505 510

Glu Val Pro Ala Phe Val Lys Asn His Gly Leu Leu Pro Gln Pro Glu
 515 520 525

Phe Gln Gln Leu Leu Arg Lys Ala Lys Leu Phe Ile Gly Phe Gly Phe
 530 535 540

Pro Tyr Glu Gly Pro Ala Pro Leu Glu Ala Ile Ala Asn Gly Cys Ile
 545 550 555 560

Phe Leu Gln Ser Arg Phe Ser Pro Pro His Ser Ser Leu Asn His Glu
 565 570 575

Phe Phe Arg Gly Lys Pro Thr Ser Arg Glu Val Phe Ser Gln His Pro
 580 585 590

Tyr Ala Glu Asn Phe Ile Gly Lys Pro His Val Trp Thr Val Asp Tyr
 595 600 605

Asn Asn Ser Glu Glu Phe Glu Ala Ala Ile Lys Ala Ile Met Arg Thr
 610 615 620

Gln Val Asp Pro Tyr Leu Pro Tyr Glu Tyr Thr Cys Glu Gly Met Leu
 625 630 635 640

ES 2 734 276 T3

Glu Arg Ile His Ala Tyr Ile Gln His Gln Asp Phe Cys Arg Ala Pro
645 650 655

Asp Pro Ala Leu Pro Glu Ala His Ala Pro Gln Ser Pro Phe Val Leu
660 665 670

Ala Pro Asn Ala Thr His Leu Glu Trp Ala Arg Asn Thr Ser Leu Ala
675 680 685

Pro Gly Ala Trp Pro Pro Ala His Ala Leu Arg Ala Trp Leu Ala Val
690 695 700

Pro Gly Arg Ala Cys Thr Asp Thr Cys Leu Asp His Gly Leu Ile Cys
705 710 715 720

Glu Pro Ser Phe Phe Pro Phe Leu Asn Ser Gln Asp Ala Phe Leu Lys
725 730 735

Leu Gln Val Pro Cys Asp Ser Thr Glu Ser Glu Met Asn His Leu Tyr
740 745 750

Pro Ala Phe Ala Gln Pro Gly Gln Glu Cys Tyr Leu Gln Lys Glu Pro
755 760 765

Leu Leu Phe Ser Cys Ala Gly Ser Asn Thr Lys Tyr Arg Arg Leu Cys
770 775 780

Pro Cys Arg Asp Phe Arg Lys Gly Gln Val Ala Leu Cys Gln Gly Cys
785 790 795 800

Leu

<210> 36

<211> 464

5 <212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 36

Met Arg Cys Ser Pro Lys Arg Ser Leu Thr Ala Val Ile Ala Ala Ser
1 5 10 15

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

Asp Pro Gln Glu Val Gln Phe Arg Asp Leu Pro Ser Asp Ala Val Leu
35 40 45

10

ES 2 734 276 T3

Lys Ile Leu Lys Gln Gly Ser Leu His Ile Leu Gln Asp Thr Asp Asn
 50 55 60

Leu Cys Ala Leu His Asn Ile Ser Tyr His Leu Leu Ala Gly Ser Pro
 65 70 75 80

Leu Pro His Lys Lys Phe Leu Ala Val Gly Leu Ser Ser Val Arg Arg
 85 90 95

Pro Arg Gly Tyr Tyr Leu Pro Asp Thr Leu Gln Ser Leu Phe Lys Gln
 100 105 110

Ser Ser Glu Glu Glu Leu Gln Glu Met Val Val Val Val His Leu Ala
 115 120 125

Asp Ala Asp Pro Ile Trp Asn Ala Gln Val Ala Ala Asp Ile Ser His
 130 135 140

Arg Phe Ala His His Ile Leu Leu Gly Arg Leu Val Leu Ile His Thr
 145 150 155 160

Pro His Glu Phe Tyr Pro Thr Leu Glu Gly Leu Lys Arg Asn Tyr Asn
 165 170 175

Asp Pro Glu Glu Arg Val Lys Phe Arg Ser Lys Gln Asn Val Asp Tyr
 180 185 190

Ala Phe Leu Phe Thr Phe Ala Ala Asn Leu Ser Ser Tyr Tyr Leu Met
 195 200 205

Ile Glu Asp Asp Val Trp Ser Ala Lys Ser Phe Phe Thr Ala Ile Arg
 210 215 220

Lys Ala Val Ala Ser Gln Glu Gly Ser Asn Trp Ala Thr Leu Glu Phe
 225 230 235 240

Ser Lys Leu Gly Tyr Ile Gly Lys Leu Tyr Arg Ser Ser Asp Leu Pro
 245 250 255

Arg Leu Ala Arg Phe Leu Leu Leu Phe Tyr Gln Glu Met Pro Cys Asp
 260 265 270

Trp Leu Leu Thr His Phe Arg Leu Leu Leu Thr Gln Lys Asp Val Ile
 275 280 285

ES 2 734 276 T3

Arg Phe Lys Pro Ser Leu Phe Gln His Met Gly Leu Tyr Ser Ser Phe
 290 295 300

Gln Gly Thr Val Asn Arg Leu Glu Asp Asp Glu Phe Gln Ala Asp Ala
 305 310 315 320

Met Asp Leu Pro Asp Asn Pro Pro Ala Ala Leu Phe Thr Asn Met Val
 325 330 335

Val Phe Glu Asn Tyr Glu Pro Ser Lys Ala Tyr Ser Thr Ala Arg Gly
 340 345 350

Tyr Phe Trp Gly Lys Asn Pro Ala Val Gly Ser Ile Phe Ser Ile Val
 355 360 365

Phe His Gln Pro Ala Arg Val Thr Arg Val Arg Val Gln Thr Gly Ser
 370 375 380

Ser Glu Arg Pro Gly Asp Phe Leu His Ala Gly Val Leu Glu Leu Gly
 385 390 395 400

Arg Gly Arg Arg Ala Asp Gly Arg Asp Cys Ser Val Tyr Thr Thr Val
 405 410 415

Gly Thr Phe Glu Lys Gly Asn Leu Glu Trp Arg Gly Leu Glu Lys Gly
 420 425 430

Met Pro Asn Pro Val Glu Cys Val Arg Ile Arg Val Thr Gln Ser Gln
 435 440 445

Ser Glu Trp Leu Ile Ile Gln Ser Ile Gly Ile Trp Thr Ala Gly Thr
 450 455 460

<210> 37
 <211> 1150
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 37
 Met Lys Leu Ser Arg Gln Phe Thr Val Phe Gly Ser Ala Ile Phe Cys
 1 5 10 15

Val Val Ile Phe Ser Leu Tyr Leu Met Leu Asp Arg Gly His Leu Asp
 20 25 30

Tyr Pro Arg Gly Pro Arg Gln Glu Gly Ser Phe Pro Gln Gly Gln Leu

10

ES 2 734 276 T3

35	40	45																			
Ser 50	Ile	Leu	Gln	Glu	Lys	Ile 55	Asp	His	Leu	Glu	Arg 60	Leu	Leu	Ala	Glu						
Asn 65	Asn	Glu	Ile	Ile	Ser 70	Asn	Ile	Arg	Asp	Ser 75	Val	Ile	Asn	Leu	Ser 80						
Glu	Ser	Val	Glu	Asp 85	Gly	Pro	Arg	Gly	Ser 90	Pro	Gly	Asn	Ala	Ser 95	Gln						
Gly	Ser	Ile	His 100	Leu	His	Ser	Pro	Gln 105	Leu	Ala	Leu	Gln	Ala 110	Asp	Pro						
Arg	Asp	Cys 115	Leu	Phe	Ala	Ser	Gln 120	Ser	Gly	Ser	Gln	Pro 125	Arg	Asp	Val						
Gln 130	Met	Leu	Asp	Val	Tyr	Asp 135	Leu	Ile	Pro	Phe	Asp 140	Asn	Pro	Asp	Gly						
Gly 145	Val	Trp	Lys	Gln	Gly 150	Phe	Asp	Ile	Lys	Tyr 155	Glu	Ala	Asp	Glu	Trp 160						
Asp	His	Glu	Pro	Leu 165	Gln	Val	Phe	Val	Val 170	Pro	His	Ser	His	Asn 175	Asp						
Pro	Gly	Trp	Leu 180	Lys	Thr	Phe	Asn	Asp 185	Tyr	Phe	Arg	Asp	Lys 190	Thr	Gln						
Tyr	Ile	Phe 195	Asn	Asn	Met	Val	Leu 200	Lys	Leu	Lys	Glu	Asp 205	Ser	Ser	Arg						
Lys 210	Phe	Met	Trp	Ser	Glu	Ile 215	Ser	Tyr	Leu	Ala	Lys 220	Trp	Trp	Asp	Ile						
Ile 225	Asp	Ile	Pro	Lys	Lys 230	Glu	Ala	Val	Lys	Ser 235	Leu	Leu	Gln	Asn	Gly 240						
Gln	Leu	Glu	Ile	Val 245	Thr	Gly	Gly	Trp	Val 250	Met	Pro	Asp	Glu	Ala	Thr 255						
Pro	His	Tyr	Phe 260	Ala	Leu	Ile	Asp	Gln 265	Leu	Ile	Glu	Gly	His 270	Gln	Trp						
Leu	Glu	Lys 275	Asn	Leu	Gly	Val	Lys 280	Pro	Arg	Ser	Gly	Trp 285	Ala	Ile	Asp						

ES 2 734 276 T3

Pro Phe Gly His Ser Pro Thr Met Ala Tyr Leu Leu Lys Arg Ala Gly
 290 295 300

Phe Ser His Met Leu Ile Gln Arg Val His Tyr Ala Ile Lys Lys His
 305 310 315 320

Phe Ser Leu His Lys Thr Leu Glu Phe Phe Trp Arg Gln Asn Trp Asp
 325 330 335

Leu Gly Ser Ala Thr Asp Ile Leu Cys His Met Met Pro Phe Tyr Ser
 340 345 350

Tyr Asp Ile Pro His Thr Cys Gly Pro Asp Pro Lys Ile Cys Cys Gln
 355 360 365

Phe Asp Phe Lys Arg Leu Pro Gly Gly Arg Tyr Gly Cys Pro Trp Gly
 370 375 380

Val Pro Pro Glu Ala Ile Ser Pro Gly Asn Val Gln Ser Arg Ala Gln
 385 390 395 400

Met Leu Leu Asp Gln Tyr Arg Lys Lys Ser Lys Leu Phe Arg Thr Lys
 405 410 415

Val Leu Leu Ala Pro Leu Gly Asp Asp Phe Arg Phe Ser Glu Tyr Thr
 420 425 430

Glu Trp Asp Leu Gln Cys Arg Asn Tyr Glu Gln Leu Phe Ser Tyr Met
 435 440 445

Asn Ser Gln Pro His Leu Lys Val Lys Ile Gln Phe Gly Thr Leu Ser
 450 455 460

Asp Tyr Phe Asp Ala Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Glu Lys Lys Ser
 465 470 475 480

Ser Gln Ser Val Phe Pro Ala Leu Ser Gly Asp Phe Phe Thr Tyr Ala
 485 490 495

Asp Arg Asp Asp His Tyr Trp Ser Gly Tyr Phe Thr Ser Arg Pro Phe
 500 505 510

Tyr Lys Arg Met Asp Arg Ile Met Glu Ser Arg Ile Arg Ala Ala Glu
 515 520 525

ES 2 734 276 T3

Ile Leu Tyr Gln Leu Ala Leu Lys Gln Ala Gln Lys Tyr Lys Ile Asn
 530 535 540

Lys Phe Leu Ser Ser Pro His Tyr Thr Thr Leu Thr Glu Ala Arg Arg
 545 550 555 560

Asn Leu Gly Leu Phe Gln His His Asp Ala Ile Thr Gly Thr Ala Lys
 565 570 575

Asp Trp Val Val Val Asp Tyr Gly Thr Arg Leu Phe Gln Ser Leu Asn
 580 585 590

Ser Leu Glu Lys Ile Ile Gly Asp Ser Ala Phe Leu Leu Ile Leu Lys
 595 600 605

Asp Lys Lys Leu Tyr Gln Ser Asp Pro Ser Lys Ala Phe Leu Glu Met
 610 615 620

Asp Thr Lys Gln Ser Ser Gln Asp Ser Leu Pro Gln Lys Ile Ile Ile
 625 630 635 640

Gln Leu Ser Ala Gln Glu Pro Arg Tyr Leu Val Val Tyr Asn Pro Phe
 645 650 655

Glu Gln Glu Arg His Ser Val Val Ser Ile Arg Val Asn Ser Ala Thr
 660 665 670

Gly Lys Val Leu Ser Asp Ser Gly Lys Pro Val Glu Val Gln Val Ser
 675 680 685

Ala Val Trp Asn Asp Met Arg Thr Ile Ser Gln Ala Ala Tyr Glu Val
 690 695 700

Ser Phe Leu Ala His Ile Pro Pro Leu Gly Leu Lys Val Phe Lys Ile
 705 710 715 720

Leu Glu Ser Gln Ser Ser Ser Ser His Leu Ala Asp Tyr Val Leu Tyr
 725 730 735

Asn Asn Asp Gly Leu Ala Glu Asn Gly Ile Phe His Val Lys Asn Met
 740 745 750

Val Asp Ala Gly Asp Ala Ile Thr Ile Glu Asn Pro Phe Leu Ala Ile
 755 760 765

ES 2 734 276 T3

Trp Phe Asp Arg Ser Gly Leu Met Glu Lys Val Arg Arg Lys Glu Asp
 770 775 780

Ser Arg Gln His Glu Leu Lys Val Gln Phe Leu Trp Tyr Gly Thr Thr
 785 790 795 800

Asn Lys Arg Asp Lys Ser Gly Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asp Gly Gln
 805 810 815

Gly Gln Pro Tyr Val Ser Leu Arg Pro Pro Phe Val Arg Val Thr Arg
 820 825 830

Gly Arg Ile Tyr Ser Asp Val Thr Cys Phe Leu Glu His Val Thr His
 835 840 845

Lys Val Arg Leu Tyr Asn Ile Gln Gly Ile Glu Gly Gln Ser Met Glu
 850 855 860

Val Ser Asn Ile Val Asn Ile Arg Asn Val His Asn Arg Glu Ile Val
 865 870 875 880

Met Arg Ile Ser Ser Lys Ile Asn Asn Gln Asn Arg Tyr Tyr Thr Asp
 885 890 895

Leu Asn Gly Tyr Gln Ile Gln Pro Arg Arg Thr Met Ser Lys Leu Pro
 900 905 910

Leu Gln Ala Asn Val Tyr Pro Met Cys Thr Met Ala Tyr Ile Gln Asp
 915 920 925

Ala Glu His Arg Leu Thr Leu Leu Ser Ala Gln Ser Leu Gly Ala Ser
 930 935 940

Ser Met Ala Ser Gly Gln Ile Glu Val Phe Met Asp Arg Arg Leu Met
 945 950 955 960

Gln Asp Asp Asn Arg Gly Leu Gly Gln Gly Val His Asp Asn Lys Ile
 965 970 975

Thr Ala Asn Leu Phe Arg Ile Leu Leu Glu Lys Arg Ser Ala Val Asn
 980 985 990

Met Glu Glu Glu Lys Lys Ser Pro Val Ser Tyr Pro Ser Leu Leu Ser
 995 1000 1005

His Met Thr Ser Ser Phe Leu Asn His Pro Phe Leu Pro Met Val

ES 2 734 276 T3

1010 1015 1020

Leu Ser Gly Gln Leu Pro Ser Pro Ala Phe Glu Leu Leu Ser Glu
 1025 1030 1035

Phe Pro Leu Leu Gln Ser Ser Leu Pro Cys Asp Ile His Leu Val
 1040 1045 1050

Asn Leu Arg Thr Ile Gln Ser Lys Met Gly Lys Gly Tyr Ser Asp
 1055 1060 1065

Glu Ala Ala Leu Ile Leu His Arg Lys Gly Phe Asp Cys Gln Phe
 1070 1075 1080

Ser Ser Arg Gly Ile Gly Leu Pro Cys Ser Thr Thr Gln Gly Lys
 1085 1090 1095

Met Ser Val Leu Lys Leu Phe Asn Lys Phe Ala Val Glu Ser Leu
 1100 1105 1110

Val Pro Ser Ser Leu Ser Leu Met His Ser Pro Pro Asp Ala Gln
 1115 1120 1125

Asn Met Ser Glu Val Ser Leu Ser Pro Met Glu Ile Ser Thr Phe
 1130 1135 1140

Arg Ile Arg Leu Arg Trp Thr
 1145 1150

<210> 38
 <211> 1144
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 38
 Met Lys Leu Ser Arg Gln Phe Thr Val Phe Gly Ser Ala Ile Phe Cys
 1 5 10 15

Val Val Ile Phe Ser Leu Tyr Leu Met Leu Asp Arg Gly His Leu Asp
 20 25 30

Tyr Pro Arg Asn Pro Arg Arg Glu Gly Ser Phe Pro Gln Gly Gln Leu
 35 40 45

Ser Met Leu Gln Glu Lys Ile Asp His Leu Glu Arg Leu Leu Ala Glu
 50 55 60

10

ES 2 734 276 T3

Asn 65 Asn 66 Glu 67 Ile 68 Ile 69 Ser 70 Asn 71 Ile 72 Arg 73 Asp 74 Ser 75 Val 76 Ile 77 Asn 78 Leu 79 Ser 80
 Glu 81 Ser 82 Val 83 Glu 84 Asp 85 Gly 86 Pro 87 Lys 88 Ser 89 Ser 90 Gln 91 Ser 92 Asn 93 Phe 94 Ser 95 Gln 96
 Gly 97 Ala 98 Gly 99 Ser 100 His 101 Leu 102 Leu 103 Pro 104 Ser 105 Gln 106 Leu 107 Ser 108 Leu 109 Ser 110 Val 111 Asp 112
 Thr 113 Ala 114 Asp 115 Cys 116 Leu 117 Phe 118 Ala 119 Ser 120 Gln 121 Ser 122 Gly 123 Ser 124 His 125 Asn 126 Ser 127 Asp 128
 Val 129 Gln 130 Met 131 Leu 132 Asp 133 Val 134 Tyr 135 Ser 136 Leu 137 Ile 138 Ser 139 Phe 140 Asp 141 Asn 142 Pro 143 Asp 144
 Gly 145 Gly 146 Val 147 Trp 148 Lys 149 Gln 150 Gly 151 Phe 152 Asp 153 Ile 154 Thr 155 Tyr 156 Glu 157 Ser 158 Asn 159 Glu 160
 Trp 161 Asp 162 Thr 163 Glu 164 Pro 165 Leu 166 Gln 167 Val 168 Phe 169 Val 170 Val 171 Pro 172 His 173 Ser 174 His 175 Asn 176
 Asp 177 Pro 178 Gly 179 Trp 180 Leu 181 Lys 182 Thr 183 Phe 184 Asn 185 Asp 186 Tyr 187 Phe 188 Arg 189 Asp 190 Lys 191 Thr 192
 Gln 193 Tyr 194 Ile 195 Phe 196 Asn 197 Asn 198 Met 199 Val 200 Leu 201 Lys 202 Leu 203 Lys 204 Glu 205 Asp 206 Ser 207 Arg 208
 Arg 209 Lys 210 Phe 211 Ile 212 Trp 213 Ser 214 Glu 215 Ile 216 Ser 217 Tyr 218 Leu 219 Ser 220 Lys 221 Trp 222 Trp 223 Asp 224
 Ile 225 Ile 226 Asp 227 Ile 228 Gln 229 Lys 230 Lys 231 Asp 232 Ala 233 Val 234 Lys 235 Ser 236 Leu 237 Ile 238 Glu 239 Asn 240
 Gly 241 Gln 242 Leu 243 Glu 244 Ile 245 Val 246 Thr 247 Gly 248 Gly 249 Trp 250 Val 251 Met 252 Pro 253 Asp 254 Glu 255 Ala 256
 Thr 257 Pro 258 His 259 Tyr 260 Phe 261 Ala 262 Leu 263 Ile 264 Asp 265 Gln 266 Leu 267 Ile 268 Glu 269 Gly 270 His 271 Gln 272
 Trp 273 Leu 274 Glu 275 Asn 276 Asn 277 Ile 278 Gly 279 Val 280 Lys 281 Pro 282 Arg 283 Ser 284 Gly 285 Trp 286 Ala 287 Ile 288
 Asp 289 Pro 290 Phe 291 Gly 292 His 293 Ser 294 Pro 295 Thr 296 Met 297 Ala 298 Tyr 299 Leu 300 Leu 301 Asn 302 Arg 303 Ala 304

ES 2 734 276 T3

Gly Leu Ser His Met Leu Ile Gln Arg Val His Tyr Ala Val Lys Lys
 305 310 315 320

His Phe Ala Leu His Lys Thr Leu Glu Phe Phe Trp Arg Gln Asn Trp
 325 330 335

Asp Leu Gly Ser Val Thr Asp Ile Leu Cys His Met Met Pro Phe Tyr
 340 345 350

Ser Tyr Asp Ile Pro His Thr Cys Gly Pro Asp Pro Lys Ile Cys Cys
 355 360 365

Gln Phe Asp Phe Lys Arg Leu Pro Gly Gly Arg Phe Gly Cys Pro Trp
 370 375 380

Gly Val Pro Pro Glu Thr Ile His Pro Gly Asn Val Gln Ser Arg Ala
 385 390 395 400

Arg Met Leu Leu Asp Gln Tyr Arg Lys Lys Ser Lys Leu Phe Arg Thr
 405 410 415

Lys Val Leu Leu Ala Pro Leu Gly Asp Asp Phe Arg Tyr Cys Glu Tyr
 420 425 430

Thr Glu Trp Asp Leu Gln Phe Lys Asn Tyr Gln Gln Leu Phe Asp Tyr
 435 440 445

Met Asn Ser Gln Ser Lys Phe Lys Val Lys Ile Gln Phe Gly Thr Leu
 450 455 460

Ser Asp Phe Phe Asp Ala Leu Asp Lys Ala Asp Glu Thr Gln Arg Asp
 465 470 475 480

Lys Gly Gln Ser Met Phe Pro Val Leu Ser Gly Asp Phe Phe Thr Tyr
 485 490 495

Ala Asp Arg Asp Asp His Tyr Trp Ser Gly Tyr Phe Thr Ser Arg Pro
 500 505 510

Phe Tyr Lys Arg Met Asp Arg Ile Met Glu Ser His Leu Arg Ala Ala
 515 520 525

Glu Ile Leu Tyr Tyr Phe Ala Leu Arg Gln Ala His Lys Tyr Lys Ile
 530 535 540

Asn Lys Phe Leu Ser Ser Ser Leu Tyr Thr Ala Leu Thr Glu Ala Arg

ES 2 734 276 T3

545	550	555	560
Arg Asn Leu Gly	Leu Phe Gln His His Asp	Ala Ile Thr Gly Thr Ala	
	565	570	575
Lys Asp Trp Val	Val Val Asp Tyr Gly Thr	Arg Leu Phe His Ser Leu	
	580	585	590
Met Val Leu Glu Lys	Ile Ile Gly Asn Ser Ala Phe	Leu Leu Ile Leu	
	595	600	605
Lys Asp Lys Leu Thr	Tyr Asp Ser Tyr Ser Pro Asp	Thr Phe Leu Glu	
	610	615	620
Met Asp Leu Lys Gln	Lys Ser Gln Asp Ser Leu Pro	Gln Lys Asn Ile	
	625	630	635
Ile Arg Leu Ser Ala	Glu Pro Arg Tyr Leu Val Val	Tyr Asn Pro Leu	
	645	650	655
Glu Gln Asp Arg Ile	Ser Leu Val Ser Val Tyr Val	Ser Ser Pro Thr	
	660	665	670
Val Gln Val Phe Ser	Ala Ser Gly Lys Pro Val Glu	Val Gln Val Ser	
	675	680	685
Ala Val Trp Asp Thr	Ala Asn Thr Ile Ser Glu Thr	Ala Tyr Glu Ile	
	690	695	700
Ser Phe Arg Ala His	Ile Pro Pro Leu Gly Leu Lys	Val Tyr Lys Ile	
	705	710	715
Leu Glu Ser Ala Ser	Ser Asn Ser His Leu Ala Asp	Tyr Val Leu Tyr	
	725	730	735
Lys Asn Lys Val Glu	Asp Ser Gly Ile Phe Thr Ile	Lys Asn Met Ile	
	740	745	750
Asn Thr Glu Glu Gly	Ile Thr Leu Glu Asn Ser Phe	Val Leu Leu Arg	
	755	760	765
Phe Asp Gln Thr Gly	Leu Met Lys Gln Met Met Thr	Lys Glu Asp Gly	
	770	775	780
Lys His His Glu Val	Asn Val Gln Phe Ser Trp Tyr	Gly Thr Thr Ile	
	785	790	795
			800

ES 2 734 276 T3

Lys Arg Asp Lys Ser Gly Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asp Gly Asn Ala
805 810 815

Lys Pro Tyr Val Tyr Thr Thr Pro Pro Phe Val Arg Val Thr His Gly
820 825 830

Arg Ile Tyr Ser Glu Val Thr Cys Phe Phe Asp His Val Thr His Arg
835 840 845

Val Arg Leu Tyr His Ile Gln Gly Ile Glu Gly Gln Ser Val Glu Val
850 855 860

Ser Asn Ile Val Asp Ile Arg Lys Val Tyr Asn Arg Glu Ile Ala Met
865 870 875 880

Lys Ile Ser Ser Asp Ile Lys Ser Gln Asn Arg Phe Tyr Thr Asp Leu
885 890 895

Asn Gly Tyr Gln Ile Gln Pro Arg Met Thr Leu Ser Lys Leu Pro Leu
900 905 910

Gln Ala Asn Val Tyr Pro Met Thr Thr Met Ala Tyr Ile Gln Asp Ala
915 920 925

Lys His Arg Leu Thr Leu Leu Ser Ala Gln Ser Leu Gly Val Ser Ser
930 935 940

Leu Asn Ser Gly Gln Ile Glu Val Ile Met Asp Arg Arg Leu Met Gln
945 950 955 960

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

Ala Asn Leu Phe Arg Ile Leu Leu Glu Lys Arg Ser Ala Val Asn Thr
980 985 990

Glu Glu Glu Lys Lys Ser Val Ser Tyr Pro Ser Leu Leu Ser His Ile
995 1000 1005

Thr Ser Ser Leu Met Asn His Pro Val Ile Pro Met Ala Asn Lys
1010 1015 1020

Phe Ser Ser Pro Thr Leu Glu Leu Gln Gly Glu Phe Ser Pro Leu
1025 1030 1035

ES 2 734 276 T3

Gln Ser Ser Leu Pro Cys Asp Ile His Leu Val Asn Leu Arg Thr
 1040 1045 1050

Ile Gln Ser Lys Val Gly Asn Gly His Ser Asn Glu Ala Ala Leu
 1055 1060 1065

Ile Leu His Arg Lys Gly Phe Asp Cys Arg Phe Ser Ser Lys Gly
 1070 1075 1080

Thr Gly Leu Phe Cys Ser Thr Thr Gln Gly Lys Ile Leu Val Gln
 1085 1090 1095

Lys Leu Leu Asn Lys Phe Ile Val Glu Ser Leu Thr Pro Ser Ser
 1100 1105 1110

Leu Ser Leu Met His Ser Pro Pro Gly Thr Gln Asn Ile Ser Glu
 1115 1120 1125

Ile Asn Leu Ser Pro Met Glu Ile Ser Thr Phe Arg Ile Gln Leu
 1130 1135 1140

Arg

<210> 39

<211> 575

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 39

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
 1 5 10 15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
 20 25 30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
 35 40 45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
 50 55 60

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr
 65 70 75 80

Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln

10

ES 2 734 276 T3

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

ES 2 734 276 T3

Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys
340 345 350

Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
355 360 365

Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
370 375 380

His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp
385 390 395 400

Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Thr Leu Leu Lys Glu
405 410 415

Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
420 425 430

Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
435 440 445

Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
450 455 460

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
465 470 475 480

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
500 505 510

His Lys Pro Arg Thr Glu Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
515 520 525

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Ile Asn
530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
565 570 575

<210> 40
<211> 575
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 40

ES 2 734 276 T3

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

ES 2 734 276 T3

210	215	220
His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr 225 230 235 240		
Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu 245 250 255		
Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Ile 260 265 270		
Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val 275 280 285		
Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu 290 295 300		
Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Val Arg Val His 305 310 315 320		
Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile 325 330 335		
Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys 340 345 350		
Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp 355 360 365		
Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val 370 375 380		
His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp 385 390 395 400		
Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ser Leu Leu Lys Glu 405 410 415		
Ala Lys Thr Lys Tyr Pro Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile 420 425 430		
Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg 435 440 445		
Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val 450 455 460		

ES 2 734 276 T3

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
465 470 475 480

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Ile Tyr Ala
500 505 510

His Gln Pro Arg Thr Ala Asp Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
515 520 525

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn
530 535 540

Arg Lys Leu Gly Arg Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
565 570 575

<210> 41

<211> 438

5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 41

Met Lys Pro His Leu Lys Gln Trp Arg Gln Arg Met Leu Phe Gly Ile
1 5 10 15

Phe Val Trp Gly Leu Leu Phe Leu Ala Ile Phe Ile Tyr Phe Thr Asn
20 25 30

Ser Asn Pro Ala Ala Pro Met Pro Ser Ser Phe Ser Phe Leu Glu Arg
35 40 45

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

Leu Gln Glu Pro Ser Leu Pro Arg Ser Leu Asp Ala Ser Lys Val Leu
65 70 75 80

Leu Asp Ser His Pro Glu Asn Pro Phe His Pro Trp Pro Gly Asp Pro
85 90 95

10

ES 2 734 276 T3

Gln Lys Trp Asp Gln Ala Pro Asn Gly Phe Asp Asn Gly Asp Glu Phe
 100 105 110

Phe Thr Ser Gln Val Gly Arg Lys Ser Gln Ser Ala Phe Tyr Pro Glu
 115 120 125

Glu Asp Ser Tyr Phe Phe Val Ala Asp Gln Pro Glu Leu Tyr His His
 130 135 140

Arg Gln Gly Ala Leu Glu Leu Pro Ser Pro Gly Glu Thr Ser Trp Arg
 145 150 155 160

Ser Gly Pro Val Gln Pro Lys Gln Lys Leu Leu His Pro Arg Arg Gly
 165 170 175

Ser Leu Pro Glu Glu Ala Tyr Asp Ser Asp Met Leu Ser Ala Ser Met
 180 185 190

Ser Arg Ala Phe Leu Tyr Arg Leu Trp Lys Gly Ala Val Ser Ser Lys
 195 200 205

Met Leu Asn Pro Arg Leu Gln Lys Ala Met Arg Tyr Tyr Met Ser Phe
 210 215 220

Asn Lys His Gly Val Arg Phe Arg Arg Arg Gly Arg Arg Glu Ala Thr
 225 230 235 240

Arg Thr Gly Pro Glu Leu Leu Cys Glu Met Arg Arg Arg Val Arg Val
 245 250 255

Arg Thr Leu Asp Gly Arg Glu Ala Pro Phe Ser Gly Leu Gly Trp Arg
 260 265 270

Pro Leu Val Pro Gly Val Pro Leu Ser Gln Leu His Pro Arg Gly Leu
 275 280 285

Ser Ser Cys Ala Val Val Met Ser Ala Gly Ala Ile Leu Asn Ser Ser
 290 295 300

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

Ala Pro Thr Arg Gly Tyr Glu Lys Asp Val Gly Asn Lys Thr Thr Val
 325 330 335

Arg Ile Ile Asn Ser Gln Ile Leu Ala Asn Pro Ser His His Phe Ile

ES 2 734 276 T3

340 345 350

Asp Ser Ala Leu Tyr Lys Asp Val Ile Leu Val Ala Trp Asp Pro Ala
 355 360 365

Pro Tyr Ser Ala Asn Leu Asn Leu Trp Tyr Lys Lys Pro Asp Tyr Asn
 370 375 380

Leu Phe Thr Pro Tyr Ile Gln His Arg Arg Lys Tyr Pro Thr Gln Pro
 385 390 395 400

Phe Tyr Ile Leu His Pro Lys Phe Ile Trp Gln Leu Trp Asp Ile Ile
 405 410 415

Gln Glu Asn Thr Arg Glu Lys Ile Gln Pro Asn Pro Pro Ser Ser Gly
 420 425 430

Phe Ile Gly Thr Cys Val
 435

<210> 42
 <211> 406
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42
 Met Ile His Thr Asn Leu Lys Lys Lys Phe Ser Cys Cys Val Leu Val
 1 5 10 15

Phe Leu Leu Phe Ala Val Ile Cys Val Trp Lys Glu Lys Lys Lys Gly
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Asp Ser Phe Lys Leu Gln Thr Lys Glu Phe Gln Val Leu
 35 40 45

Lys Ser Leu Gly Lys Leu Ala Met Gly Ser Asp Ser Gln Ser Val Ser
 50 55 60

Ser Ser Ser Thr Gln Asp Pro His Arg Gly Arg Gln Thr Leu Gly Ser
 65 70 75 80

Leu Arg Gly Leu Ala Lys Ala Lys Pro Glu Ala Ser Phe Gln Val Trp
 85 90 95

Asn Lys Asp Ser Ser Ser Lys Asn Leu Ile Pro Arg Leu Gln Lys Ile
 100 105 110

10

ES 2 734 276 T3

Trp Lys Asn Tyr Leu Ser Met Asn Lys Tyr Lys Val Ser Tyr Lys Gly
 115 120 125

Pro Gly Pro Gly Ile Lys Phe Ser Ala Glu Ala Leu Arg Cys His Leu
 130 135 140

Arg Asp His Val Asn Val Ser Met Val Glu Val Thr Asp Phe Pro Phe
 145 150 155 160

Asn Thr Ser Glu Trp Glu Gly Tyr Leu Pro Lys Glu Ser Ile Arg Thr
 165 170 175

Lys Ala Gly Pro Trp Gly Arg Cys Ala Val Val Ser Ser Ala Gly Ser
 180 185 190

Leu Lys Ser Ser Gln Leu Gly Arg Glu Ile Asp Asp His Asp Ala Val
 195 200 205

Leu Arg Phe Asn Gly Ala Pro Thr Ala Asn Phe Gln Gln Asp Val Gly
 210 215 220

Thr Lys Thr Thr Ile Arg Leu Met Asn Ser Gln Leu Val Thr Thr Glu
 225 230 235 240

Lys Arg Phe Leu Lys Asp Ser Leu Tyr Asn Glu Gly Ile Leu Ile Val
 245 250 255

Trp Asp Pro Ser Val Tyr His Ser Asp Ile Pro Lys Trp Tyr Gln Asn
 260 265 270

Pro Asp Tyr Asn Phe Phe Asn Asn Tyr Lys Thr Tyr Arg Lys Leu His
 275 280 285

Pro Asn Gln Pro Phe Tyr Ile Leu Lys Pro Gln Met Pro Trp Glu Leu
 290 295 300

Trp Asp Ile Leu Gln Glu Ile Ser Pro Glu Glu Ile Gln Pro Asn Pro
 305 310 315 320

Pro Ser Ser Gly Met Leu Gly Ile Ile Ile Met Met Thr Leu Cys Asp
 325 330 335

Gln Val Asp Ile Tyr Glu Phe Leu Pro Ser Lys Arg Lys Thr Asp Val
 340 345 350

ES 2 734 276 T3

Cys Tyr Tyr Tyr Gln Lys Phe Phe Asp Ser Ala Cys Thr Met Gly Ala
 355 360 365

Tyr His Pro Leu Leu Tyr Glu Lys Asn Leu Val Lys His Leu Asn Gln
 370 375 380

Gly Thr Asp Glu Asp Ile Tyr Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Pro Gly
 385 390 395 400

Phe Arg Thr Ile His Cys
 405

<210> 43

<211> 175

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Met Asn Ser Gln Leu Val Thr Thr Glu Lys Arg Phe Leu Lys Asp Ser
 1 5 10 15

Leu Tyr Asn Glu Gly Ile Leu Ile Val Trp Asp Pro Ser Val Tyr His
 20 25 30

Ser Asp Ile Pro Lys Trp Tyr Gln Asn Pro Asp Tyr Asn Phe Phe Asn
 35 40 45

Asn Tyr Lys Thr Tyr Arg Lys Leu His Pro Asn Gln Pro Phe Tyr Ile
 50 55 60

Leu Lys Pro Gln Met Pro Trp Glu Leu Trp Asp Ile Leu Gln Glu Ile
 65 70 75 80

Ser Pro Glu Glu Ile Gln Pro Asn Pro Pro Ser Ser Gly Met Leu Gly
 85 90 95

Ile Ile Ile Met Met Thr Leu Cys Asp Gln Val Asp Ile Tyr Glu Phe
 100 105 110

Leu Pro Ser Lys Arg Lys Thr Asp Val Cys Tyr Tyr Tyr Gln Lys Phe
 115 120 125

Phe Asp Ser Ala Cys Thr Met Gly Ala Tyr His Pro Leu Leu Tyr Glu
 130 135 140

Lys Asn Leu Val Lys His Leu Asn Gln Gly Thr Asp Glu Asp Ile Tyr
 145 150 155 160

10

Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Pro Gly Phe Arg Thr Ile His Cys
 165 170 175

<210> 44

<211> 337

15

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 734 276 T3

<400> 44

```

Met Arg Arg Lys Thr Leu Lys Tyr Leu Thr Phe Phe Leu Leu Phe Ile
1           5           10           15

Phe Leu Thr Ser Phe Val Leu Asn Tyr Ser Asn Thr Gly Val Pro Ser
20           25           30

Ala Trp Phe Pro Lys Gln Met Leu Leu Glu Leu Ser Glu Asn Phe Arg
35           40           45

Arg Phe Ile Lys Ser Gln Pro Cys Thr Cys Arg His Cys Ile Ser Gln
50           55           60

Asp Lys Val Ser Tyr Trp Phe Asp Gln Arg Phe Asn Lys Thr Met Gln
65           70           75           80

Pro Leu Leu Thr Val His Asn Ala Leu Met Glu Glu Asp Thr Tyr Arg
85           90           95

Trp Trp Leu Arg Leu Gln Arg Glu Arg Lys Pro Asn Asn Leu Ser Asp
100          105          110

Thr Val Lys Glu Leu Phe Arg Leu Val Pro Gly Asn Val Asp Pro Met
115          120          125

Leu Asn Lys Arg Leu Val Gly Cys Arg Arg Cys Ala Val Val Gly Asn
130          135          140

Ser Gly Asn Leu Lys Asp Ser Ser Tyr Gly Pro Glu Ile Asp Ser His
145          150          155          160

Asp Phe Val Leu Arg Met Asn Lys Ala Pro Thr Val Gly Phe Glu Ala
165          170          175

Asp Val Gly Ser Arg Thr Thr His His Leu Val Tyr Pro Glu Ser Phe
180          185          190

```

ES 2 734 276 T3

Arg Glu Leu Gly Glu Asn Val Asn Met Val Leu Val Pro Phe Lys Thr
 195 200 205

Thr Asp Leu Gln Trp Val Ile Ser Ala Thr Thr Thr Gly Thr Ile Thr
 210 215 220

His Thr Tyr Val Pro Val Pro Pro Lys Ile Lys Val Lys Gln Glu Lys
 225 230 235 240

Ile Leu Ile Tyr His Pro Ala Phe Ile Lys Tyr Val Phe Asp Asn Trp
 245 250 255

Leu Gln Gly His Gly Arg Tyr Pro Ser Thr Gly Ile Leu Ser Ile Ile
 260 265 270

Phe Ser Ile His Ile Cys Asp Glu Val Asp Leu Tyr Gly Phe Gly Ala
 275 280 285

Asp Ser Lys Gly Asn Trp His His Tyr Trp Glu Asn Asn Pro Ser Ala
 290 295 300

Gly Ala Phe Arg Lys Thr Gly Val His Asp Gly Asp Phe Glu Tyr Asn
 305 310 315 320

Ile Thr Thr Thr Leu Ala Ala Ile Asn Lys Ile Arg Ile Phe Lys Gly
 325 330 335

Arg

<210> 45
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 45
 Met Val Thr Leu Arg Lys Arg Thr Leu Lys Val Leu Thr Phe Leu Val
 1 5 10 15

Leu Phe Ile Phe Leu Thr Ser Phe Phe Leu Asn Tyr Ser His Thr Met
 20 25 30

Val Ala Thr Thr Trp Phe Pro Lys Gln Met Val Leu Glu Leu Ser Glu
 35 40 45

Asn Leu Lys Arg Leu Ile Lys His Arg Pro Cys Thr Cys Thr His Cys
 50 55 60

10

ES 2 734 276 T3

Ile Gly Gln Arg Lys Leu Ser Ala Trp Phe Asp Glu Arg Phe Asn Gln
 65 70 75 80

Thr Met Gln Pro Leu Leu Thr Ala Gln Asn Ala Leu Leu Glu Asp Asp
 85 90 95

Thr Tyr Arg Trp Trp Leu Arg Leu Gln Arg Glu Lys Lys Pro Asn Asn
 100 105 110

Leu Asn Asp Thr Ile Lys Glu Leu Phe Arg Val Val Pro Gly Asn Val
 115 120 125

Asp Pro Met Leu Glu Lys Arg Ser Val Gly Cys Arg Arg Cys Ala Val
 130 135 140

Val Gly Asn Ser Gly Asn Leu Arg Glu Ser Ser Tyr Gly Pro Glu Ile
 145 150 155 160

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

Phe Glu Ala Asp Val Gly Thr Lys Thr Thr His His Leu Val Tyr Pro
 180 185 190

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

Phe Lys Thr Ile Asp Leu Glu Trp Val Val Ser Ala Ile Thr Thr Gly
 210 215 220

Thr Ile Ser His Thr Tyr Ile Pro Val Pro Ala Lys Ile Arg Val Lys
 225 230 235 240

Gln Asp Lys Ile Leu Ile Tyr His Pro Ala Phe Ile Lys Tyr Val Phe
 245 250 255

Asp Asn Trp Leu Gln Gly His Gly Arg Tyr Pro Ser Thr Gly Ile Leu
 260 265 270

Ser Val Ile Phe Ser Met His Val Cys Asp Glu Val Asp Leu Tyr Gly
 275 280 285

Phe Gly Ala Asp Ser Lys Gly Asn Trp His His Tyr Trp Glu Asn Asn
 290 295 300

Pro Ser Ala Gly Ala Phe Arg Lys Thr Gly Val His Asp Ala Asp Phe
 305 310 315 320

Glu Ser Asn Val Thr Ala Thr Leu Ala Ser Ile Asn Lys Ile Arg Ile
 325 330 335

Phe Lys Gly Arg
 340

ES 2 734 276 T3

<210> 46
 <211> 350
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 46
 Met Lys Cys Ser Leu Arg Val Trp Phe Leu Ser Val Ala Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Val Phe Ile Met Ser Leu Leu Phe Thr Tyr Ser His His Ser Met Ala
 20 25 30
 Thr Leu Pro Tyr Leu Asp Ser Gly Ala Leu Asp Gly Thr His Arg Val
 35 40 45
 Lys Leu Val Pro Gly Tyr Ala Gly Leu Gln Arg Leu Ser Lys Glu Arg
 50 55 60
 Leu Ser Gly Lys Ser Cys Ala Cys Arg Arg Cys Met Gly Asp Ala Gly
 65 70 75 80
 Ala Ser Asp Trp Phe Asp Ser His Phe Asp Gly Asn Ile Ser Pro Val
 85 90 95
 Trp Thr Arg Glu Asn Met Asp Leu Pro Pro Asp Val Gln Arg Trp Trp
 100 105 110
 Met Met Leu Gln Pro Gln Phe Lys Ser His Asn Thr Asn Glu Val Leu
 115 120 125
 Glu Lys Leu Phe Gln Ile Val Pro Gly Glu Asn Pro Tyr Arg Phe Arg
 130 135 140
 Asp Pro His Gln Cys Arg Arg Cys Ala Val Val Gly Asn Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 Leu Arg Gly Ser Gly Tyr Gly Gln Asp Val Asp Gly His Asn Phe Ile

ES 2 734 276 T3

165 170 175

Met Arg Met Asn Gln Ala Pro Thr Val Gly Phe Glu Gln Asp Val Gly
180 185 190

Ser Arg Thr Thr His His Phe Met Tyr Pro Glu Ser Ala Lys Asn Leu
195 200 205

Pro Ala Asn Val Ser Phe Val Leu Val Pro Phe Lys Val Leu Asp Leu
210 215 220

Leu Trp Ile Ala Ser Ala Leu Ser Thr Gly Gln Ile Arg Phe Thr Tyr
225 230 235 240

Ala Pro Val Lys Ser Phe Leu Arg Val Asp Lys Glu Lys Val Gln Ile
245 250 255

Tyr Asn Pro Ala Phe Phe Lys Tyr Ile His Asp Arg Trp Thr Glu His
260 265 270

His Gly Arg Tyr Pro Ser Thr Gly Met Leu Val Leu Phe Phe Ala Leu
275 280 285

His Val Cys Asp Glu Val Asn Val Tyr Gly Phe Gly Ala Asp Ser Arg
290 295 300

Gly Asn Trp His His Tyr Trp Glu Asn Asn Arg Tyr Ala Gly Glu Phe
305 310 315 320

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

Met Leu Ala Lys Ala Ser Lys Ile Glu Val Tyr Arg Gly Asn
340 345 350

<210> 47
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 47
 Met Gly Leu Leu Val Phe Val Arg Asn Leu Leu Leu Ala Leu Cys Leu
 1 5 10 15

Phe Leu Val Leu Gly Phe Leu Tyr Tyr Ser Ala Trp Lys Leu His Leu
 20 25 30

10

ES 2 734 276 T3

Leu Gln Trp Glu Glu Asp Ser Ser Lys Tyr Ser His Ser Ser Ser Pro
 35 40 45

Gln Glu Lys Pro Val Ala Asp Ser Val Val Leu Ser Phe Asp Ser Ala
 50 55 60

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

Leu Asp Ser Lys Leu Ser Pro Arg Thr Leu Cys Thr Val Val Phe Gly
 85 90 95

Leu Asp Cys Ile Leu Glu Ser Pro Gly Glu Pro Lys Lys Leu Leu Met
 100 105 110

Pro Ala Ser His Pro Leu Glu Ile Leu Lys Ser Leu Ser Glu Asp Ala
 115 120 125

Ala Phe Ala Leu Gly Phe Leu Lys Leu Pro Arg Pro Ala Glu Leu Ala
 130 135 140

Thr Lys Tyr Ala Asn Phe Ser Glu Gly Ala Cys Lys Pro Gly Tyr Ala
 145 150 155 160

Ser Ala Leu Met Thr Ala Ile Phe Pro Arg Phe Ser Lys Pro Ala Pro
 165 170 175

Met Phe Leu Asp Asp Ser Phe Arg Lys Trp Ala Arg Ile Arg Glu Phe
 180 185 190

Val Pro Pro Phe Gly Ile Lys Gly Gln Asp Asn Leu Ile Lys Ala Ile
 195 200 205

Leu Ser Val Thr Lys Glu Tyr Arg Leu Thr Pro Ala Leu Asp Ser Leu
 210 215 220

Arg Cys Arg Arg Cys Ile Ile Val Gly Asn Gly Gly Val Leu Ala Asn
 225 230 235 240

Lys Ser Leu Gly Ser Arg Ile Asp Asp Tyr Asp Ile Val Val Arg Leu
 245 250 255

Asn Ser Ala Pro Val Lys Gly Phe Glu Lys Asp Val Gly Ser Lys Thr
 260 265 270

ES 2 734 276 T3

Thr Leu Arg Ile Thr Tyr Pro Glu Gly Ala Met Gln Arg Pro Glu Gln
 275 280 285

Tyr Glu Arg Asp Ser Leu Phe Val Leu Ala Gly Phe Lys Trp Gln Asp
 290 295 300

Phe Lys Trp Leu Lys Tyr Ile Val Tyr Lys Glu Arg Val Ser Ala Ser
 305 310 315 320

Asp Gly Phe Trp Lys Ser Val Ala Thr Arg Val Pro Lys Glu Pro Pro
 325 330 335

Glu Ile Arg Ile Leu Asn Pro Tyr Phe Ile Gln Glu Ala Ala Phe Thr
 340 345 350

Leu Ile Gly Leu Pro Phe Asn Asn Gly Leu Met Gly Arg Gly Asn Ile
 355 360 365

Pro Thr Leu Gly Ser Val Ala Val Thr Met Ala Leu His Gly Cys Asp
 370 375 380

Glu Val Ala Val Ala Gly Phe Gly Tyr Asp Met Ser Thr Pro Asn Ala
 385 390 395 400

Pro Leu His Tyr Tyr Glu Thr Val Arg Met Ala Ala Ile Lys Glu Ser
 405 410 415

Trp Thr His Asn Ile Gln Arg Glu Lys Glu Phe Leu Arg Lys Leu Val
 420 425 430

Lys Ala Arg Val Ile Thr Asp Leu Ser Ser Gly Ile
 435 440

<210> 48

<211> 390

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Met Gly Leu Leu Val Phe Val Arg Asn Leu Leu Leu Ala Leu Cys Leu
 1 5 10 15

Phe Leu Val Leu Gly Phe Leu Tyr Tyr Ser Ala Trp Lys Leu His Leu
 20 25 30

Leu Gln Trp Glu Glu Asp Ser Ser Lys Tyr Ser His Ser Ser Ser Pro
 35 40 45

10

ES 2 734 276 T3

Gln Glu Lys Pro Val Ala Asp Ser Val Val Leu Ser Phe Asp Ser Ala
 50 55 60

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

Leu Asp Ser Lys Leu Pro Ala Glu Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Asn Phe
 85 90 95

Ser Glu Gly Ala Cys Lys Pro Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Met Thr Ala
 100 105 110

Ile Phe Pro Arg Phe Ser Lys Pro Ala Pro Met Phe Leu Asp Asp Ser
 115 120 125

Phe Arg Lys Trp Ala Arg Ile Arg Glu Phe Val Pro Pro Phe Gly Ile
 130 135 140

Lys Gly Gln Asp Asn Leu Ile Lys Ala Ile Leu Ser Val Thr Lys Glu
 145 150 155 160

Tyr Arg Leu Thr Pro Ala Leu Asp Ser Leu Arg Cys Arg Arg Cys Ile
 165 170 175

Ile Val Gly Asn Gly Gly Val Leu Ala Asn Lys Ser Leu Gly Ser Arg
 180 185 190

Ile Asp Asp Tyr Asp Ile Val Val Arg Leu Asn Ser Ala Pro Val Lys
 195 200 205

Gly Phe Glu Lys Asp Val Gly Ser Lys Thr Thr Leu Arg Ile Thr Tyr
 210 215 220

Pro Glu Gly Ala Met Gln Arg Pro Glu Gln Tyr Glu Arg Asp Ser Leu
 225 230 235 240

Phe Val Leu Ala Gly Phe Lys Trp Gln Asp Phe Lys Trp Leu Lys Tyr
 245 250 255

Ile Val Tyr Lys Glu Arg Val Ser Ala Ser Asp Gly Phe Trp Lys Ser
 260 265 270

Val Ala Thr Arg Val Pro Lys Glu Pro Pro Glu Ile Arg Ile Leu Asn
 275 280 285

ES 2 734 276 T3

Pro Tyr Phe Ile Gln Glu Ala Ala Phe Thr Leu Ile Gly Leu Pro Phe
 290 295 300

Asn Asn Gly Leu Met Gly Arg Gly Asn Ile Pro Thr Leu Gly Ser Val
 305 310 315 320

Ala Val Thr Met Ala Leu His Gly Cys Asp Glu Val Ala Val Ala Gly
 325 330 335

Phe Gly Tyr Asp Met Ser Thr Pro Asn Ala Pro Leu His Tyr Tyr Glu
 340 345 350

Thr Val Arg Met Ala Ala Ile Lys Glu Ser Trp Thr His Asn Ile Gln
 355 360 365

Arg Glu Lys Glu Phe Leu Arg Lys Leu Val Lys Ala Arg Val Ile Thr
 370 375 380

Asp Leu Ser Ser Gly Ile
 385 390

<210> 49
 <211> 170
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 49
 Met Gly Leu Leu Val Phe Val Arg Asn Leu Leu Leu Ala Leu Cys Leu
 1 5 10 15

Phe Leu Val Leu Gly Phe Leu Tyr Tyr Ser Ala Trp Lys Leu His Leu
 20 25 30

Leu Gln Trp Glu Glu Asp Ser Ser Lys Tyr Ser His Ser Ser Ser Pro
 35 40 45

Gln Glu Lys Pro Val Ala Asp Ser Val Val Leu Ser Phe Asp Ser Ala
 50 55 60

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

Leu Asp Ser Lys Leu Pro Ala Glu Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Asn Phe
 85 90 95

Ser Glu Gly Ala Cys Lys Pro Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Met Thr Ala

10

ES 2 734 276 T3

100

105

110

Ile Phe Pro Arg Phe Ser Lys Pro Ala Pro Met Phe Leu Asp Asp Ser
 115 120 125

Phe Arg Lys Trp Ala Arg Ile Arg Glu Phe Val Pro Pro Phe Gly Ile
 130 135 140

Lys Gly Gln Val Leu Asp Ala Gln Tyr Pro Ala Arg Glu Arg Val Ser
 145 150 155 160

Ala Glu Ala Gly Glu Ser Ser Arg His His
 165 170

<210> 50

<211> 429

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Met Gly Leu Leu Val Phe Val Arg Asn Leu Leu Leu Ala Leu Cys Leu
 1 5 10 15

Phe Leu Val Leu Gly Phe Leu Tyr Tyr Ser Ala Trp Lys Leu His Leu
 20 25 30

Leu Gln Trp Glu Glu Asp Ser Asn Ser Val Val Leu Ser Phe Asp Ser
 35 40 45

Ala Gly Gln Thr Leu Gly Ser Glu Tyr Asp Arg Leu Gly Phe Leu Leu
 50 55 60

Asn Leu Asp Ser Lys Leu Ser Pro Arg Thr Leu Cys Thr Val Val Phe
 65 70 75 80

Gly Leu Asp Cys Ile Leu Glu Ser Pro Gly Glu Pro Lys Lys Leu Leu
 85 90 95

Met Pro Ala Ser His Pro Leu Glu Ile Leu Lys Ser Leu Ser Glu Asp
 100 105 110

Ala Ala Phe Ala Leu Gly Phe Leu Lys Leu Pro Arg Pro Ala Glu Leu
 115 120 125

Ala Thr Lys Tyr Ala Asn Phe Ser Glu Gly Ala Cys Lys Pro Gly Tyr
 130 135 140

10

ES 2 734 276 T3

Ala Ser Ala Leu Met Thr Ala Ile Phe Pro Arg Phe Ser Lys Pro Ala
145 150 155 160

Pro Met Phe Leu Asp Asp Ser Phe Arg Lys Trp Ala Arg Ile Arg Glu
165 170 175

Phe Val Pro Pro Phe Gly Ile Lys Gly Gln Asp Asn Leu Ile Lys Ala
180 185 190

Ile Leu Ser Val Thr Lys Glu Tyr Arg Leu Thr Pro Ala Leu Asp Ser
195 200 205

Leu Arg Cys Arg Arg Cys Ile Ile Val Gly Asn Gly Gly Val Leu Ala
210 215 220

Asn Lys Ser Leu Gly Ser Arg Ile Asp Asp Tyr Asp Ile Val Val Arg
225 230 235 240

Leu Asn Ser Ala Pro Val Lys Gly Phe Glu Lys Asp Val Gly Ser Lys
245 250 255

Thr Thr Leu Arg Ile Thr Tyr Pro Glu Gly Ala Met Gln Arg Pro Glu
260 265 270

Gln Tyr Glu Arg Asp Ser Leu Phe Val Leu Ala Gly Phe Lys Trp Gln
275 280 285

Asp Phe Lys Trp Leu Lys Tyr Ile Val Tyr Lys Glu Arg Val Ser Ala
290 295 300

Ser Asp Gly Phe Trp Lys Ser Val Ala Thr Arg Val Pro Lys Glu Pro
305 310 315 320

Pro Glu Ile Arg Ile Leu Asn Pro Tyr Phe Ile Gln Glu Ala Ala Phe
325 330 335

Thr Leu Ile Gly Leu Pro Phe Asn Asn Gly Leu Met Gly Arg Gly Asn
340 345 350

Ile Pro Thr Leu Gly Ser Val Ala Val Thr Met Ala Leu His Gly Cys
355 360 365

Asp Glu Val Ala Val Ala Gly Phe Gly Tyr Asp Met Ser Thr Pro Asn
370 375 380

Ala Pro Leu His Tyr Tyr Glu Thr Val Arg Met Ala Ala Ile Lys Glu
385 390 395 400

Ser Trp Thr His Asn Ile Gln Arg Glu Lys Glu Phe Leu Arg Lys Leu
405 410 415

Val Lys Ala Arg Val Ile Thr Asp Leu Ser Ser Gly Ile
420 425

ES 2 734 276 T3

<210> 51
 <211> 375
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 51
 Met Gly Leu Leu Val Phe Val Arg Asn Leu Leu Leu Ala Leu Cys Leu
 1 5 10 15
 Phe Leu Val Leu Gly Phe Leu Tyr Tyr Ser Ala Trp Lys Leu His Leu
 20 25 30
 Leu Gln Trp Glu Glu Asp Ser Asn Ser Val Val Leu Ser Phe Asp Ser
 35 40 45
 Ala Gly Gln Thr Leu Gly Ser Glu Tyr Asp Arg Leu Gly Phe Leu Leu
 50 55 60
 Asn Leu Asp Ser Lys Leu Pro Ala Glu Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Asn
 65 70 75 80
 Phe Ser Glu Gly Ala Cys Lys Pro Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Met Thr
 85 90 95
 Ala Ile Phe Pro Arg Phe Ser Lys Pro Ala Pro Met Phe Leu Asp Asp
 100 105 110
 Ser Phe Arg Lys Trp Ala Arg Ile Arg Glu Phe Val Pro Pro Phe Gly
 115 120 125
 Ile Lys Gly Gln Asp Asn Leu Ile Lys Ala Ile Leu Ser Val Thr Lys
 130 135 140
 Glu Tyr Arg Leu Thr Pro Ala Leu Asp Ser Leu Arg Cys Arg Arg Cys
 145 150 155 160
 Ile Ile Val Gly Asn Gly Gly Val Leu Ala Asn Lys Ser Leu Gly Ser
 165 170 175

ES 2 734 276 T3

Arg Ile Asp Asp Tyr Asp Ile Val Val Arg Leu Asn Ser Ala Pro Val
 180 185 190

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

Tyr Pro Glu Gly Ala Met Gln Arg Pro Glu Gln Tyr Glu Arg Asp Ser
 210 215 220

Leu Phe Val Leu Ala Gly Phe Lys Trp Gln Asp Phe Lys Trp Leu Lys
 225 230 235 240

Tyr Ile Val Tyr Lys Glu Arg Val Ser Ala Ser Asp Gly Phe Trp Lys
 245 250 255

Ser Val Ala Thr Arg Val Pro Lys Glu Pro Pro Glu Ile Arg Ile Leu
 260 265 270

Asn Pro Tyr Phe Ile Gln Glu Ala Ala Phe Thr Leu Ile Gly Leu Pro
 275 280 285

Phe Asn Asn Gly Leu Met Gly Arg Gly Asn Ile Pro Thr Leu Gly Ser
 290 295 300

Val Ala Val Thr Met Ala Leu His Gly Cys Asp Glu Val Ala Val Ala
 305 310 315 320

Gly Phe Gly Tyr Asp Met Ser Thr Pro Asn Ala Pro Leu His Tyr Tyr
 325 330 335

Glu Thr Val Arg Met Ala Ala Ile Lys Glu Ser Trp Thr His Asn Ile
 340 345 350

Gln Arg Glu Lys Glu Phe Leu Arg Lys Leu Val Lys Ala Arg Val Ile
 355 360 365

Thr Asp Leu Ser Ser Gly Ile
 370 375

<210> 52

<211> 277

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

ES 2 734 276 T3

Met Gly Leu Leu Val Phe Val Arg Asn Leu Leu Leu Ala Leu Cys Leu
 1 5 10 15

Phe Leu Val Leu Gly Phe Leu Tyr Tyr Ser Ala Trp Lys Leu His Leu
 20 25 30

Leu Gln Trp Glu Glu Asp Ser Asn Ser Val Val Leu Ser Phe Asp Ser
 35 40 45

Ala Gly Gln Thr Leu Gly Ser Glu Tyr Asp Arg Leu Gly Phe Leu Leu
 50 55 60

Asn Leu Asp Ser Lys Leu Pro Ala Glu Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Asn
 65 70 75 80

Phe Ser Glu Gly Ala Cys Lys Pro Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Met Thr
 85 90 95

Ala Ile Phe Pro Arg Phe Ser Lys Pro Ala Pro Met Phe Leu Asp Asp
 100 105 110

Ser Phe Arg Lys Trp Ala Arg Ile Arg Glu Phe Val Pro Pro Phe Gly
 115 120 125

Ile Lys Gly Gln Asp Asn Leu Ile Lys Ala Ile Leu Ser Val Thr Lys
 130 135 140

Glu Tyr Arg Leu Thr Pro Ala Leu Asp Ser Leu Arg Cys Arg Arg Cys
 145 150 155 160

Ile Ile Val Gly Asn Gly Gly Val Leu Ala Asn Lys Ser Leu Gly Ser
 165 170 175

Arg Ile Asp Asp Tyr Asp Ile Val Val Arg Leu Asn Ser Ala Pro Val
 180 185 190

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

Tyr Pro Glu Gly Ala Met Gln Arg Pro Glu Gln Tyr Glu Arg Asp Ser
 210 215 220

Leu Phe Val Leu Ala Gly Phe Lys Trp Gln Asp Phe Lys Trp Leu Lys
 225 230 235 240

Tyr Ile Val Tyr Lys Glu Arg Val Ser Trp Thr His Asn Ile Gln Arg
 245 250 255

Glu Lys Glu Phe Leu Arg Lys Leu Val Lys Ala Arg Val Ile Thr Asp
 260 265 270

Leu Ser Ser Gly Ile
 275

ES 2 734 276 T3

<210> 53
 <211> 155
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 53
 Met Gly Leu Leu Val Phe Val Arg Asn Leu Leu Leu Ala Leu Cys Leu
 1 5 10 15
 Phe Leu Val Leu Gly Phe Leu Tyr Tyr Ser Ala Trp Lys Leu His Leu
 20 25 30
 Leu Gln Trp Glu Glu Asp Ser Asn Ser Val Val Leu Ser Phe Asp Ser
 35 40 45
 Ala Gly Gln Thr Leu Gly Ser Glu Tyr Asp Arg Leu Gly Phe Leu Leu
 50 55 60
 Asn Leu Asp Ser Lys Leu Pro Ala Glu Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Asn
 65 70 75 80
 Phe Ser Glu Gly Ala Cys Lys Pro Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Met Thr
 85 90 95
 Ala Ile Phe Pro Arg Phe Ser Lys Pro Ala Pro Met Phe Leu Asp Asp
 100 105 110
 Ser Phe Arg Lys Trp Ala Arg Ile Arg Glu Phe Val Pro Pro Phe Gly
 115 120 125
 Ile Lys Gly Gln Val Leu Asp Ala Gln Tyr Pro Ala Arg Glu Arg Val
 130 135 140
 Ser Ala Glu Ala Gly Glu Ser Ser Arg His His
 145 150 155

10

<210> 54
 <211> 413
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 54

ES 2 734 276 T3

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

ES 2 734 276 T3

Leu Gln Trp Glu Glu Asp Ser Lys Tyr Asp Arg Leu Gly Phe Leu Leu
 35 40 45

Asn Leu Asp Ser Lys Leu Pro Ala Glu Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Asn
 50 55 60

Phe Ser Glu Gly Ala Cys Lys Pro Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Met Thr
 65 70 75 80

Ala Ile Phe Pro Arg Phe Ser Lys Pro Ala Pro Met Phe Leu Asp Asp
 85 90 95

Ser Phe Arg Lys Trp Ala Arg Ile Arg Glu Phe Val Pro Pro Phe Gly
 100 105 110

Ile Lys Gly Gln Asp Asn Leu Ile Lys Ala Ile Leu Ser Val Thr Lys
 115 120 125

Glu Tyr Arg Leu Thr Pro Ala Leu Asp Ser Leu Arg Cys Arg Arg Cys
 130 135 140

Ile Ile Val Gly Asn Gly Gly Val Leu Ala Asn Lys Ser Leu Gly Ser
 145 150 155 160

Arg Ile Asp Asp Tyr Asp Ile Val Val Arg Leu Asn Ser Ala Pro Val
 165 170 175

Lys Gly Phe Glu Lys Asp Val Gly Ser Lys Thr Thr Leu Arg Ile Thr
 180 185 190

Tyr Pro Glu Gly Ala Met Gln Arg Pro Glu Gln Tyr Glu Arg Asp Ser
 195 200 205

Leu Phe Val Leu Ala Gly Phe Lys Trp Gln Asp Phe Lys Trp Leu Lys
 210 215 220

Tyr Ile Val Tyr Lys Glu Arg Val Ser Ala Ser Asp Gly Phe Trp Lys
 225 230 235 240

Ser Val Ala Thr Arg Val Pro Lys Glu Pro Pro Glu Ile Arg Ile Leu
 245 250 255

Asn Pro Tyr Phe Ile Gln Glu Ala Ala Phe Thr Leu Ile Gly Leu Pro
 260 265 270

ES 2 734 276 T3

Phe Asn Asn Gly Leu Met Gly Arg Gly Asn Ile Pro Thr Leu Gly Ser
 275 280 285

Val Ala Val Thr Met Ala Leu His Gly Cys Asp Glu Val Ala Val Ala
 290 295 300

Gly Phe Gly Tyr Asp Met Ser Thr Pro Asn Ala Pro Leu His Tyr Tyr
 305 310 315 320

Glu Thr Val Arg Met Ala Ala Ile Lys Glu Ser Trp Thr His Asn Ile
 325 330 335

Gln Arg Glu Lys Glu Phe Leu Arg Lys Leu Val Lys Ala Arg Val Ile
 340 345 350

Thr Asp Leu Ser Ser Gly Ile
 355

<210> 56
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 56
 Met Gly Leu Leu Val Phe Val Arg Asn Leu Leu Leu Ala Leu Cys Leu
 1 5 10 15

Phe Leu Val Leu Gly Phe Leu Tyr Tyr Ser Ala Trp Lys Leu His Leu
 20 25 30

Leu Gln Trp Glu Glu Asp Ser Lys Tyr Asp Arg Leu Gly Phe Leu Leu
 35 40 45

Asn Leu Asp Ser Lys Leu Pro Ala Glu Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Asn
 50 55 60

Phe Ser Glu Gly Ala Cys Lys Pro Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Met Thr
 65 70 75 80

Ala Ile Phe Pro Arg Phe Ser Lys Pro Ala Pro Met Phe Leu Asp Asp
 85 90 95

Ser Phe Arg Lys Trp Ala Arg Ile Arg Glu Phe Val Pro Pro Phe Gly
 100 105 110

Ile Lys Gly Gln Val Leu Asp Ala Gln Tyr Pro Ala Arg Glu Arg Val
 115 120 125

10

Ser Ala Glu Ala Gly Glu Ser Ser Arg His His
 130 135

<210> 57
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

ES 2 734 276 T3

<400> 57

```

Met Arg Gly Tyr Leu Val Ala Ile Phe Leu Ser Ala Val Phe Leu Tyr
1           5           10           15

Tyr Val Leu His Cys Ile Leu Trp Gly Thr Asn Val Tyr Trp Val Ala
20           25           30

Pro Val Glu Met Lys Arg Arg Asn Lys Ile Gln Pro Cys Leu Ser Lys
35           40           45

Pro Ala Phe Ala Ser Leu Leu Arg Phe His Gln Phe His Pro Phe Leu
50           55           60

Cys Ala Ala Asp Phe Arg Lys Ile Ala Ser Leu Tyr Gly Ser Asp Lys
65           70           75           80

Phe Asp Leu Pro Tyr Gly Met Arg Thr Ser Ala Glu Tyr Phe Arg Leu
85           90           95

Ala Leu Ser Lys Leu Gln Ser Cys Asp Leu Phe Asp Glu Phe Asp Asn
100          105          110

Ile Pro Cys Lys Lys Cys Val Val Val Gly Asn Gly Gly Val Leu Lys
115          120          125

Asn Lys Thr Leu Gly Glu Lys Ile Asp Ser Tyr Asp Val Ile Ile Arg
130          135          140

Met Asn Asn Gly Pro Val Leu Gly His Glu Glu Glu Val Gly Arg Arg
145          150          155          160

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

His Asn Asp Pro Asn Thr Thr Val Ile Leu Thr Ala Phe Lys Pro His
180          185          190

```

ES 2 734 276 T3

Asp Leu Arg Trp Leu Leu Glu Leu Leu Met Gly Asp Lys Ile Asn Thr
 195 200 205

Asn Gly Phe Trp Lys Lys Pro Ala Leu Asn Leu Ile Tyr Lys Pro Tyr
 210 215 220

Gln Ile Arg Ile Leu Asp Pro Phe Ile Ile Arg Thr Ala Ala Tyr Glu
 225 230 235 240

Leu Leu His Phe Pro Lys Val Phe Pro Lys Asn Gln Lys Pro Lys His
 245 250 255

Pro Thr Thr Gly Ile Ile Ala Ile Thr Leu Ala Phe Tyr Ile Cys His
 260 265 270

Glu Val His Leu Ala Gly Phe Lys Tyr Asn Phe Ser Asp Leu Lys Ser
 275 280 285

Pro Leu His Tyr Tyr Gly Asn Ala Thr Met Ser Leu Met Asn Lys Asn
 290 295 300

Ala Tyr His Asn Val Thr Ala Glu Gln Leu Phe Leu Lys Asp Ile Ile
 305 310 315 320

Glu Lys Asn Leu Val Ile Asn Leu Thr Gln Asp
 325 330

<210> 58

<211> 722

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 58

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

Cys Asn Arg Ala Asp Tyr Ser Lys Leu Ala Pro Ile Met Phe Gly Ile
 20 25 30

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

His Leu Ile Asp Asp Tyr Gly Asn Thr Tyr Arg Met Ile Glu Gln Asp
 50 55 60

Asp Phe Asp Ile Asn Thr Arg Leu His Thr Ile Val Arg Gly Glu Asp
 65 70 75 80

10

ES 2 734 276 T3

Glu Ala Ala Met Val Glu Ser Val Gly Leu Ala Leu Val Lys Leu Pro
 85 90 95

Asp Val Leu Asn Arg Leu Lys Pro Asp Ile Met Ile Val His Gly Asp
 100 105 110

Arg Phe Asp Ala Leu Ala Leu Ala Thr Ser Ala Ala Leu Met Asn Ile
 115 120 125

Arg Ile Leu His Ile Glu Gly Gly Glu Val Ser Gly Thr Ile Asp Asp
 130 135 140

Ser Ile Arg His Ala Ile Thr Lys Leu Ala His Tyr His Val Cys Cys
 145 150 155 160

Thr Arg Ser Ala Glu Gln His Leu Ile Ser Met Cys Glu Asp His Asp
 165 170 175

Arg Ile Leu Leu Ala Gly Cys Pro Ser Tyr Asp Lys Leu Leu Ser Ala
 180 185 190

Lys Asn Lys Asp Tyr Met Ser Ile Ile Arg Met Trp Leu Gly Asp Asp
 195 200 205

Val Lys Cys Lys Asp Tyr Ile Val Ala Leu Gln His Pro Val Thr Thr
 210 215 220

Asp Ile Lys His Ser Ile Lys Met Phe Glu Leu Thr Leu Asp Ala Leu
 225 230 235 240

Ile Ser Phe Asn Lys Arg Thr Leu Val Leu Phe Pro Asn Ile Asp Ala
 245 250 255

Gly Ser Lys Glu Met Val Arg Val Met Arg Lys Lys Gly Ile Glu His
 260 265 270

His Pro Asn Phe Arg Ala Val Lys His Val Pro Phe Asp Gln Phe Ile
 275 280 285

Gln Leu Val Ala His Ala Gly Cys Met Ile Gly Asn Ser Ser Cys Gly
 290 295 300

Val Arg Glu Val Gly Ala Phe Gly Thr Pro Val Ile Asn Leu Gly Thr
 305 310 315 320

ES 2 734 276 T3

Arg Gln Ile Gly Arg Glu Thr Gly Glu Asn Val Leu His Val Arg Asp
 325 330 335

Ala Asp Thr Gln Asp Lys Ile Leu Gln Ala Leu His Leu Gln Phe Gly
 340 345 350

Lys Gln Tyr Pro Cys Ser Lys Ile Tyr Gly Asp Gly Asn Ala Val Pro
 355 360 365

Arg Ile Leu Lys Phe Leu Lys Ser Ile Asp Leu Gln Glu Pro Leu Gln
 370 375 380

Lys Lys Phe Cys Phe Pro Pro Val Lys Glu Asn Ile Ser Gln Asp Ile
 385 390 395 400

Asp His Ile Leu Glu Thr Leu Ser Ala Leu Ala Val Asp Leu Gly Gly
 405 410 415

Thr Asn Leu Arg Val Ala Ile Val Ser Met Lys Gly Glu Ile Val Lys
 420 425 430

Lys Tyr Thr Gln Phe Asn Pro Lys Thr Tyr Glu Glu Arg Ile Ser Leu
 435 440 445

Ile Leu Gln Met Cys Val Glu Ala Ala Ala Glu Ala Val Lys Leu Asn
 450 455 460

Cys Arg Ile Leu Gly Val Gly Ile Ser Thr Gly Gly Arg Val Asn Pro
 465 470 475 480

Gln Glu Gly Val Val Leu His Ser Thr Lys Leu Ile Gln Glu Trp Asn
 485 490 495

Ser Val Asp Leu Arg Thr Pro Leu Ser Asp Thr Leu His Leu Pro Val
 500 505 510

Trp Val Asp Asn Asp Gly Asn Cys Ala Ala Met Ala Glu Arg Lys Phe
 515 520 525

Gly Gln Gly Lys Gly Gln Glu Asn Phe Val Thr Leu Ile Thr Gly Thr
 530 535 540

Gly Ile Gly Gly Gly Ile Ile His Gln His Glu Leu Ile His Gly Ser
 545 550 555 560

ES 2 734 276 T3

His Leu Ile Asp Asp Tyr Gly Asn Thr Tyr Arg Met Ile Glu Gln Asp
 50 55 60

Asp Phe Asp Ile Asn Thr Arg Leu His Thr Ile Val Arg Gly Glu Asp
 65 70 75 80

Glu Ala Ala Met Val Glu Ser Val Gly Leu Ala Leu Val Lys Leu Pro
 85 90 95

Asp Val Leu Asn Arg Leu Lys Pro Asp Ile Met Ile Val His Gly Asp
 100 105 110

Arg Phe Asp Ala Leu Ala Leu Ala Thr Ser Ala Ala Leu Met Asn Ile
 115 120 125

Arg Ile Leu His Ile Glu Gly Gly Glu Val Ser Gly Thr Ile Asp Asp
 130 135 140

Ser Ile Arg His Ala Ile Thr Lys Leu Ala His Tyr His Val Cys Cys
 145 150 155 160

Thr Arg Ser Ala Glu Gln His Leu Ile Ser Met Cys Glu Asp His Asp
 165 170 175

Arg Ile Leu Leu Ala Gly Cys Pro Ser Tyr Asp Lys Leu Leu Ser Ala
 180 185 190

Lys Asn Lys Asp Tyr Met Ser Ile Ile Arg Met Trp Leu Gly Asp Asp
 195 200 205

Val Lys Ser Lys Asp Tyr Ile Val Ala Leu Gln His Pro Val Thr Thr
 210 215 220

Asp Ile Lys His Ser Ile Lys Met Phe Glu Leu Thr Leu Asp Ala Leu
 225 230 235 240

Ile Ser Phe Asn Lys Arg Thr Leu Val Leu Phe Pro Asn Ile Asp Ala
 245 250 255

Gly Ser Lys Glu Met Val Arg Val Met Arg Lys Lys Gly Ile Glu His
 260 265 270

His Pro Asn Phe Arg Ala Val Lys His Val Pro Phe Asp Gln Phe Ile
 275 280 285

ES 2 734 276 T3

Gln Leu Val Ala His Ala Gly Cys Met Ile Gly Asn Ser Ser Cys Gly
 290 295 300

Val Arg Glu Val Gly Ala Phe Gly Thr Pro Val Ile Asn Leu Gly Thr
 305 310 315 320

Arg Gln Ile Gly Arg Glu Thr Gly Glu Asn Val Leu His Val Arg Asp
 325 330 335

Ala Asp Thr Gln Asp Lys Ile Leu Gln Ala Leu His Leu Gln Phe Gly
 340 345 350

Lys Gln Tyr Pro Cys Ser Lys Ile Tyr Gly Asp Gly Asn Ala Val Pro
 355 360 365

Arg Ile Leu Lys Phe Leu Lys Ser Ile Asp Leu Gln Glu Pro Leu Gln
 370 375 380

Lys Lys Phe Cys Phe Pro Pro Val Lys Glu Asn Ile Ser Gln Asp Ile
 385 390 395 400

Asp His Ile Leu Glu Thr Leu Ser Ala Leu Ala Val Asp Leu Gly Gly
 405 410 415

Thr Asn Leu Arg Val Ala Ile Val Ser Met Lys Gly Glu Ile Val Lys
 420 425 430

Lys Tyr Thr Gln Phe Asn Pro Lys Thr Tyr Glu Glu Arg Ile Asn Leu
 435 440 445

Ile Leu Gln Met Cys Val Glu Ala Ala Ala Glu Ala Val Lys Leu Asn
 450 455 460

Cys Arg Ile Leu Gly Val Gly Ile Ser Thr Gly Gly Arg Val Asn Pro
 465 470 475 480

Arg Glu Gly Ile Val Leu His Ser Thr Lys Leu Ile Gln Glu Trp Asn
 485 490 495

Ser Val Asp Leu Arg Thr Pro Leu Ser Asp Thr Leu His Leu Pro Val
 500 505 510

Trp Val Asp Asn Asp Gly Asn Cys Ala Ala Leu Ala Glu Arg Lys Phe
 515 520 525

ES 2 734 276 T3

Gly Gln Gly Lys Gly Leu Glu Asn Phe Val Thr Leu Ile Thr Gly Thr
 530 535 540

Gly Ile Gly Gly Gly Ile Ile His Gln His Glu Leu Ile His Gly Ser
 545 550 555 560

Ser Phe Cys Ala Ala Glu Leu Gly His Leu Val Val Ser Leu Asp Gly
 565 570 575

Pro Asp Cys Ser Cys Gly Ser His Gly Cys Ile Glu Ala Tyr Ala Ser
 580 585 590

Gly Met Ala Leu Gln Arg Glu Ala Lys Lys Leu His Asp Glu Asp Leu
 595 600 605

Leu Leu Val Glu Gly Met Ser Val Pro Lys Asp Glu Ala Val Gly Ala
 610 615 620

Leu His Leu Ile Gln Ala Ala Lys Leu Gly Asn Ala Lys Ala Gln Ser
 625 630 635 640

Ile Leu Arg Thr Ala Gly Thr Ala Leu Gly Leu Gly Val Val Asn Ile
 645 650 655

Leu His Thr Met Asn Pro Ser Leu Val Ile Leu Ser Gly Val Leu Ala
 660 665 670

Ser His Tyr Ile His Ile Val Lys Asp Val Ile Arg Gln Gln Ala Leu
 675 680 685

Ser Ser Val Gln Asp Val Asp Val Val Val Ser Asp Leu Val Asp Pro
 690 695 700

Ala Leu Leu Gly Ala Ala Ser Met Val Leu Asp Tyr Thr Thr Arg Arg
 705 710 715 720

Ile Tyr

<210> 60

<211> 427

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Met Ser Lys Gly Leu Pro Ala Arg Gln Asp Met Glu Lys Glu Arg Glu
 1 5 10 15

10

ES 2 734 276 T3

Thr Leu Gln Ala Trp Lys Glu Arg Val Gly Gln Glu Leu Asp Arg Val
 20 25 30

Val Ala Phe Trp Met Glu His Ser His Asp Gln Glu His Gly Gly Phe
 35 40 45

Phe Thr Cys Leu Gly Arg Glu Gly Arg Val Tyr Asp Asp Leu Lys Tyr
 50 55 60

Val Trp Leu Gln Gly Arg Gln Val Trp Met Tyr Cys Arg Leu Tyr Arg
 65 70 75 80

Thr Phe Glu Arg Phe Arg His Ala Gln Leu Leu Asp Ala Ala Lys Ala
 85 90 95

Gly Gly Glu Phe Leu Leu Arg Tyr Ala Arg Val Ala Pro Pro Gly Lys
 100 105 110

Lys Cys Ala Phe Val Leu Thr Arg Asp Gly Arg Pro Val Lys Val Gln
 115 120 125

Arg Thr Ile Phe Ser Glu Cys Phe Tyr Thr Met Ala Met Asn Glu Leu
 130 135 140

Trp Arg Ala Thr Gly Glu Val Arg Tyr Gln Thr Glu Ala Val Glu Met
 145 150 155 160

Met Asp Gln Ile Val His Trp Val Gln Glu Asp Ala Ser Gly Leu Gly
 165 170 175

Arg Pro Gln Leu Gln Gly Ala Pro Ala Ala Glu Pro Met Ala Val Pro
 180 185 190

Met Met Leu Leu Asn Leu Val Glu Gln Leu Gly Glu Ala Asp Glu Glu
 195 200 205

Leu Ala Gly Lys Tyr Ala Glu Leu Gly Asp Trp Cys Ala Arg Arg Ile
 210 215 220

Leu Gln His Val Gln Arg Asp Gly Gln Ala Val Leu Glu Asn Val Ser
 225 230 235 240

Glu Gly Gly Lys Glu Leu Pro Gly Cys Leu Gly Arg Gln Gln Asn Pro
 245 250 255

ES 2 734 276 T3

Gly His Thr Leu Glu Ala Gly Trp Phe Leu Leu Arg His Cys Ile Arg
260 265 270

Lys Gly Asp Pro Glu Leu Arg Ala His Val Ile Asp Lys Phe Leu Leu
275 280 285

Leu Pro Phe His Ser Gly Trp Asp Pro Asp His Gly Gly Leu Phe Tyr
290 295 300

Phe Gln Asp Ala Asp Asn Phe Cys Pro Thr Gln Leu Glu Trp Ala Met
305 310 315 320

Lys Leu Trp Trp Pro His Ser Glu Ala Met Ile Ala Phe Leu Met Gly
325 330 335

Tyr Ser Asp Ser Gly Asp Pro Val Leu Leu Arg Leu Phe Tyr Gln Val
340 345 350

Ala Glu Tyr Thr Phe Arg Gln Phe Arg Asp Pro Glu Tyr Gly Glu Trp
355 360 365

Phe Gly Tyr Leu Ser Arg Glu Gly Lys Val Ala Leu Ser Ile Lys Gly
370 375 380

Gly Pro Phe Lys Gly Cys Phe His Val Pro Arg Cys Leu Ala Met Cys
385 390 395 400

Glu Glu Met Leu Gly Ala Leu Leu Ser Arg Pro Ala Pro Ala Pro Ser
405 410 415

Pro Ala Pro Thr Pro Ala Cys Arg Gly Ala Glu
420 425

<210> 61

<211> 358

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Pro Leu Glu Leu Glu Leu Cys Pro Gly Arg Trp Val Gly Gly Gln His
1 5 10 15

Pro Cys Phe Ile Ile Ala Glu Ile Gly Gln Asn His Gln Gly Asp Leu
20 25 30

10

Asp Val Ala Lys Arg Met Ile Arg Met Ala Lys Glu Cys Gly Ala Asp

ES 2 734 276 T3

35	40	45																							
Cys 50	Ala	Lys	Phe	Gln	Lys	Ser 55	Glu	Leu	Glu	Phe	Lys 60	Phe	Asn	Arg	Lys										
Ala 65	Leu	Glu	Arg	Pro	Tyr 70	Thr	Ser	Lys	His	Ser 75	Trp	Gly	Lys	Thr	Tyr 80										
Gly	Glu	His	Lys	Arg 85	His	Leu	Glu	Phe	Ser 90	His	Asp	Gln	Tyr	Arg 95	Glu										
Leu	Gln	Arg	Tyr 100	Ala	Glu	Glu	Val	Gly 105	Ile	Phe	Phe	Thr	Ala 110	Ser	Gly										
Met	Asp	Glu 115	Met	Ala	Val	Glu	Phe 120	Leu	His	Glu	Leu	Asn 125	Val	Pro	Phe										
Phe 130	Lys	Val	Gly	Ser	Gly	Asp 135	Thr	Asn	Asn	Phe	Pro	Tyr 140	Leu	Glu	Lys										
Thr 145	Ala	Lys	Lys	Gly	Arg 150	Pro	Met	Val	Ile	Ser 155	Ser	Gly	Met	Gln	Ser 160										
Met	Asp	Thr	Met	Lys 165	Gln	Val	Tyr	Gln	Ile 170	Val	Lys	Pro	Leu	Asn 175	Pro										
Asn	Phe	Cys 180	Phe	Leu	Gln	Cys	Thr	Ser 185	Ala	Tyr	Pro	Leu	Gln 190	Pro	Glu										
Asp	Val	Asn 195	Leu	Arg	Val	Ile	Ser 200	Glu	Tyr	Gln	Lys	Leu 205	Phe	Pro	Asp										
Ile 210	Pro	Ile	Gly	Tyr	Ser	Gly 215	His	Glu	Thr	Gly	Ile 220	Ala	Ile	Ser	Val										
Ala 225	Ala	Val	Ala	Leu	Gly 230	Ala	Lys	Val	Leu	Glu 235	Arg	His	Ile	Thr	Leu 240										
Asp	Lys	Thr	Trp	Lys 245	Gly	Ser	Asp	His	Ser 250	Ala	Ser	Leu	Glu	Pro 255	Gly										
Glu	Leu	Ala	Glu 260	Leu	Val	Arg	Ser	Val 265	Arg	Leu	Val	Glu	Arg 270	Ala	Leu										
Gly	Ser	Pro 275	Thr	Lys	Gln	Leu	Leu 280	Pro	Cys	Glu	Met	Ala 285	Cys	Asn	Glu										

ES 2 734 276 T3

Lys Leu Gly Lys Ser Val Val Ala Lys Val Lys Ile Pro Glu Gly Thr
 290 295 300

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

Tyr Pro Pro Glu Asp Ile Phe Asn Leu Val Gly Lys Lys Val Leu Val
 325 330 335

Thr Val Glu Glu Asp Asp Thr Ile Met Glu Glu Leu Val Asp Asn His
 340 345 350

Gly Lys Lys Ile Lys Ser
 355

<210> 62

<211> 432

5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 62

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

Gly Arg Pro Ser Arg Gly Arg Pro Pro Lys Leu Gln Arg Ser Arg Gly
 20 25 30

Ala Gly Arg Gly Leu Glu Lys Pro Pro His Leu Ala Ala Leu Val Leu
 35 40 45

Ala Arg Gly Gly Ser Lys Gly Ile Pro Leu Lys Asn Ile Lys Arg Leu
 50 55 60

Ala Gly Val Pro Leu Ile Gly Trp Val Leu Arg Ala Ala Leu Asp Ala
 65 70 75 80

Gly Val Phe Gln Ser Val Trp Val Ser Thr Asp His Asp Glu Ile Glu
 85 90 95

Asn Val Ala Lys Gln Phe Gly Ala Gln Val His Arg Arg Ser Ser Glu
 100 105 110

Thr Ser Lys Asp Ser Ser Thr Ser Leu Asp Ala Ile Val Glu Phe Leu
 115 120 125

10

ES 2 734 276 T3

Asn Tyr His Asn Glu Val Asp Ile Val Gly Asn Ile Gln Ala Thr Ser
 130 135 140

Pro Cys Leu His Pro Thr Asp Leu Gln Lys Val Ala Glu Met Ile Arg
 145 150 155 160

Glu Glu Gly Tyr Asp Ser Val Phe Ser Val Val Arg Arg His Gln Phe
 165 170 175

Arg Trp Ser Glu Ile Gln Lys Gly Val Arg Glu Val Thr Glu Pro Leu
 180 185 190

Asn Leu Asn Pro Ala Lys Arg Pro Arg Arg Gln Asp Trp Asp Gly Glu
 195 200 205

Leu Tyr Glu Asn Gly Ser Phe Tyr Phe Ala Lys Arg His Leu Ile Glu
 210 215 220

Met Gly Tyr Leu Gln Gly Gly Lys Met Ala Tyr Tyr Glu Met Arg Ala
 225 230 235 240

Glu His Ser Val Asp Ile Asp Val Asp Ile Asp Trp Pro Ile Ala Glu
 245 250 255

Gln Arg Val Leu Arg Phe Gly Tyr Phe Gly Lys Glu Lys Leu Lys Glu
 260 265 270

Ile Lys Leu Leu Val Cys Asn Ile Asp Gly Cys Leu Thr Asn Gly His
 275 280 285

Ile Tyr Val Ser Gly Asp Gln Lys Glu Ile Ile Ser Tyr Asp Val Lys
 290 295 300

Asp Ala Ile Gly Ile Ser Leu Leu Lys Lys Ser Gly Ile Glu Val Arg
 305 310 315 320

Leu Ile Ser Glu Arg Ala Cys Ser Lys Gln Thr Leu Ser Ala Leu Lys
 325 330 335

Leu Asp Cys Lys Thr Glu Val Ser Val Ser Asp Lys Leu Ala Thr Val
 340 345 350

Asp Glu Trp Arg Lys Glu Met Gly Leu Cys Trp Lys Glu Val Ala Tyr
 355 360 365

Leu Gly Asn Glu Val Ser Asp Glu Glu Cys Leu Lys Arg Val Gly Leu

ES 2 734 276 T3

370

375

380

Ser Ala Val Pro Ala Asp Ala Cys Ser Gly Ala Gln Lys Ala Val Gly
385 390 395 400

Tyr Ile Cys Lys Cys Ser Gly Gly Arg Gly Ala Ile Arg Glu Phe Ala
405 410 415

Glu His Ile Phe Leu Leu Ile Glu Lys Val Asn Asn Ser Cys Gln Lys
420 425 430

<210> 63

<211> 434

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Met Asp Ser Val Glu Lys Gly Ala Ala Thr Ser Val Ser Asn Pro Arg
1 5 10 15

Gly Arg Pro Ser Arg Gly Arg Pro Pro Lys Leu Gln Arg Asn Ser Arg
20 25 30

Gly Gly Gln Gly Arg Gly Val Glu Lys Pro Pro His Leu Ala Ala Leu
35 40 45

Ile Leu Ala Arg Gly Gly Ser Lys Gly Ile Pro Leu Lys Asn Ile Lys
50 55 60

His Leu Ala Gly Val Pro Leu Ile Gly Trp Val Leu Arg Ala Ala Leu
65 70 75 80

Asp Ser Gly Ala Phe Gln Ser Val Trp Val Ser Thr Asp His Asp Glu
85 90 95

Ile Glu Asn Val Ala Lys Gln Phe Gly Ala Gln Val His Arg Arg Ser
100 105 110

Ser Glu Val Ser Lys Asp Ser Ser Thr Ser Leu Asp Ala Ile Ile Glu
115 120 125

Phe Leu Asn Tyr His Asn Glu Val Asp Ile Val Gly Asn Ile Gln Ala
130 135 140

Thr Ser Pro Cys Leu His Pro Thr Asp Leu Gln Lys Val Ala Glu Met
145 150 155 160

10

ES 2 734 276 T3

Ile Arg Glu Glu Gly Tyr Asp Ser Val Phe Ser Val Val Arg Arg His
 165 170 175

Gln Phe Arg Trp Ser Glu Ile Gln Lys Gly Val Arg Glu Val Thr Glu
 180 185 190

Pro Leu Asn Leu Asn Pro Ala Lys Arg Pro Arg Arg Gln Asp Trp Asp
 195 200 205

Gly Glu Leu Tyr Glu Asn Gly Ser Phe Tyr Phe Ala Lys Arg His Leu
 210 215 220

Ile Glu Met Gly Tyr Leu Gln Gly Gly Lys Met Ala Tyr Tyr Glu Met
 225 230 235 240

Arg Ala Glu His Ser Val Asp Ile Asp Val Asp Ile Asp Trp Pro Ile
 245 250 255

Ala Glu Gln Arg Val Leu Arg Tyr Gly Tyr Phe Gly Lys Glu Lys Leu
 260 265 270

Lys Glu Ile Lys Leu Leu Val Cys Asn Ile Asp Gly Cys Leu Thr Asn
 275 280 285

Gly His Ile Tyr Val Ser Gly Asp Gln Lys Glu Ile Ile Ser Tyr Asp
 290 295 300

Val Lys Asp Ala Ile Gly Ile Ser Leu Leu Lys Lys Ser Gly Ile Glu
 305 310 315 320

Val Arg Leu Ile Ser Glu Arg Ala Cys Ser Lys Gln Thr Leu Ser Ser
 325 330 335

Leu Lys Leu Asp Cys Lys Met Glu Val Ser Val Ser Asp Lys Leu Ala
 340 345 350

Val Val Asp Glu Trp Arg Lys Glu Met Gly Leu Cys Trp Lys Glu Val
 355 360 365

Ala Tyr Leu Gly Asn Glu Val Ser Asp Glu Glu Cys Leu Lys Arg Val
 370 375 380

Gly Leu Ser Gly Ala Pro Ala Asp Ala Cys Ser Thr Ala Gln Lys Ala
 385 390 395 400

Val Gly Tyr Ile Cys Lys Cys Asn Gly Gly Arg Gly Ala Ile Arg Glu
 405 410 415

Phe Ala Glu His Ile Cys Leu Leu Met Glu Lys Val Asn Asn Ser Cys
 420 425 430

Gln Lys

ES 2 734 276 T3

<210> 64
 <211> 336
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 64
 Met Ala Pro Ala Arg Glu Asn Val Ser Leu Phe Phe Lys Leu Tyr Cys
 1 5 10 15

 Leu Ala Val Met Thr Leu Val Ala Ala Ala Tyr Thr Val Ala Leu Arg
 20 25 30

 Tyr Thr Arg Thr Thr Ala Glu Glu Leu Tyr Phe Ser Thr Thr Ala Val
 35 40 45

 Cys Ile Thr Glu Val Ile Lys Leu Leu Ile Ser Val Gly Leu Leu Ala
 50 55 60

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

 Val Leu Gly Ser Pro Lys Glu Leu Ala Lys Leu Ser Val Pro Ser Leu
 85 90 95

 Val Tyr Ala Val Gln Asn Asn Met Ala Phe Leu Ala Leu Ser Asn Leu
 100 105 110

 Asp Ala Ala Val Tyr Gln Val Thr Tyr Gln Leu Lys Ile Pro Cys Thr
 115 120 125

 Ala Leu Cys Thr Val Leu Met Leu Asn Arg Thr Leu Ser Lys Leu Gln
 130 135 140

 Trp Ile Ser Val Phe Met Leu Cys Gly Gly Val Thr Leu Val Gln Trp
 145 150 155 160

 Lys Pro Ala Gln Ala Ser Lys Val Val Val Ala Gln Asn Pro Leu Leu
 165 170 175

ES 2 734 276 T3

Gly Phe Gly Ala Ile Ala Ile Ala Val Leu Cys Ser Gly Phe Ala Gly
 180 185 190

Val Tyr Phe Glu Lys Val Leu Lys Ser Ser Asp Thr Ser Leu Trp Val
 195 200 205

Arg Asn Ile Gln Met Tyr Leu Ser Gly Ile Val Val Thr Leu Ala Gly
 210 215 220

Thr Tyr Leu Ser Asp Gly Ala Glu Ile Gln Glu Lys Gly Phe Phe Tyr
 225 230 235 240

Gly Tyr Thr Tyr Tyr Val Trp Phe Val Ile Phe Leu Ala Ser Val Gly
 245 250 255

Gly Leu Tyr Thr Ser Val Val Val Lys Tyr Thr Asp Asn Ile Met Lys
 260 265 270

Gly Phe Ser Ala Ala Ala Ala Ile Val Leu Ser Thr Ile Ala Ser Val
 275 280 285

Leu Leu Phe Gly Leu Gln Ile Thr Leu Ser Phe Ala Leu Gly Ala Leu
 290 295 300

Leu Val Cys Val Ser Ile Tyr Leu Tyr Gly Leu Pro Arg Gln Asp Thr
 305 310 315 320

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

<210> 65

<211> 337

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Met Ala Ala Pro Arg Asp Asn Val Thr Leu Leu Phe Lys Leu Tyr Cys
 1 5 10 15

Leu Ala Val Met Thr Leu Met Ala Ala Val Tyr Thr Ile Ala Leu Arg
 20 25 30

Tyr Thr Arg Thr Ser Asp Lys Glu Leu Tyr Phe Ser Thr Thr Ala Val
 35 40 45

10

ES 2 734 276 T3

Cys Ile Thr Glu Val Ile Lys Leu Leu Leu Ser Val Gly Ile Leu Ala
 50 55 60

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

Val Leu Gly Ser Pro Lys Glu Leu Leu Lys Leu Ser Val Pro Ser Leu
 85 90 95

Val Tyr Ala Val Gln Asn Asn Met Ala Phe Leu Ala Leu Ser Asn Leu
 100 105 110

Asp Ala Ala Val Tyr Gln Val Thr Tyr Gln Leu Lys Ile Pro Cys Thr
 115 120 125

Ala Leu Cys Thr Val Leu Met Leu Asn Arg Thr Leu Ser Lys Leu Gln
 130 135 140

Trp Val Ser Val Phe Met Leu Cys Ala Gly Val Thr Leu Val Gln Trp
 145 150 155 160

Lys Pro Ala Gln Ala Thr Lys Val Val Val Glu Gln Asn Pro Leu Leu
 165 170 175

Gly Phe Gly Ala Ile Ala Ile Ala Val Leu Cys Ser Gly Phe Ala Gly
 180 185 190

Val Tyr Phe Glu Lys Val Leu Lys Ser Ser Asp Thr Ser Leu Trp Val
 195 200 205

Arg Asn Ile Gln Met Tyr Leu Ser Gly Ile Ile Val Thr Leu Ala Gly
 210 215 220

Val Tyr Leu Ser Asp Gly Ala Glu Ile Lys Glu Lys Gly Phe Phe Tyr
 225 230 235 240

Gly Tyr Thr Tyr Tyr Val Trp Phe Val Ile Phe Leu Ala Ser Val Gly
 245 250 255

Gly Leu Tyr Thr Ser Val Val Val Lys Tyr Thr Asp Asn Ile Met Lys
 260 265 270

Gly Phe Ser Ala Ala Ala Ala Ile Val Leu Ser Thr Ile Ala Ser Val
 275 280 285

Met Leu Phe Gly Leu Gln Ile Thr Leu Thr Phe Ala Leu Gly Thr Leu

ES 2 734 276 T3

290

295

300

Leu Val Cys Val Ser Ile Tyr Leu Tyr Gly Leu Pro Arg Gln Asp Thr
305 310 315 320

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

Val

<210> 66

<211> 398

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Met Arg Leu Arg Glu Pro Leu Leu Ser Gly Ser Ala Ala Met Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu
20 25 30

His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg Asp Leu Ser
35 40 45

Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val Ser Thr Pro Leu Gln Gly Gly Ser
50 55 60

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

Gly Ala Arg Pro Pro Pro Pro Leu Gly Ala Ser Ser Gln Pro Arg Pro
85 90 95

Gly Gly Asp Ser Ser Pro Val Val Asp Ser Gly Pro Gly Pro Ala Ser
100 105 110

Asn Leu Thr Ser Val Pro Val Pro His Thr Thr Ala Leu Ser Leu Pro
115 120 125

Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro Met Leu Ile Glu
130 135 140

Phe Asn Met Pro Val Asp Leu Glu Leu Val Ala Lys Gln Asn Pro Asn
145 150 155 160

10

ES 2 734 276 T3

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

ES 2 734 276 T3

Arg Ala Lys Leu Leu Asn Ile Gly Phe Gln Glu Ala Leu Lys Asp Tyr
225 230 235 240

Asp Tyr Asn Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Pro Met Asp
245 250 255

Asp Arg Asn Ala Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His Ile Ser Val
260 265 270

Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln Tyr Phe Gly
275 280 285

Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Ala Ile Asn Gly Phe
290 295 300

Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp Ile Phe Asn
305 310 315 320

Arg Ser Lys Pro Lys Ala Ser Ala Glu Glu Thr Gly Gly Ser Leu Gly
325 330 335

Lys Ala Leu Ser Pro Ala Ser Thr Arg Ala
340 345

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir al menos un polipéptido glicosilado que tiene un patrón de glicosilación adecuado para fines terapéuticos, que comprende las etapas de:
- 5 (i) cultivar una microalga transformada de *Phaeodactylum tricornutum*, que comprende una secuencia de nucleótidos operativamente unida a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido glicosilado que se expresa en las microalgas transformadas para obtener la expresión de dicho al menos un polipéptido glicosilado, y,
- 10 (ii) seleccionar dicho al menos un polipéptido glicosilado para determinar el patrón de glicosilación de dicho al menos un polipéptido glicosilado y para seleccionar el al menos un polipéptido glicosilado que tiene al menos una estructura de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ que no comprende xilosa con enlaces $\beta(1,2)$ y/o fucosa con enlaces $\alpha(1,3)$,
- en donde dichas microalgas transformadas no comparten ninguna actividad de $\beta(1,2)$ xilosil transferasa y/o $\alpha(1,3)$ fucosil transferasa antes de transformarse, y no comparten ninguna actividad de manosiltransferasa que conduce a proteínas hipermanosiladas que resultan de la adición de manosa a la estructura de glicano.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en donde el polipéptido glicosilado se selecciona del grupo que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos primaria de un polipéptido glicosilado humano, una secuencia de aminoácidos primaria de un polipéptido glicosilado no humano, una secuencia de aminoácidos primaria de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo, y/o una secuencia de aminoácidos primaria de un polipéptido glicosilado no mamífero.
- 20 3. El método según la reivindicación 2, en donde dicho polipéptido glicosilado expresado en las microalgas transformadas es eritropoyetina, una citoquina, un anticuerpo, un factor de coagulación, una hormona, una beta-glucocerebrosidasa, una pentraxina-3, o un anti-TNF.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dichas microalgas transformadas comprenden además una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión
- 25 en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una enzima N-acetilglucosaminiltransferasa I (Gnt I) que se expresa en las microalgas transformadas.
5. El método según la reivindicación 4, en donde dichas microalgas comprenden además una secuencia de nucleótidos operativamente unida a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una manosidasa II que se expresa en las microalgas transformadas.
- 30 6. El método según la reivindicación 5, en donde dichas microalgas transformadas comprenden además una secuencia de nucleótidos operativamente unida a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una enzima N-acetilglucosaminiltransferasa II que se expresa en las microalgas transformadas.
7. El método según la reivindicación 6, en donde dichas microalgas transformadas comprenden además una
- 35 secuencia de nucleótidos operativamente unida a un promotor que impulsa la expresión en dichas microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica al menos una enzima seleccionada entre N-acetilglucosaminiltransferasa II, III, IV, V y VI que se expresa en las microalgas transformadas.
8. El método según las reivindicaciones 6 ó 7, en donde dichas microalgas transformadas comprenden además una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor que impulsa la expresión en dichas
- 40 microalgas, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica al menos una enzima glicosiltransferasa seleccionada entre galactosiltransferasa, fucosiltransferasa y sialiltransferasa, que se expresa en las microalgas transformadas.

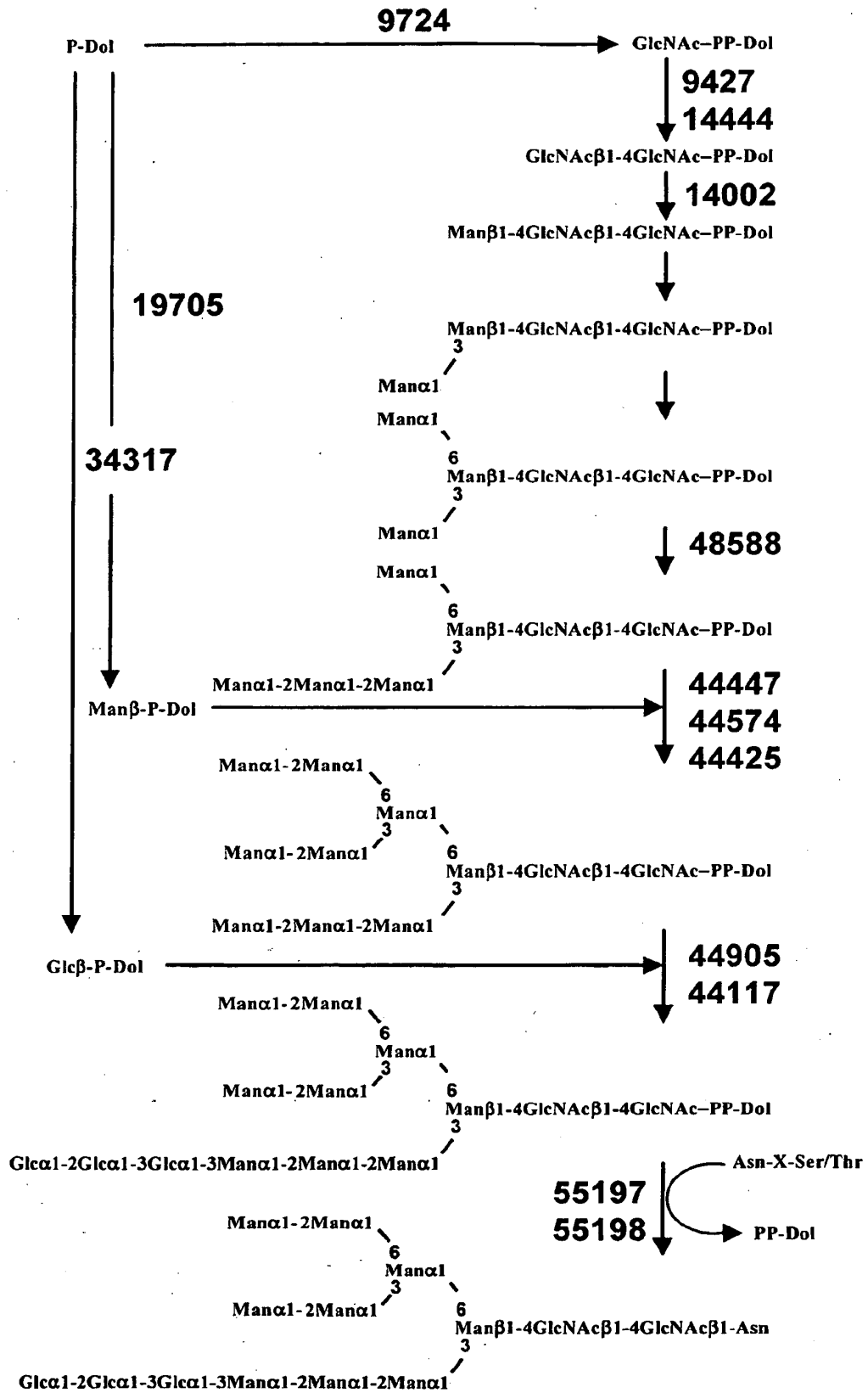


Figura 1 (parte 1)

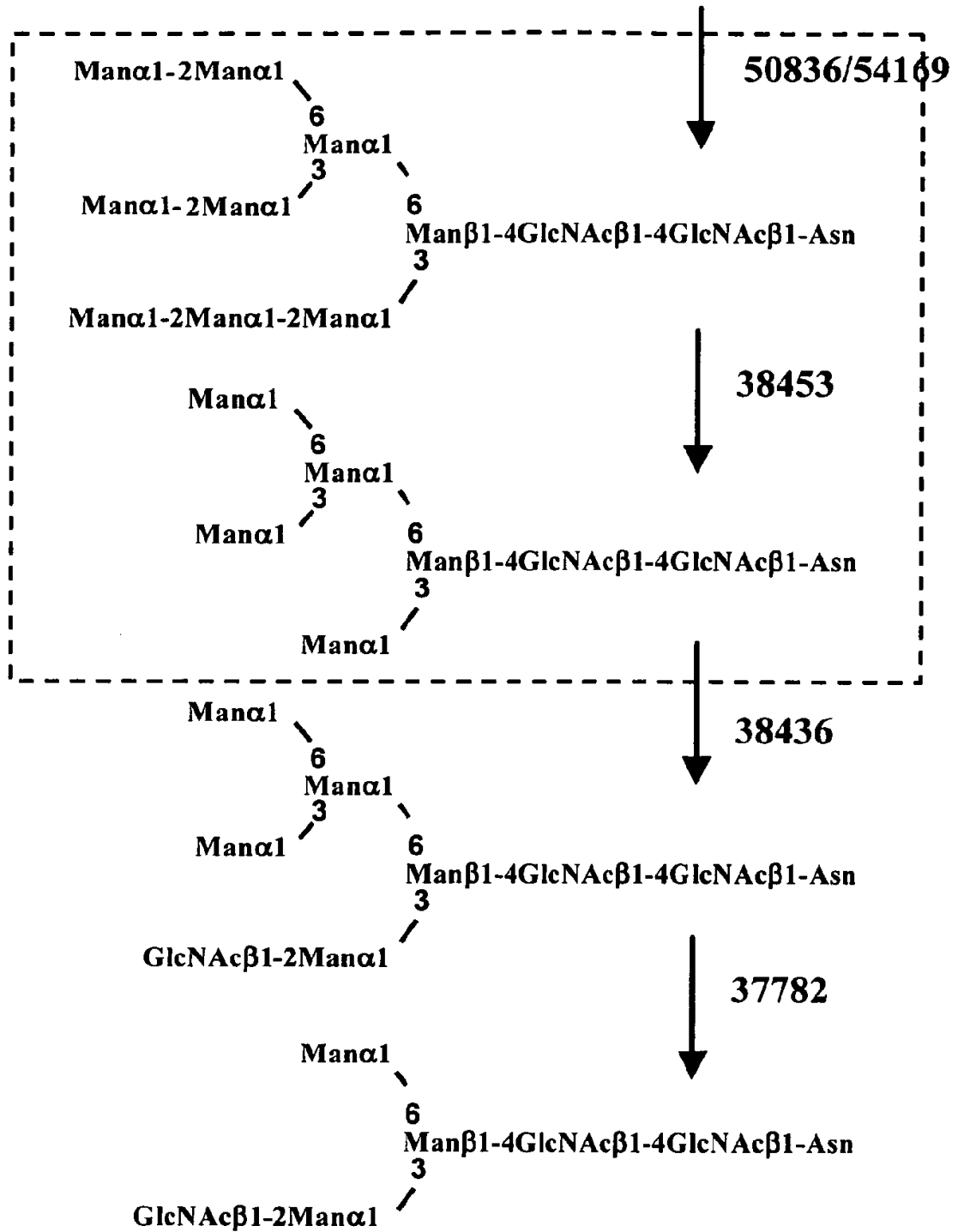


Figura 1 (parte 2)

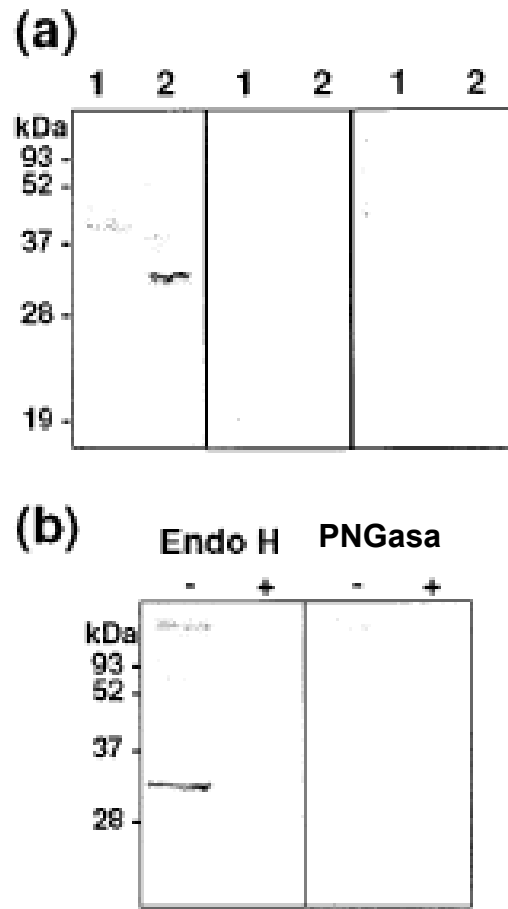
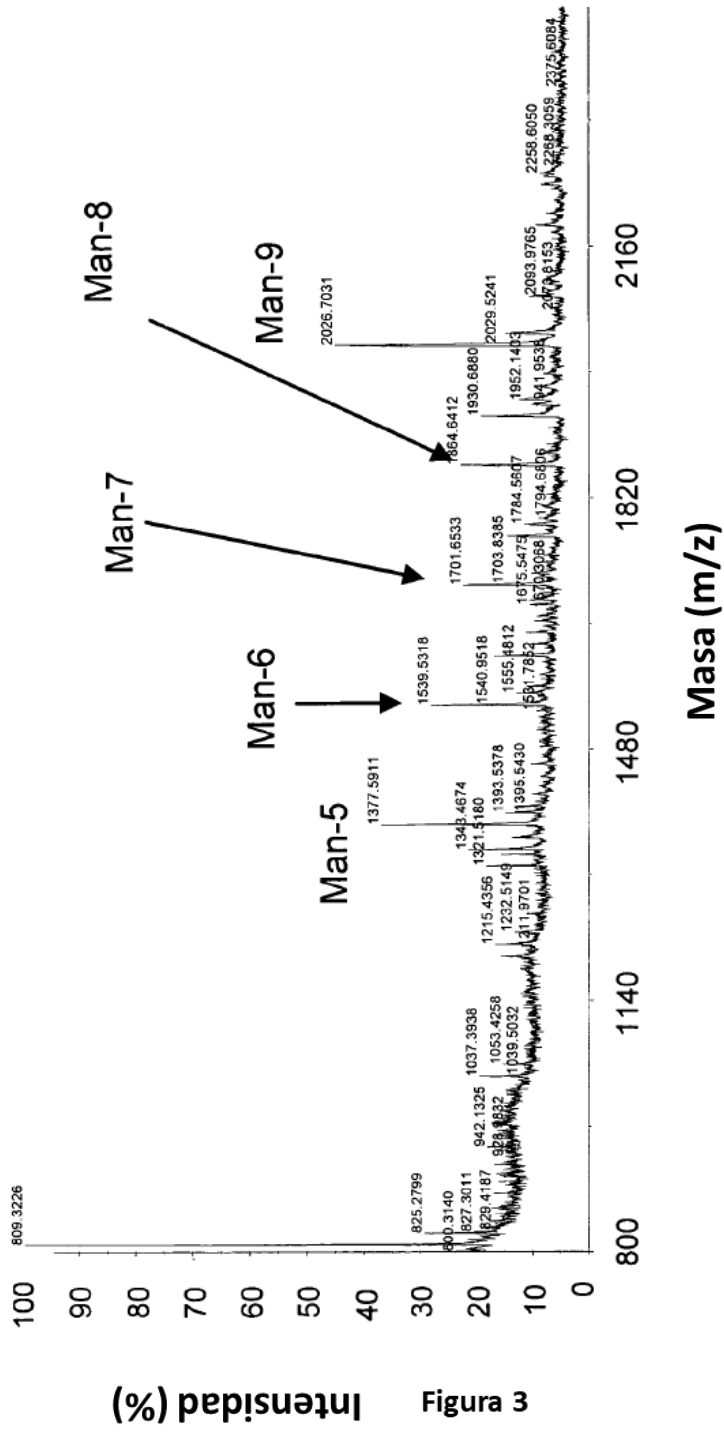


Figura 2



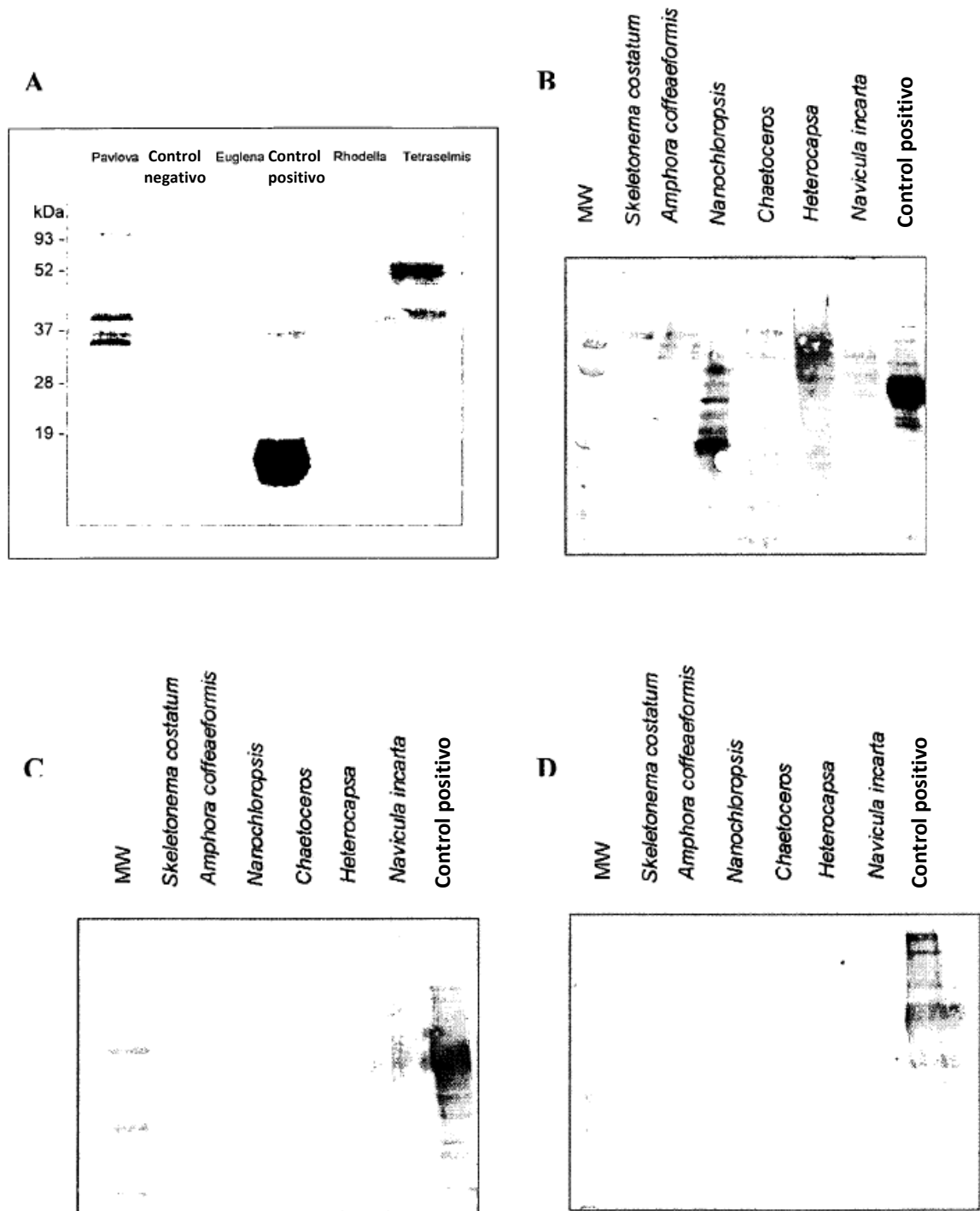


Figura 4

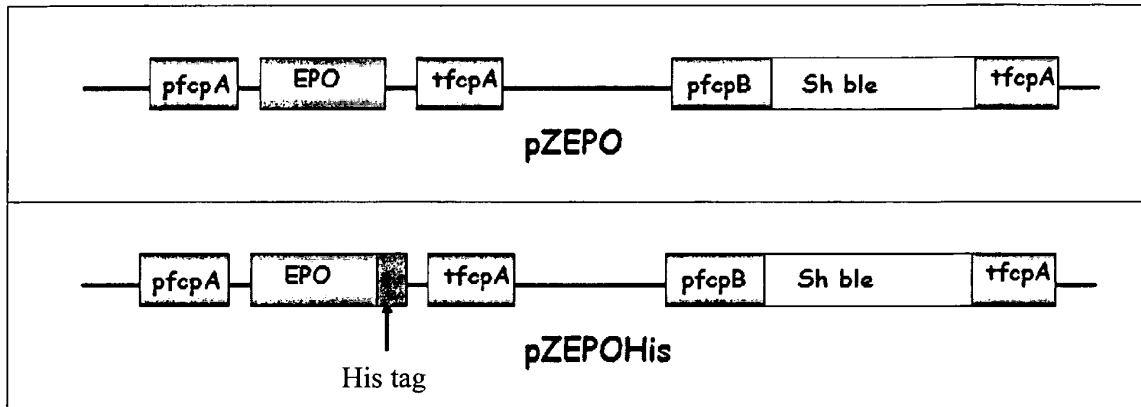


Figura 5

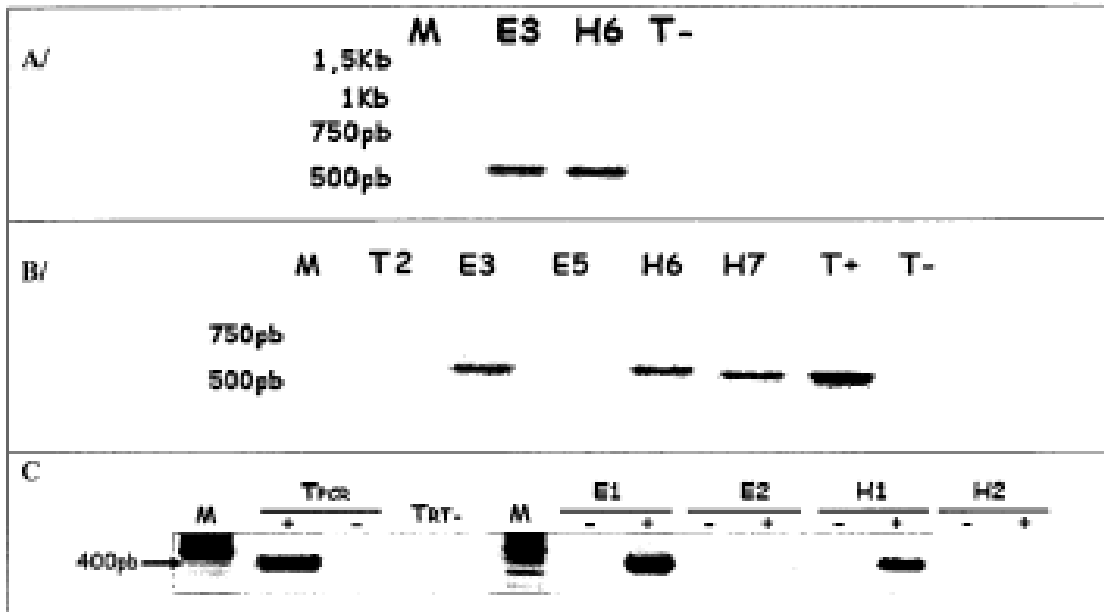


Figura 6

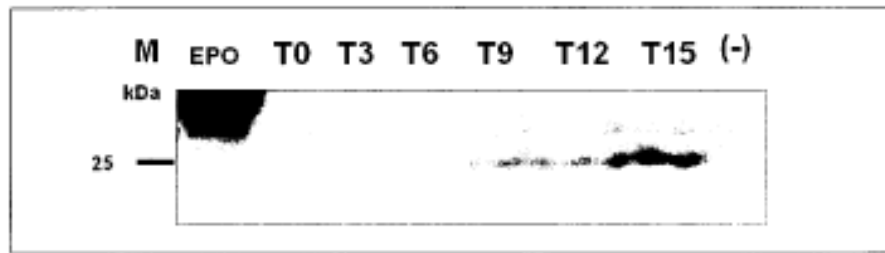


Figura 7

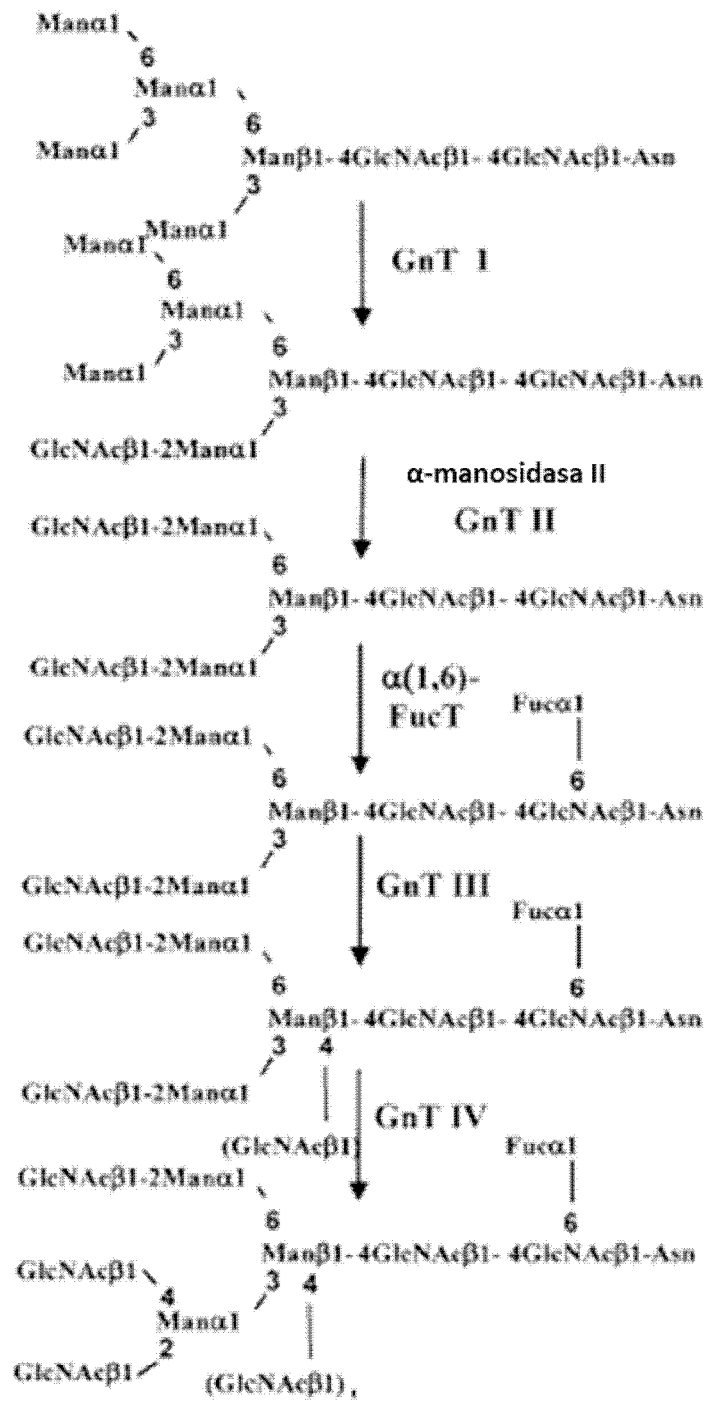


Figura 8

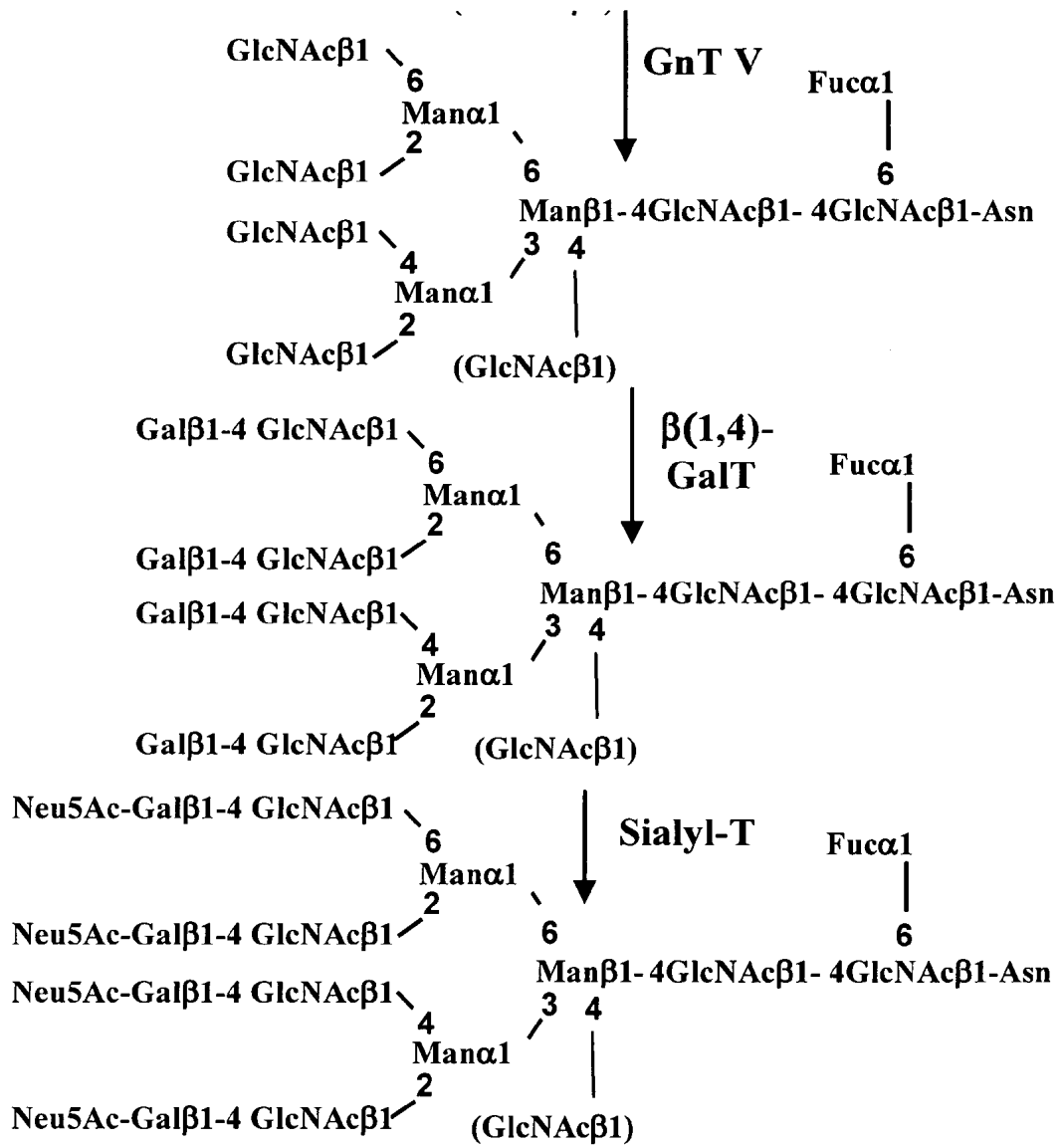


Figura 8