

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 514 465**

51 Int. Cl.:

C07K 14/755 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2004 E 04801776 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 1641825**

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

30 Prioridad:

27.06.2003 US 483505 P

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

28.10.2014

73 Titular/es:

**BAYER PHARMACEUTICALS CORPORATION
(100.0%)
800 Dwight Way
Berkeley, CA 94701-1986, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 514 465 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al campo general de la producción de proteínas recombinantes en una célula hospedadora de mamífero. Específicamente, la presente invención se refiere a aumentar la producción de un producto proteico recombinante secretado mediante la coexpresión de al menos una proteína chaperona Hsp70 en la célula hospedadora de mamífero.

Antecedentes de la invención

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

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

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

Compendio de la invención

- 45 En un aspecto de la invención, se proporciona una célula hospedadora de mamífero para mejorar la expresión de un producto proteico recombinante, teniendo dicha célula de mamífero un material genético que codifica para la expresión de dicho producto proteico recombinante y estando transformada con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona Hsp70, en donde el producto proteico recombinante es el Factor VIII, y en donde el ADN que codifica la proteína chaperona Hsp70 consiste en la secuencia de nucleótidos
50 expuesta en la Figura 2D.

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

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

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

5 En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método para producir una célula hospedadora de mamífero para mejorar la expresión de una proteína recombinante diana, en donde el método comprende proporcionar una célula de mamífero que tiene material genético que codifica para la expresión de una proteína recombinante diana; y transformar la célula de mamífero con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona Hsp70, en donde el producto proteico recombinante es el Factor VIII, y en donde el ADN que codifica la proteína chaperona Hsp70 consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en la Figura 2D.

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

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

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

15 En un tercer aspecto de la invención, se proporciona un método para producir un producto proteico recombinante secretado, en donde el método comprende las etapas de: cultivar una célula hospedadora de mamífero, teniendo dicha célula hospedadora de mamífero material genético que codifica para la expresión de dicho producto proteico recombinante y que está transformada con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona Hsp70 en donde el producto proteico recombinante es el Factor VIII, y en donde el ADN que codifica la proteína chaperona Hsp70 consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en la Figura 2D; y recuperar a partir del medio de cultivo el producto proteico recombinante así producido y secretado de esta manera.

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

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

25 En un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un método para mejorar el rendimiento de la proteína bikunina o IL2SA en una línea celular CHO en donde el material genético que codifica para la expresión de dicha bikunina o IL2SA recombinante se ha introducido previamente en una primera línea celular CHO, comprendiendo dicho método las etapas de: insertar al menos un vector de expresión de la proteína chaperona en dicha primera línea celular CHO para formar de este modo una línea celular CHO modificada; y seleccionar a partir de dicha línea celular CHO modificada al menos una segunda línea celular que muestra un rendimiento mejorado de la proteína bikunina o IL2SA recombinante; en donde el vector de expresión de la proteína chaperona comprende ADN que codifica una proteína chaperona Hsp70 en donde el ADN que codifica la proteína chaperona Hsp70 consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en la Figura 2D. En el método para mejorar el rendimiento de la proteína IL2SA, el método comprende adicionalmente la etapa de insertar un vector de expresión de la sintetasa de glutamina en dicha, al menos una, segunda línea celular.

35 En otra realización de la invención, el material genético que codifica para la expresión de dicha bikunina o IL2SA recombinante está integrado en el ADN de la primera célula CHO.

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

40 En un quinto aspecto de la invención, se proporciona un método para mejorar el rendimiento del Factor VIII recombinante en una línea celular de riñón de cría de hámster (BHK) en donde el material genético que codifica para la expresión de dicho Factor VIII recombinante se ha introducido previamente en una primera línea celular BHK, comprendiendo dicho método las etapas de: insertar al menos un vector de expresión de la proteína chaperona en la primera línea celular BHK con el fin de formar una línea celular BHK modificada; y seleccionar a partir de dicha línea celular BHK modificada al menos una segunda línea celular que muestra un mayor rendimiento del producto del Factor VIII recombinante, en donde el vector de expresión de la proteína chaperona comprende ADN que codifica una proteína chaperona Hsp70 en donde el ADN que codifica la proteína chaperona Hsp70 consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en la Figura 2D.

45 En otra realización de la invención, el material genético que codifica para la expresión de dicho Factor VIII recombinante está integrado en el ADN de la primera célula BHK.

50 En otra realización de la invención, la célula BHK se transfecta adicionalmente con un vector que incluye un gen de resistencia a la puromicina.

Breve descripción de los dibujos

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

la Figura 1 muestra las secuencias de cebadores de RT-PCR usados para amplificar el ADNc de chaperonas del RE

procedentes de una genoteca de ADNc humano. La parte subrayada indica un sitio de restricción construido para EcoRI (cebador 5') o XbaI (cebador 3'). CNX: calnexina; CRT: calreticulina;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Descripción detallada de la invención

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

35 En una realización de la invención, se proporciona una célula hospedadora de mamífero para mejorar la expresión de un producto proteico recombinante, en donde dicha célula de mamífero comprende material genético que codifica para la expresión de dicho producto proteico recombinante y se transforma adicionalmente con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona Hsp70 en donde el producto proteico recombinante es el Factor VIII, y en donde el ADN que codifica la proteína chaperona Hsp70 consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en la Figura 2D.

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

45 Las células de mamífero adecuadas para uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de cría de hámster (BHK), células HeLa humanas, células COS-1 de mono, células 293 de riñón embrionario humano, células NSO de mieloma de ratón y células HKB humanas (documento de Patente de EE.UU. nº 6.136.599). Las otras líneas celulares se pueden adquirir fácilmente en la ATCC.

50 El término "transfección" se utiliza para referirse a la captación de ADN extraño o exógeno en una célula, y una célula ha sido "transfectada" cuando el ADN exógeno se ha introducido al interior de la membrana celular. Se conocen bien en la técnica una variedad de técnicas de transfección y se describen en el presente documento. Véanse, por ejemplo, Graham et al., 1973, *Virology* 52:456; Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology* (Elsevier, 1986); y Chu et al., 1981, *Gene* 13:197. Tales técnicas se pueden utilizar para introducir uno o varios restos de ADN exógeno en células

hospedadoras adecuadas.

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

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

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

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

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

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

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

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

55 Después de la transfección, la célula se puede mantener transformada de forma temporal o transformada de forma estable con dicha estructura artificial de ADN. La introducción de estructuras artificiales múltiples de ADN, y la selección de las células que contienen las estructuras artificiales múltiples de ADN se puede hacer de forma simultánea o, más preferiblemente, secuencialmente. El método para establecer una línea celular transformada de forma estable

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

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

5 En una realización de la invención, se proporciona un método para mejorar el rendimiento de proteína bikunina recombinante en una célula CHO, en donde un material genético que codifica para la expresión de dicho bikunina recombinante se ha introducido previamente en una primera línea celular CHO (como se describe en el documento de Solicitud de Patente de EE.UU. nº de serie 09/441654 de Chan, presentada el 12 de noviembre 1999), comprendiendo dicho método las etapas de: insertar al menos un vector de expresión de proteína chaperona en dicha primera línea celular CHO para formar una línea celular CHO modificada; y seleccionar a partir de dicha línea celular CHO
10 modificada al menos una segunda célula que presenta un mayor rendimiento de la proteína bikunina recombinante, en donde el vector de expresión de la proteína chaperona comprende ADN que codifica una proteína chaperona Hsp70 en donde el ADN que codifica la proteína chaperona Hsp70 consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en la Figura 2D.

15 En otra realización más de la invención, se proporciona un método para mejorar el rendimiento de Factor VIII recombinante en una línea celular BHK de riñón de cría de hámster, en donde un material genético que codifica para la expresión de dicho Factor VIII recombinante se ha introducido previamente en una primera línea celular BHK, que comprende las etapas de: insertar al menos un vector de expresión de proteína chaperona en dicha primera línea celular BHK a fin de formar una línea celular BHK modificada; y seleccionar a partir de dicha línea celular BHK modificada al menos una segunda célula que presenta mayor rendimiento del producto del Factor VIII recombinante, en donde el vector de expresión de la proteína chaperona comprende ADN que codifica una proteína chaperona Hsp70
20 en donde el ADN que codifica la proteína chaperona Hsp70 consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en la Figura 2D.

25 La presente invención también proporciona un método para mejorar el rendimiento de proteína IL2SA recombinante en una línea celular CHO, en donde el material genético que codifica para la expresión de dicha IL2SA recombinante se ha introducido previamente en una primera línea celular CHO, comprendiendo dicho método las etapas de: insertar al menos un vector de expresión de proteína chaperona en dicha primera línea celular CHO para formar una línea celular CHO modificada; seleccionar a partir de dicha línea celular CHO modificada al menos una segunda célula que presenta mayor rendimiento de la proteína recombinante IL2SA; e insertar un vector de expresión de glutamina sintetasa en dicha al menos una segunda línea celular; en donde el vector de expresión de proteína chaperona comprende ADN que codifica una proteína chaperona Hsp70 en donde el ADN que codifica la proteína chaperona Hsp70 consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en la Figura 2D.
30

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

Ejemplos

35 Ejemplo 1 Clonación del ADNc de chaperona.

Todas las secuencias de chaperonas se clonaron a partir de genotecas de ADNc humano, seguido por la verificación de las secuencias de nucleótidos. Las secuencias de ADN que representaban las tres chaperonas del RE se clonaron mediante RT-PCR a partir de una genoteca de ADNc humano. Los cebadores de RT-PCR utilizados en estas reacciones se diseñaron para amplificar la región codificadora completa usando las secuencias apropiadas, obtenidas a partir de Genbank. Cada pareja de cebadores 5' y 3' incluye un sitio de restricción EcoRI (cebador 5') o XbaI (cebador 3') (Figura 1) para facilitar la clonación del producto de la PCR en el vector de expresión, pCI-neo (Promega).
40

Las reacciones de PCR se realizaron empleando enzima PFU de alta fidelidad (Stratagene). Las bandas del tamaño esperado se purificaron, se digirieron con EcoRI y XbaI y se clonaron en el vector pCI-neo digerido de manera similar. Los vectores recombinantes procedentes de esta etapa se propagaron en *E. coli* seguido por el aislamiento y la purificación de las secuencias del vector. Las inserciones de secuencias que representaban las chaperonas se secuenciaron usando cebadores que se unían justo fuera de los sitios de clonación múltiple del vector, así como dentro de la secuencia de la chaperona. La secuenciación se realizó utilizando el método de terminador Big Dye en un cicladador térmico de MJ Research y se analizó usando un analizador genético ABI 310. Las secuencias de ADNc de calnexina, calreticulina y Erp57 humana se muestran en las Figuras 2A-2C.
50

El fragmento de ADNc de longitud completa de Hsp70 humana se obtuvo por RT-PCR usando ARN poliA⁺ de cerebro humano (Clontech Cat: 6516-1) y dos cebadores denominados F-Hsp70 = 5' AGG GAA CCG CAT GGC CAA AG y R-Hsp70 = 5' GAA AGG CCCCTA ATC TAC CTC CTC A. Las secuencias de los cebadores de Hsp 70 se obtuvieron a partir de la secuencia publicada anteriormente para el gen de la proteína de choque térmico humana (Hsp70) [9]. Los cebadores F-Hsp70 y R-Hsp70 incluían o bien una secuencia de EcoRI o de XbaI, respectivamente. El fragmento de PCR deseado se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa y se confirmó por secuenciación de los nucleótidos. El fragmento de ADNc de Hsp70 humana de longitud completa se insertó a continuación en los sitios de clonación EcoRI y XbaI del vector pCI-neo, para formar el vector pCI-neo-Hsp70. El vector pCI-neo-Hsp70 se propa-
55

gó en *E. coli* seguido de aislamiento y purificación de las secuencias del vector. El ADN del plásmido pCI-neo-Hsp70 se secuenció con un analizador genético ABI PRISM 310. La secuencia de Hsp70 humana se muestra en la Figura 2D.

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

Una línea celular CHO que secretaba la proteína recombinante bikunina (documento de Solicitud de Patente de EE.UU. con nº de serie 09/441654) se supertransfectó con diversas combinaciones de chaperonas del RE, calnexina (CNX), calreticulina (CRT), ERp57 o Hsp70, seguido de selección con G418. Se obtuvieron poblaciones y se escrutaron mediante el ensayo de caliceína (documento de Solicitud de Patente de EE.UU. con nº de serie 09/441654). Brevemente, bikunina convencional o fluido del cultivo se diluyó en serie y se incubó con un volumen igual de caliceína a 37°C durante 30 minutos, después de lo cual se añadió un sustrato cromogénico, N-benzoil-Pro-Phe-Arg-pNA. La reacción se incubó durante 15 minutos antes de la adición de ácido acético al 50%. La cantidad de p-nitroanilida liberada se midió a 405 nM. Las poblaciones que mostraban los títulos más altos de bikunina, se clonaron a continuación a partir de una sola célula y se cultivaron durante un período de varias semanas. Los clones que mostraban constantemente los títulos más elevados de bikunina (2-4 veces) con respecto a las células testigo CF9-20, se conservaron y se cultivaron en matraces de agitación para su posterior análisis. Estos clones se redujeron aún más basándose en títulos de bikunina y características del crecimiento, mostrados durante el crecimiento en el entorno de matraz de agitación. Los clones candidatos finales se seleccionaron después de varias rondas y análisis exhaustivos en la etapa de matraz de agitación.

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

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

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

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

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

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

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

bla 2).

Tabla 2. Productividad del Factor VIII recombinante en clones

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

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

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

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

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

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

30 Tabla 3. Se observó un incremento de 2-4 veces en el título total y un incremento de 2-3 veces en la productividad específica en todos los clones de células individuales cuando se compararon con el grupo o la línea progenitora.

Tabla 3. Productividad de células productoras de IL2SA

	Título (µg/ml)	Densidad celular (10^6 /ml)	SPR (pg/c/d)	GS	Hsp70
Línea progenitora 49-19H42	18,78	3,51	2,67	(-)	(-)
49-19H42 GS hsp70-SC n° 12	33,87	2,63	6,44	+++	+++

	Título (µg/ml)	Densidad celular (10 ⁶ /ml)	SPR (pg/c/d)	GS	Hsp70
49-19H42 GShsp70-SC nº 14	22,08	1,83	6,03	+++	+++
49-19H42 GShsp70-SC nº 17	64,00	3,05	10,50	+++	+++
49-19H42 GShsp70-grupo	10,59	1,74	3,04	+++	+

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

5

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

Referencias

- (1) Wunderlich, M.; Glockshuber, R. In vivo control of redox potential during protein folding catalyzed by bacterial protein disulfide-isomerase (DsbA). *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 24547-24550.
- (2) Glockshuber, R.; Wunderlich, M.; Skerra, A.; Rudolph, R. Increasing the yield of disulfide-bridged heterologous proteins secreted from transgenic microorganisms. *Eur. Pat. No. 92-106978 920423* 1995.
- (3) Tuite, M. F.; Freedman, R. B.; Schultz, L. D.; Ellis, R. W.; Markus, H. Z.; Montgomery, D. L. Method for increasing production of disulfide bonded recombinant proteins by *Saccharomyces cerevisiae*. *Aust. Pat. No. AU679448B2* 1997.
- (4) Ostermeier, M.; De Sutter, K.; Georgiou, G. Eukaryotic protein disulfide isomerase complements *Escherichia coli dsbA* mutants and increases the yield of a heterologous secreted protein with disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 10616-10622.
- (5) Shusta, E. V.; Raines, R. T.; Pluckthun, A.; Wittrup, K. D. Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragments. *Nat. Bio-technol.* 1998, 16, 773-777.
- (6) Robinson, A. S.; Hines, V.; Wittrup, K. D. Protein disulfide isomerase overexpression increases secretion of foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology (N. Y.)* 1994, 12, 381-384.
- (7) Dunn, A.; Luz, J. M.; Natalia, D.; Gamble, J. A.; Freedman, R. B.; Tuite, M. F. Protein disulphide isomerase (PDI) is required for the secretion of a native disulphide-bonded protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Soc. Trans.* 1995, 23, 78S.
- (8) Hsu, T. A.; Watson, S.; Eiden, J. J.; Betenbaugh, M. J. Rescue of immunoglobulins from insolubility is facilitated by PDI in the baculovirus expression system. *Protein Expr. Purif.* 1996, 7, 281-288.
- (9) Hsu, T. A.; Betenbaugh, M. J. Co-expression of molecular chaperone BiP improves immunoglobulin solubility and IgG secretion from *Trichoplusia* in insect cells. *Biotechnol. Prog.* 1997, 13, 96-104.
- (10) Hsu, T. A.; Eiden, J. J.; Bourgarel, P.; Meo, T.; Betenbaugh, M. J. Effects of coexpressing chaperone BiP on functional antibody production in the baculovirus system. *Protein Expr. Purif.* 1994, 5, 595-603.
- (11) Ailor, E.; Betenbaugh, M. J. Overexpression of a cytosolic chaperone to improve solubility and secretion of a recombinant IgG protein in insect cells. *Biotechnol. Bioeng.* 1998, 58, 196-203.

- (12) Ailor, E.; Betenbaugh, M. J. Modifying secretion and post-translational processing in insect cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999, 10, 142-145.
- (13) Davis, R., Schooley, K., Rasmussen, B., Thomas, J., Reddy, P. Effect of PDI Overexpression on Recombinant Protein Secretion in CHO Cells. *Biotechnol. Prog.* 2000, 16, 736-743.
- (14) Dorner, A. J.; Wasley, L. C.; Raney, P.; Haugejorden, S.; Green, M.; Kaufman, R. J. The stress response in Chinese hamster ovary cells. Regulation of ERp72 and protein disulfide isomerase expression and secretion. *J. Biol. Chem.* 1990, 265, 22029-22034.
- (15) Dorner, A. J.; Wasley, L. C.; Kaufman, R. J. Overexpression of GRP78 mitigates stress induction of glucose regulated proteins and blocks secretion of selective proteins in Chinese hamster ovary cells. *EMBO J.* 1992, 11, 1563-1571.
- (16) *Current Protocols in Molecular Biology*, 2003, John Wiley & Sons, Inc.

REIVINDICACIONES

1. Una célula hospedadora de mamífero para mejorar la expresión de un producto proteico recombinante, teniendo dicha célula de mamífero un material genético que codifica para la expresión de dicho producto proteico recombinante y se transforma con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona Hsp70, en donde el producto proteico recombinante es el Factor VIII, y en donde el ADN que codifica la proteína chaperona Hsp70 consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en la Figura 2D.
2. La célula hospedadora de mamífero según la reivindicación 1, en la que el producto proteico recombinante es secretado.
3. La célula hospedadora de mamífero según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el material genético que codifica para la expresión de dicho producto proteico recombinante está integrado en el ADN de la célula hospedadora.
4. La célula hospedadora de mamífero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, transformada adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.
5. Un método para producir una célula hospedadora de mamífero para mejorar la expresión de una proteína recombinante diana que comprende

proporcionar una célula de mamífero que tiene material genético que codifica para la expresión de una proteína recombinante diana; y

transformar la célula de mamífero con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína chaperona Hsp70, en donde el producto proteico recombinante es el Factor VIII, y en donde el ADN que codifica la proteína chaperona Hsp70 consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en la Figura 2D.
6. El método según la reivindicación 5, en el que el producto proteico recombinante es secretado.
7. El método según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que el material genético que codifica para la expresión de dicho producto proteico recombinante está integrado en el ADN de la célula hospedadora.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, transformado adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.
9. Un método para producir un producto proteico recombinante secretado que comprende las etapas de:

cultivar una célula hospedadora de mamífero, teniendo dicha célula hospedadora de mamífero un material genético que codifica para la expresión de dicho producto proteico recombinante y se transforma con al menos un vector de expresión que comprende ADN que codifica una chaperona Hsp70, en donde el producto proteico recombinante es el Factor VIII, y en donde el ADN que codifica la proteína chaperona Hsp70 consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en la Figura 2D; y

recuperar a partir del medio de cultivo el producto proteico recombinante producido y secretado de este modo.
10. El método según la reivindicación 9, en el que el material genético que codifica para la expresión de dicho producto proteico recombinante está integrado en el ADN de la célula hospedadora.
11. El método según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde dicha célula hospedadora de mamífero se transforma adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.
12. Un método para mejorar el rendimiento de proteína bikunina recombinante en una línea celular CHO, en el que el material genético que codifica para la expresión de dicha bikunina recombinante se ha introducido previamente en una primera línea celular CHO, comprendiendo dicho método las etapas de:

insertar al menos un vector de expresión de la proteína chaperona en dicha primera línea celular CHO para formar de este modo una línea celular CHO modificada; y

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

en donde el vector de expresión de la proteína chaperona comprende ADN que codifica una proteína chaperona Hsp70 en donde el ADN que codifica la proteína chaperona Hsp70 consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en la Figura 2D.
13. El método según la reivindicación 12, en el que el material genético que codifica para la expresión de dicha bikunina recombinante está integrado en el ADN de la primera célula CHO.

14. El método según la reivindicación 12, en el que dicha selección se produce en presencia de G418.
15. Un método para mejorar el rendimiento de Factor VIII recombinante en una línea celular de riñón de cría de hámster (BHK), en donde el material genético que codifica para la expresión de dicho Factor VIII recombinante se ha introducido previamente en una primera línea celular BHK, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5 insertar al menos un vector de expresión de la proteína chaperona en dicha primera línea celular BHK de modo que se forma una línea celular BHK modificada; y
- seleccionar a partir de dicha línea celular BHK modificada al menos una segunda línea celular que muestra un mayor rendimiento del producto del Factor VIII recombinante,
- 10 en donde el vector de expresión de la proteína chaperona comprende ADN que codifica una proteína chaperona Hsp70 en donde el ADN que codifica la proteína chaperona Hsp70 consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en la Figura 2D.
16. El método según la reivindicación 15, en el que el material genético que codifica para la expresión de dicho Factor VIII recombinante está integrado en el ADN de la primera célula BHK.
17. El método según la reivindicación 15, en el que dicha célula BHK se transfecta adicionalmente con un vector que incluye un gen de resistencia a la puromicina.
- 15 18. El método según la reivindicación 15, en el que la selección tiene lugar en presencia de puromicina.
19. Un método para mejorar el rendimiento de proteína IL2SA recombinante en una línea celular CHO, en el que el material genético que codifica para la expresión de dicha IL2SA recombinante se ha introducido previamente en una primera línea celular CHO, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 20 insertar al menos un vector de expresión de proteína chaperona en dicha primera línea celular CHO para formar de este modo una línea celular CHO modificada;
- seleccionar a partir de dicha línea celular CHO modificada al menos una segunda línea celular que muestra un mayor rendimiento de la proteína IL2SA recombinante; e
- insertar un vector de expresión de sintetasa de glutamina en dicha al menos una segunda línea celular,
- 25 en donde el vector de expresión de la proteína chaperona comprende ADN que codifica una proteína chaperona Hsp70 en donde el ADN que codifica la proteína chaperona Hsp70 consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en la Figura 2D.
20. El método según la reivindicación 19, en el que el material genético que codifica para la expresión de dicha IL2SA recombinante está integrado en el ADN de la primera célula CHO.
- 30 21. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, en el que la segunda línea celular se transforma adicionalmente con un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína sintetasa de glutamina.
22. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 21, en el que se produce al menos una segunda línea celular a partir de dicha primera línea celular mediante la selección de una porción de dicha primera línea celular que muestra la integración del vector de expresión de la proteína chaperona en el ADN del hospedador.
- 35

CNX: cebador 5': ATGAATTCCGGGAGGCTAGAGATCATGG
 cebador 3': ATTCTAGATGCAGGGGAGGAGGGAGAAG

CRT: cebador 5': ATGAATTCCCGCCATGCTGCTATCCGTG
 cebador 3': ATTCTAGACTGGAGGCAGGCCTCTCTAC

Erp57: cebador 5': ATGAATTCCTCCGCAGTCCCAGCCGAGC
 cebador 3': ATTCTAGACTCTCGGCCCTGAGAGGTAA

FIG. 1

M E G K W L

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 2A

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

FIG. 2A (Continuación)

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

FIG. 2A (Continuación)

M L L S V P L L L G .

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 2B

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

FIG. 2B(Continuación)

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

FIG. 2C

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

FIG. 2C (Continuación)

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

FIG. 2C (Continuación)

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

FIG. 2D

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

FIG. 2D (Continuación)

ES 2 514 465 T3

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

FIG. 2E

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

FIG. 2E (Continuación)

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

FIG. 2F

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

FIG. 2F (Continuación)

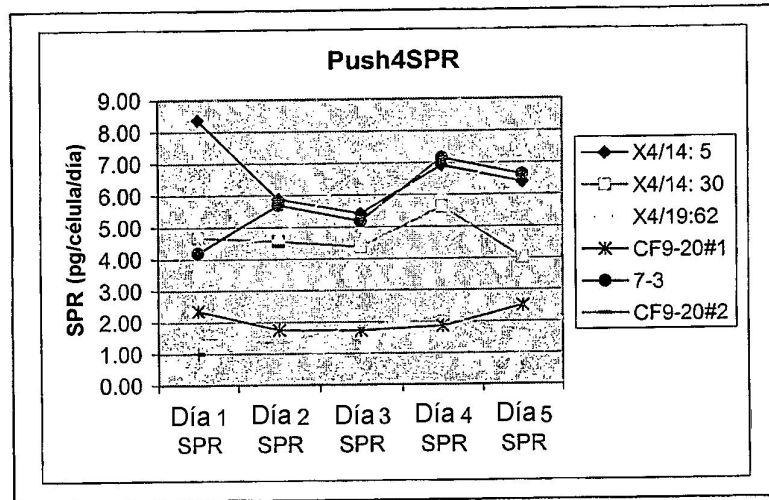


FIG. 3

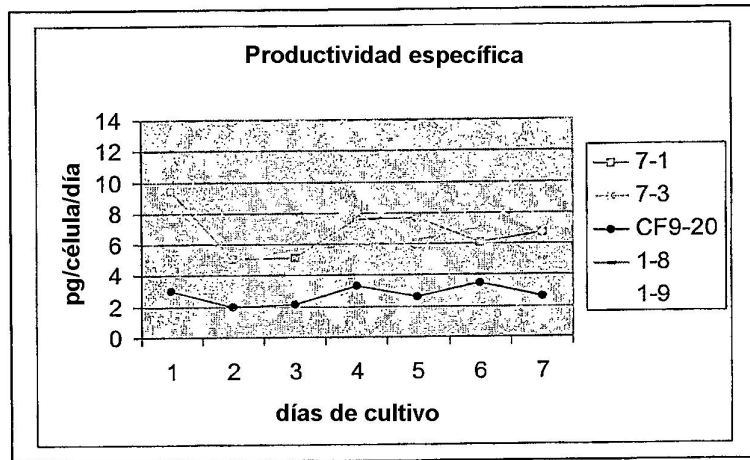


FIG. 4

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

FIG. 5