

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 467**

51 Int. Cl.:
C12N 15/09 (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06730889 .0**
96 Fecha de presentación: **31.03.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1870460**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.12.2007**

54 Título: **Procedimientos de producción de proteínas que tienen estructura helicoidal triple**

30 Prioridad:
31.03.2005 JP 2005102999

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.09.2012

73 Titular/es:
**FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.
7-10, DOSHOMACHI 1-CHOME CHUO-KU
OSAKA-SHI OSAKA 541-0045, JP y
OSAKA PREFECTURAL GOVERNMENT**

72 Inventor/es:
**KASE, Tetsuo;
KIMURA, Akio;
KISAKI, Hiroshi;
KESHI, Hiroyuki;
UEYAMA, Hiroshi y
NISHIHARA, Mizuki**

74 Agente/Representante:
Miltenyi, Peter

ES 2 387 467 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

Procedimientos de producción de proteínas que tienen estructura helicoidal triple

Campo técnico

La presente invención se refiere a procedimientos de producción de proteínas que tienen estructura helicoidal triple. Más específicamente, la presente invención se refiere a procedimientos de producción de colágeno humano o péptidos parciales de colágeno humano. Un objeto de la presente invención es proporcionar colágeno humano y péptidos parciales de colágeno humano que son seguros para el cuerpo vivo y que se pueden purificar y obtener fácilmente, y procedimientos de producción de los mismos. Más específicamente, la presente invención proporciona procedimientos de producción de colágeno humano y péptidos parciales del mismo, transduciendo de forma estable células de ovario de hámster chino (CHO) con un vector de expresión de mamífero dentro del que se ha insertado ADNc de colágeno humano.

Técnica anterior

El colágeno es una proteína que se distribuye en casi todos los tejidos del cuerpo incluyendo la piel, el hueso y el cartílago, y es muy conocido por desempeñar funciones importantes, tales como el mantenimiento de estructuras de tejidos y órganos, proporcionando armazones para las células. Mientras tanto, el colágeno es un material bioabsorbible que se descompone por las colagenasas secretadas a partir de los fibroblastos y por las colagenasas presentes en los fagocitos. Se considera que el colágeno es útil como biomaterial debido a que es un material biocompatible y bioabsorbible, como se describió anteriormente. Hasta ahora, el colágeno se ha usado como un biomaterial para cubrir piel herida y se ha notificado que mejora la cicatrización (documentos distintos de patente 1 y 2).

En la piel hay un cuarenta por ciento de colágeno total, y un 70 % o más del peso seco de la piel y del tendón es colágeno; por tanto, el colágeno es importante para desarrollar piel artificial. Se aplica como material útil para técnicas de cultivo de células y órganos, que ofrece una gran expectativa en sus aplicaciones en el campo en pleno auge de la medicina regenerativa. También se ha señalado que el colágeno (colágeno de tipo II) se puede usar para suprimir el reumatismo articular por ingestión oral (documentos distintos de patente 3 y 4). Como material de fuente para este colágeno, se han usado principalmente los derivados de tejidos de animales no humanos grandes, tales como cerdos y vacas.

[Documento distinto de patente 1] Surg. Forum, 10, 303 (1960)

Documento distinto de patente 2] J. Surg. Res., 10, 485-491 (1970)

[Documento distinto de patente 3] Lancet, 342, 799 (1993)

[Documento distinto de patente 4] Science, 261, 1727-1730 (1993)

[Documento de patente 1] Publicación kokai de la solicitud de patente japonesa n.º (JP-A) H10-179169 (solicitud de patente japonesa publicada, no examinada)

Divulgación de la invención

[Problemas para ser solucionados por la invención]

Como se describió anteriormente, el colágeno es útil como biomaterial o medicamento para terapia regenerativa y trasplante de órganos vivos, pero el colágeno usado hasta el momento se deriva de tejidos de animales no humanos grandes, tales como cerdos y vacas. Aunque el colágeno es una proteína con una inmunogenicidad baja por naturaleza, se ha reportado que cuando el colágeno de un animal xenogénico se trasplanta, se implanta o se administra como biomaterial se inducen reacciones inmunitarias a una frecuencia baja (J. Immunol., 136, 877-882 (1986), Biomaterials, 11, 176-180 (1990)). Además, se ha vuelto imposible el uso de colágeno derivado de vaca debido al problema de la contaminación priónica en vacas. Además, no hay garantía de que no se produzcan problemas similares a la contaminación priónica en animales tales como los cerdos que se usan normalmente para la extracción de colágeno. De los aspectos mencionados anteriormente, es preferible el uso de colágeno derivado de ser humano como biomaterial para aplicarse directamente en el cuerpo humano. Sin embargo, la extracción y la purificación de colágeno a partir de tejidos humanos no sólo tiene problemas éticos y técnicos, sino que también es problemático de forma cualitativa porque el colágeno obtenido forma entrecruzamientos inespecíficos y es difícil de purificar.

Para obtener colágeno no inmunogénico que esté libre de riesgo de contaminación por patógenos y que sea fácil de aislar y purificar, se ha estudiado la producción de colágeno usando técnicas de recombinación genética (Biochem. Soc., 28, 350-353 (2000)). Sin embargo, es muy complicado preparar un vector de expresión para introducir en las células huésped, un ADNc que codifique una molécula de colágeno con un peso molecular de más de 100.000. Además, los procedimientos convencionales tienen una productividad baja y están lejos de una aplicación práctica. Además, se sabe que las moléculas de colágeno tienen una estructura de triple hélice en la que están asociados tres péptidos. Esta estructura se forma como resultado de varias modificaciones en los productos de traducción primarios

del gen (N. Engl. J. Med., 311, 376-386 (1984)); sin embargo, se cree que sólo las células específicas tienen esta capacidad de modificación.

5 Se han realizado esfuerzos para producir colágeno humano recombinante usando fibroblastos de ratón, células de pulmón de hámster y similares como huésped (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84, 764-768 (1987), J. Biol. Chem., 264, 20683-20687 (1989)). Aunque el colágeno producido en estos ejemplos tiene una estructura molecular normal, son moléculas de colágeno mezcladas de productos génicos de colágeno tanto de células huésped como humanas. En un ejemplo en el que se expresó colágeno de tipo II (Biochem. J., 298,31-37 (1994)), la cantidad producida fue tan solo de 0,5 a 1 mg por litro de medio de cultivo, y se encontró que el colágeno de tipo II expresado por el ADNc introducido estaba contaminado con una cantidad significativa de colágeno de tipo II derivado de huésped. Por tanto, fue necesario separar el colágeno de tipo II endógeno del colágeno de tipo II derivado del gen introducido.

10 Además de los ejemplos mencionados anteriormente, hay ejemplos de expresión de colágeno humano usando levaduras (publicación kohyo de patente japonesa n.º (JP-A) H7-501939 (publicación de fase nacional japonesa publicada, no examinada, correspondiente a una publicación internacional no japonesa)), células de insecto (publicación kokai de solicitud de patente japonesa n.º (JP-A) H8-23979 (solicitud de patente japonesa publicada, no examinada)), Bacillus brevis (JP-A H11-178574), y Escherichia coli (JP-A 2002-325584), pero las modificaciones posteriores a la expresión de los péptidos del colágeno pueden ser diferentes de las realizadas en células animales. Como se menciona anteriormente, no se ha notificado hasta ahora ningún procedimiento satisfactorio como procedimiento de recombinación genética para producir colágeno humano en términos de cantidad y calidad. Además, aún no se ha producido ninguna investigación sobre los procedimientos para producir grandes cantidades de proteínas con una estructura de triple hélice, tales como el colágeno.

15 La presente invención se logró en vista de las anteriores circunstancias. Un objeto de la presente invención es proporcionar métodos para producir proteínas con una estructura de triple hélice. Más específicamente, el objeto es proporcionar métodos para producir moléculas de colágeno humano que sean fáciles de aislar y de purificar, y que tengan sustancialmente la misma estructura que las moléculas de colágeno natural, sintetizando grandes cantidades de proteína de colágeno humano en células huésped a las que se les ha introducido un gen de colágeno, incorporado en un vector de expresión alta, en donde las grandes cantidades de proteína de colágeno humano se derivan del gen introducido.

[Medios para resolver los problemas]

20 Los inventores de la presente invención realizaron diversos estudios para resolver los problemas anteriormente mencionados. Como resultado, los inventores descubrieron que se pueden producir grandes cantidades de colágeno humano apenas contaminadas con colágeno derivado de células huésped, seleccionando de diversas células de mamífero una célula huésped que tenga una expresión de colágeno baja e introduciendo una construcción de gen de colágeno en un vector que pueda realizar una alta expresión génica exógena, y de este modo completaron la presente invención. No se han reportado métodos de producción de colágeno que produzcan de forma preferente colágeno humano en células huésped mediante la expresión masiva de un gen de colágeno introducido.

25 Específicamente, los presentes inventores desarrollaron exitosamente métodos para producir una gran cantidad de colágeno humano que no requiere un procedimiento de purificación complejo, insertando un gen de colágeno humano en un vector que puede expresar altamente un gen exógeno y después introduciendo la construcción resultante en una célula de mamífero huésped con una expresión baja de colágeno (una proteína con estructura de triple hélice), y de este modo completaron la presente invención.

Específicamente, la presente invención proporciona:

[1] un método de producción de una proteína que tiene una estructura de triple hélice, en el que el método comprende:

(a) introducir ADN que codifica una proteína que tiene una estructura de triple hélice en un vector;

(b) transformar una célula de mamífero por transferencia del vector génico; y

30 (c) cultivar o reproducir el transformante, y recoger la proteína que tiene una estructura de triple hélice de la célula o del sobrenadante del cultivo de la misma;

[2] el procedimiento de [1], en el que la proteína que tiene una estructura de triple hélice es colágeno humano o un péptido parcial de la misma;

[3] el procedimiento de [2], en el que el colágeno humano consiste en al menos uno o más tipos de cadenas α ;

35 [4] el procedimiento de [2], en el que el colágeno humano es colágeno humano de tipo I;

[5] el procedimiento de [4], en el que el colágeno humano de tipo I es un complejo de cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$;

[6] el procedimiento de [2], en el que el colágeno humano es colágeno humano de tipo II;

- [7] el procedimiento de [2], en el que el colágeno humano es colágeno humano de tipo III;
- [8] el procedimiento de [1], en el que el ADN que codifica una proteína que tiene una estructura de triple hélice es al menos un ADN seleccionado de:
- (a) un ADN que comprende una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NOs: 1, 4, 7, y 10; y
- 5 (b) un ADN que hibrida bajo condiciones restrictivas con un ADN que comprende una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NOs: 1, 4, 7 y 10;
- [9] el método de uno cualquiera de [1] a [8], en el que la célula de mamífero es una célula de ovario de hámster chino (CHO);
- 10 [10] el método de uno cualquiera de [1] a [8], en el que la célula de mamífero es una célula de riñón embrionario humano (HEK293);
- [11] el método de uno cualquiera de [1] a [10], en el que el vector que se va a introducir con el ADN que codifica una proteína que tiene una estructura de triple hélice es pNOW/CMV-AA;
- [12] un colágeno humano producido de acuerdo con el método de una cualquiera de [1] a [11];
- [13] un vector introducido con al menos un ADN seleccionado de:
- 15 (a) un ADN que comprende una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SED ID NOs 1, 4, 7, y 10; y
- (b) un ADN que hibrida bajo condiciones restrictivas con un ADN que comprende una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NOs: 1, 4, 7 y 10;
- [14] una célula de mamífero que lleva el vector de [13]; y
- [15] un kit para producir una proteína que tiene una estructura de triple hélice, en el que el kit comprende el vector de
- 20 [13] o la célula de mamífero de [14].

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 muestra una construcción de expresión de una cadena $\alpha 1$ de colágeno humano de tipo I. hColla1: ADNc de cadena $\alpha 1$ de colágeno humano de tipo I, PCMV: promotor de citomegalovirus, BGHPA: señal de adición de poli (A) del gen de la hormona de crecimiento bovino, PSVd: promotor de virus de simio 40 desprovisto de potenciador, DHFR: ADNc de dihidrofolato reductasa de ratón, SVpA: señal de adición de poli (A) del virus de simio 40, ColE1ori: origen de replicación de *Escherichia coli*, Neor: marcador de selección para células de mamífero (resistencia a G418) y *Escherichia coli* (resistencia a kanamicina).

25

La fig. 2 muestra una construcción de expresión de una cadena $\alpha 2$ de colágeno humano de tipo I. hColla2: ADNc del gen de cadena $\alpha 2$ de colágeno humano de tipo I, PCMV: promotor de citomegalovirus, BGHPA: señal de adición de poli (A) del gen de la hormona de crecimiento bovino, PSVd: promotor de virus de simio 40 desprovisto de potenciador, DHFR: ADNc de dihidrofolato reductasa de ratón, SVpA: señal de adición de poli (A) del virus de simio 40, ColE1ori: origen de replicación de *Escherichia coli*, Neor: marcador de selección para células de mamífero (resistencia a G418) y *Escherichia coli* (resistencia a kanamicina).

30

La fig. 3 muestra una construcción de expresión de una cadena $\alpha 1$ de colágeno humano de tipo II. hColla1: ADNc de cadena $\alpha 1$ de colágeno humano de tipo II, PCMV: promotor de citomegalovirus, BGHPA: señal de adición de poli (A) del gen de la hormona de crecimiento bovino, PSVd: promotor de virus de simio 40 desprovisto de potenciador, DHFR: ADNc de dihidrofolato reductasa de ratón, SVpA: señal de adición de poli (A) del virus de simio 40, ColE1ori: origen de replicación de *Escherichia coli*, Neor: marcador de selección para células de mamífero (resistencia a G418) y *Escherichia coli* (resistencia a kanamicina).

35

La fig. 4 muestra una construcción de expresión de una cadena $\alpha 1$ de colágeno humano de tipo III. hColla1: ADNc de cadena $\alpha 1$ de colágeno humano de tipo III, PCMV: promotor de citomegalovirus, BGHPA: señal de adición de poli (A) del gen de la hormona de crecimiento bovino, PSVd: promotor de virus de simio 40 desprovisto de potenciador, DHFR: ADNc de dihidrofolato reductasa de ratón, SVpA: señal de adición de poli (A) del virus de simio 40, ColE1ori: origen de replicación de *Escherichia coli*, Neor: marcador de selección para células de mamífero (resistencia a G418) y *Escherichia coli* (resistencia a kanamicina).

40

45

La fig. 5 es una fotografía que muestra un análisis SDS-PAGE de colágeno humano de tipo I recombinante en sobrenadantes de cultivo. Carril 1: colágeno humano de tipo I (100 $\mu\text{g/ml}$), carril 2: colágeno de tipo I recombinante.

La fig. 6 es una fotografía que muestra un análisis SDS-PAGE de productos digeridos por pepsina de colágeno humano de tipo I recombinante en sobrenadantes de cultivo. Carril 1: colágeno humano de tipo I recombinante (185 $\mu\text{g/ml}$), carril 2: colágeno humano de tipo I recombinante (concentrado 20 veces).

50

La fig. 7 es un conjunto de fotografías que muestran la detección por Western blot de colágeno humano de tipo I recombinante purificado y de productos digeridos por pepsina del mismo.

5 A. Detección por un anticuerpo contra la cadena $\alpha 1$ de colágeno humano de tipo I, carril 1: colágeno humano de tipo I (50 $\mu\text{g/ml}$), carril 2: colágeno de tipo I recombinante, carril 3: productos de colágeno de tipo I digeridos por pepsina recombinante.

B. Detección por un anticuerpo contra la cadena $\alpha 2$ de colágeno humano de tipo I, carril 1: colágeno humano de tipo I (10 $\mu\text{g/ml}$), carril 2: colágeno de tipo I recombinante, carril 3: productos de colágeno de tipo I recombinante digeridos por pepsina.

10 La fig. 8 es una fotografía que muestra un análisis SDS-PAGE de colágeno humano de tipo II recombinante en sobrenadantes de cultivo. Carril 1: colágeno humano de tipo II (100 $\mu\text{g/ml}$), carril 2: colágeno de tipo II recombinante.

La fig. 9 es una fotografía que muestra un análisis por Western blot de colágeno humano de tipo II recombinante en sobrenadantes de cultivo. Carril 1: colágeno humano de tipo II (10 $\mu\text{g/ml}$), carril 2: colágeno de tipo II recombinante (diluido 10 veces)

15 La fig. 10 es una fotografía que muestra un análisis SDS-PAGE de productos de colágeno humano de tipo II recombinante en sobrenadantes de cultivo digeridos por pepsina. Carril 1: colágeno humano de tipo II (100 $\mu\text{g/ml}$), carril 2: colágeno de tipo II recombinante (concentrado 5 veces).

La fig. 11 es una fotografía que muestra un análisis por Western blot de productos de colágeno humano de tipo II recombinante en sobrenadantes de cultivo digeridos por pepsina. Carril 1: colágeno humano de tipo II (10 $\mu\text{g/ml}$), carril 2: colágeno de tipo II recombinante.

20 La fig. 12 es una fotografía que muestra un análisis SDS-PAGE de colágeno humano de tipo III recombinante en sobrenadantes de cultivo. Carril 1: colágeno humano de tipo III (100 $\mu\text{g/ml}$), carril 2: colágeno de tipo III recombinante.

25 La fig. 13 es una fotografía que muestra un análisis por Western blot de colágeno humano de tipo III recombinante en sobrenadantes de cultivo y productos digeridos por pepsina del mismo, carril 1: colágeno humano de tipo III (10 $\mu\text{g/ml}$), carril 2: colágeno de tipo III recombinante (diluido 10 veces), carril 3: productos de colágeno de tipo III recombinante digeridos por pepsina.

La fig. 14 es una fotografía que muestra un análisis SDS-PAGE de colágeno humano de tipo III recombinante purificado en sobrenadantes de cultivo.

A. Colágeno de tipo I, carril 1: colágeno humano de tipo I, carril 2: colágeno de tipo I recombinante.

B. Colágeno de tipo III, carril 1: colágeno de tipo III humano, carril 2: colágeno de tipo III recombinante.

30 **Mejor modo para llevar a cabo la invención**

A continuación en el presente documento, se muestra el mejor modo para llevar a cabo la presente invención y se explica la presente invención con más detalle.

La presente invención referida a métodos de producción de proteínas que tienen estructura helicoidal triple, comprende las etapas de:

35 (a) introducir en un vector ADN que codifica una proteína que tiene una estructura de triple hélice;

(b) transformar una célula de mamífero por transferencia del vector génico;

(c) cultivar o reproducir el transformante, y recoger proteínas con una estructura de triple hélice de las células o sobrenadantes del cultivo de las mismas.

40 Las "proteínas que tienen una estructura de triple hélice" en la presente invención no están específicamente limitadas siempre que tengan una estructura de triple hélice, pero preferentemente son colágeno o colectina, y más preferentemente colágeno. Las proteínas que tienen una estructura de triple hélice pueden ser proteínas cuya estructura de triple hélice se construye durante las etapas de cultivo y producción, o después de las etapas de cultivo y producción por manipulaciones tales como la purificación. También es posible producir grandes cantidades de proteínas que pueden formar una estructura de triple hélice en un estado estructural monocatenario.

45 Se conocen más de 20 tipos diferentes de colágeno y aproximadamente 25 tipos de cadenas α constituyentes. Se han clonado genes que los codifican y se han dilucidado secuencias de nucleótidos de los mismos ("Connective Tissue and Its Heritable Disorders", p. 145-165, publicado por Wiley-Liss Inc. (1992)). Se pueden introducir estos genes en un vector usado en la presente invención que pueda expresar altamente genes exógenos mediante técnicas de recombinación de genes conocidas por los expertos en la técnica (por ejemplo, "Molecular Cloning" segunda edición, publicado por Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). El ADNc de colágeno humano usado en la presente

50

invención puede ser uno cualquiera de esos ADNc clonados de colágeno, e incluye ADNc de péptidos de colágeno parciales.

El colágeno de la presente invención no tiene un origen específicamente limitado, pero es preferible el colágeno derivado de mamífero, y es más preferible el colágeno derivado de ser humano.

- 5 Además, el colágeno de la presente invención también incluye colágeno cuya secuencia de aminoácidos está parcialmente modificada por sustitución, delección, como tal, o tiene una adición de una secuencia de aminoácidos no derivada de colágeno. Además, hay métodos conocidos para obtener células transducidas que expresan moléculas proteicas introduciendo un vector en las células de mamífero huésped. Se pueden aplicar métodos similares a la presente invención.
- 10 Se puede usar el siguiente método para examinar si el colágeno se sintetiza como una proteína recombinante por células a las que se les introduce el vector de alta expresión génica exógena mencionado anteriormente. Específicamente, los péptidos de colágeno se pueden identificar por métodos inmunoquímicos tales como Western blot usando anticuerpos disponibles comercialmente que se unen específicamente al colágeno humano. Normalmente, el colágeno no migra de acuerdo con el peso molecular en la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (Nature, 227, 680-685 (1970)). Por tanto, se puede examinar la reactividad de una muestra con un anticuerpo anti-colágeno después de que la muestra se someta a electroforesis simultáneamente con colágeno como marcador y se transfiera a una membrana de nailon o a una membrana de nitrocelulosa de acuerdo con el método por Matsudaira et al. (J. Biol. Chem., 261, 10035-10038 (1987)). Además, si una molécula que tiene una estructura de triple hélice está presente en los productos de colágeno recombinante generados por el vector de expresión se puede examinar como sigue.

20 Un colágeno fibroso típico es una molécula tricatenaria formada por tres subunidades (cadenas α), y tiene una estructura de triple hélice intramolecular. Además, se sabe que el colágeno que tiene una estructura de triple hélice es resistente a la digestión por pepsina. Por tanto, se puede confirmar la presencia de moléculas tricatenarias en una muestra de proteínas digiriendo los sobrenadantes del cultivo de células a las que se le introduce el vector de alta expresión génica endógena mencionado anteriormente con pepsina en una condición ácida, y examinando si la muestra tiene una estructura resistente a pepsina.

25 Específicamente, en la presente invención, las muestras de proteínas tratadas con pepsina se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS bajo condiciones reductoras. Como resultado, el colágeno recombinante obtenido mostró que tenía una resistencia a pepsina similar a la del colágeno natural, y por tanto, se espera que los péptidos de colágeno que tienen una propiedad resistente a pepsina estén contenidos en los sobrenadantes del cultivo de células a las que se les introduce un vector de alta expresión génica exógena. Los resultados mencionados anteriormente muestran que el vector de expresión de la presente invención tiene capacidad para sintetizar, en células huésped, colágeno que tiene resistencia a pepsina, lo que es una característica equivalente al colágeno hallado en el cuerpo vivo.

30 Los métodos de producción y purificación de las proteínas estructurales de triple hélice de la presente invención se muestran a continuación, sin limitarse a ellas.

Las células de mamífero usadas como célula huésped en la presente invención no están particularmente limitadas, pero son preferentemente células CHO o células HEK293.

35 El cultivo a gran escala de las células CHO o células HEK293 usadas en la presente invención se puede realizar por cultivo por suspensión. Por ejemplo, de 1×10^8 a 1×10^9 células CHO recombinantes a las que se le introduce un vector de expresión de colágeno humano que contiene un gen de neomicina fosfotransferasa debilitado, gen de dihidrofolato reductasa de ratón, y ADNc que codifica colágeno humano o un péptido parcial del mismo se pueden cultivar en un matraz de agitación o un matraz agitador usando de 100 ml a 1 L de medio de cultivo. Después de cultivar estas células durante un periodo de tiempo apropiado, se pueden extraer las proteínas de los sobrenadantes de cultivo recogidos en grandes cantidades.

40 En los sobrenadantes de cultivo de células CHO recombinantes a las que se le introduce el vector de expresión de colágeno humano que contiene gen de neomicina fosfotransferasa debilitado, gen de dihidrofolato reductasa de ratón, y ADNc que codifica colágeno humano o un péptido parcial del mismo, no sólo existen moléculas de colágeno tricatenarias con una estructura de triple hélice, sino también colágeno que no se ha formado en moléculas tricatenarias normales. Como se ha mencionado anteriormente, las moléculas de colágeno que no tienen una estructura de triple hélice se digieren por pepsina. Por tanto, las moléculas de colágeno que carecen de una estructura de triple hélice se pueden retirar por digestión con pepsina. Además, al mismo tiempo este tratamiento puede también degradar y retirar las proteínas distintas de colágeno en los sobrenadantes de cultivo. Usando las características mencionadas anteriormente, las proteínas distintas de colágeno así como el colágeno que carece de una estructura de triple hélice se pueden digerir y retirar por tratamiento directo con pepsina de las proteínas totales presentes en los sobrenadantes de cultivo de células CHO recombinantes a las que se le introduce un vector de expresión de colágeno humano que contiene un gen de neomicina fosfotransferasa debilitado, un gen de dihidrofolato reductasa de ratón, y ADNc que codifica colágeno humano o un péptido parcial del mismo.

En la presente invención, el colágeno humano de interés son todos los colágenos humanos que se conocen actualmente, incluyendo colágenos de tipo I a XXI, y también incluye péptidos parciales de los mismos. El tipo de colágeno de la presente invención no se limita particularmente, pero incluye, como ejemplos representativos, tipo I, tipo II, tipo III, tipo IV, tipo V, tipo VII, tipo IX, tipo XI, tipo XII, tipo XVII, y tipo XVIII, y preferentemente tipo I, tipo II, tipo III. Los tipos I, IV, V, IX y XI consisten en dos o tres tipos de cadenas α , y los tipos II, III, VII, XII, XVII y XVIII consisten en un tipo de cadena α . Cada uno de ellos tiene la siguiente composición molecular, tipo I: $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$, tipo II: $[\alpha 1(II)]_3$, tipo III: $[\alpha 1(III)]_3$, tipo IV: $[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$, tipo V: $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ y $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$, tipo VII: $[\alpha 1(VII)]_3$, tipo IX: $\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$, tipo XI: $\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$, tipo XII: $[\alpha 1(XII)]_3$, tipo XVII: $[\alpha 1(XVII)]_3$, o tipo XVIII: $[\alpha 1(XVIII)]_3$; sin embargo, la composición molecular del colágeno de la presente invención no está particularmente limitada. Además, la composición molecular del colágeno de la presente invención no está restringida a la del colágeno natural, y puede estar compuesta artificialmente de tres tipos diferentes de cadenas α .

La secuencia de nucleótidos de un ADN que codifica la cadena $\alpha 1$ de colágeno de tipo I de la presente invención está indicada en la SEQ ID NO: 1, la secuencia de nucleótidos de un ADN que codifica la cadena $\alpha 2$ de colágeno de tipo I está indicada en la SEQ ID NO: 4, la secuencia de nucleótidos de un ADN que codifica la cadena $\alpha 1$ de colágeno de tipo II está indicada en la SEQ ID NO: 7, y la secuencia de nucleótidos de un ADN que codifica la cadena $\alpha 1$ de colágeno de tipo III está indicada en la SEQ ID NO: 10.

Los ADN que codifican el colágeno de la presente invención incluyen oligonucleótidos que tienen una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 4, 7 y 10, y preferentemente incluyen oligonucleótidos que hibridan selectivamente con oligonucleótidos que tienen una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 4, 7 y 10. "Hibridar selectivamente" se refiere a moléculas que ácidos nucleicos que hibridan con, forman hebras dobles con, o se unen sustancialmente a una molécula que tiene una secuencia predeterminada (es decir, un segundo oligonucleótido) presente en una muestra de ADN o ARN bajo condiciones de hibridación de astringencia apropiada. Las condiciones restrictivas son, por ejemplo, normalmente, condiciones de 42 °C, 2x SSC, y 0,1 % de SDS, preferentemente condiciones de 50 °C, 2x SSC, y 0,1 % de SDS, y más preferentemente condiciones de 65 °C, 0,1x SSC, y 0,1 % de SDS, pero no están particularmente limitadas a estas condiciones. Las condiciones que afectan a la astringencia de la hibridación pueden incluir factores plurales tales como la temperatura y la concentración salina, y los expertos en la técnica pueden seleccionar apropiadamente estos factores para lograr la astringencia más apropiada.

El colágeno producido por la presente invención puede ser moléculas de procolágeno en las que un propéptido se une al extremo N y C terminal, o puede estar en una forma en la el propéptido es eliminado.

En la presente invención, "péptidos parciales de colágeno" se refiere a polipéptidos que están codificados por un 20 % o más (por ejemplo, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 %) de los polinucleótidos de un ADNc que codifica el colágeno. Los péptidos también incluyen aquellos en los que las secuencias de aminoácidos del colágeno están parcialmente modificadas o aquellos que tienen añadida una secuencia de aminoácidos distinta de colágeno.

En la presente invención, "células de mamífero con una expresión de colágeno baja" se refiere a células que producen 50 ng/ml de colágeno o menos cuando se cultivan a una densidad de 1×10^6 células/ml; y ejemplos preferidos son las células CHO y las células HEK293. En la presente invención, "expresión alta" se refiere a la expresión de 10 μ g/ml de colágeno o más, preferentemente la expresión de 50 μ g/ml o más de colágeno.

En la presente invención, "vector de alta expresión génica exógena se refiere, por ejemplo a vectores que comprenden un gen marcador débil seleccionable de fármacos en células de mamífero, de modo que el gen exógeno llevado por el vector se inserte selectivamente en una región que se transcribe activamente del cromosoma en células de mamífero. Estos vectores incluyen preferentemente el vector pNOW/CMV-AA. El vector pNOW/CMV-AA se conoce en JP-A H10-179169. En la presente invención, el método de cultivo puede ser en cultivo de suspensión o de adhesión.

Toda la literatura de la técnica anterior citada en la presente memoria descriptiva está incorporada en el presente documento por referencia.

A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá más específicamente usando ejemplos; sin embargo, no se interpreta como estar limitados a ellos.

[Ejemplo 1] Preparación del vector pNOW/CMV-AA

Se preparó el vector pNOW/CMV-AA usado por un procedimiento conocido (JP-A H10-179169).

[Ejemplo 2] Preparación de vectores de expresión de colágeno (1): aislamiento de ADNc de cadena $\alpha 1$ de tipo I humano

El gen de colágeno de cadena $\alpha 1$ de tipo I humano ya se ha clonado, y ya se ha informado de la secuencia de nucleótidos del mismo (Base de datos génica de EMBL, n.º de acceso: NM 000088). La secuencia se muestra en SEQ ID NO: 1. Se amplificó el ADNc de $\alpha 1$ de tipo I humano a partir de ADNc derivado de testículo humano por el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ("PCR Technology", publicado por Stockton Press

(1989)). Específicamente, la secuencia de longitud completa de SEQ ID NO: 1 se amplificó por PCR usando ADNc derivado de testículo humano (Becton, Dickinson and Company) como plantilla y los oligonucleótidos de SEQ ID N.O: 2 (GCGGCCGCCACCATGTTTCAGCTTTGTGGACCTCCG) y SEQ ID N.O: 3 (TTCTAGATTACAGGAAGCAGACAGGGCCAA) como cebadores. Más específicamente, se llevó a cabo la reacción usando un kit de amplificación de PCR comercialmente disponible (TaKaRa LATAq con tampón GC: Takara Bio Inc.). Se calentó la mezcla de reacción a 94 °C durante 5 minutos, y después se sometió a 35 ciclos de las siguientes tres etapas: desnaturalización (94 °C, 20 segundos), alineamiento de cebadores (60 °C, 30 segundos) y amplificación (72 °C, 3 minutos 30 segundos), seguido de un tratamiento adicional a 72 °C durante 7 minutos para finalizarla reacción. A continuación en el presente documento, se llevaron a cabo todas las reacciones PCR en los ejemplos en el mismo ciclo de reacción. Se separó el producto de PCR obtenido por electroforesis en gel de agarosa y se ligó en un vector de clonación para productos de PCR (kits pT7Blue: Novagen Inc.) usando un kit de ligación (kit de ligación de ADN, ver.2: Takara Bio Inc.). Después de que el ADN ligado se introdujera en la cepa de *Escherichia coli* XL-I Blue, el ADN plasmídico se obtuvo cultivando las colonias resistentes a ampicilina aparecidas en medio LB agar (Difco Inc.). Se escindió un fragmento de ADN que codifica el colágeno de cadena $\alpha 1$ de tipo I humano a partir del ADN del plásmido, y se ligó con un producto digerido con Not I y Xba I del vector pNOW/CMV-AA preparado en el ejemplo 1, usando el kit de ligación de ADN, ver.2. Después de que el ADN ligado se introdujera en la cepa de *Escherichia coli* XL-I Blue, se obtuvo el ADN plasmídico (pNOW-hColla1, fig. 1) cultivando una colonia resistente a ampicilina que apareció en medio LB agar

[Ejemplo 3] Preparación de vectores de expresión de colágeno (2): aislamiento de ADNc de cadena $\alpha 2$ de tipo I humano

El gen de colágeno de cadena $\alpha 2$ de tipo I humano ya se ha clonado, y ya se ha informado de su secuencia de nucleótidos del mismo (Base de datos génica de EMBL, n.º de acceso: NM 000089). La secuencia se muestra en SEQ ID NO 4. Se amplificó el ADNc de $\alpha 2$ de tipo I humano a partir de ADNc derivado de hígado humano por PCR. Específicamente, la secuencia de longitud completa de SEQ ID NO: 4 se amplificó por PCR usando ADNc derivado de hígado humano (Wako Pure Chemical Industries, Ltd) como molde y los oligonucleótidos de SEQ ID NO: 5 (GCGGCCGCCACCATGCTCAGCTTTGTGGATACGCGGA) y SEQ ID NO: 6 (ACTAGTTTATTTGAAACAGACTGGGCCAAT) como cebadores. Se separó el producto de PCR resultante por electroforesis en gel de agarosa y se ligó en un vector de clonación para productos de PCR (kits pT7Blue: Novagen Inc.) usando un kit de ligación (kit de ligación de ADN, ver.2: Takara Bio Inc.). Después de que el ADN ligado se introdujera en la cepa de *Escherichia coli* XL-I Blue, se obtuvo el ADN plasmídico cultivando cuatro colonias resistentes a ampicilina que aparecieron en medio LB agar (Difco Inc.). Se escindió un fragmento de ADN que codifica el colágeno de cadena $\alpha 2$ de tipo I humano a partir del ADN de plásmido, y se ligó en un vector pNOW/CMV-AA escindido con Not I y Xba I usando el kit de ligación de ADN, ver.2. Después de que el ADN ligado se introdujera en la cepa de *Escherichia coli* XL-I Blue, se obtuvo el ADN plasmídico (pNOW-hColla2, fig. 2) cultivando una colonia resistente a ampicilina que apareció en medio LB agar.

[Ejemplo 4] Preparación de vector de expresión de colágeno (3): aislamiento de ADNc de cadena $\alpha 1$ de tipo II humano

El gen de colágeno de cadena $\alpha 1$ de tipo II humano ya se ha clonado, y ya se ha informado de su secuencia de nucleótidos del mismo (Base de datos génica de EMBL, n.º de acceso: NM 001844.1) La secuencia se muestra en SEQ ID NO: 7. Se amplificó el ADNc $\alpha 1$ de tipo II humano a partir de ADNc derivado de testículo humano por PCR. Específicamente, la secuencia de longitud completa de SEQ ID NO: 7 se amplificó por PCR usando ADNc derivado de testículo humano (Becton, Dickinson and Company) como molde y los oligonucleótidos de SEQ ID NO: 8 (GGCCCCGCGGTGAGCCATGATTCGCCTCG) y SEQ ID NO: 9 (TCTAGATTACAAGAAGCAGACCGGCCCTAT) como cebadores. Se separó el producto de PCR obtenido por electroforesis en gel de agarosa y se ligó a un vector de clonación para productos de PCR (kits pT7Blue: Novagen Inc.) usando un kit de ligación (kit de ligación de ADN, ver.2: Takara Bio Inc.). Después de que el ADN ligado se introdujera en la cepa de *Escherichia coli* XL-I Blue, se obtuvo el ADN plasmídico cultivando cuatro colonias resistentes a ampicilina que aparecieron en medio LB agar (Difco Inc.). Se escindió un fragmento de ADN que codifica el colágeno de cadena $\alpha 1$ de tipo II humano a partir del ADN de plásmido, y se ligó con el vector pNOW/CMV-AA escindido con Not I y Xba I usando el kit de ligación de ADN, ver.2. Después de que el ADN ligado se introdujera en la cepa de *Escherichia coli* XL-I Blue, se obtuvo el ADN plasmídico (pNOW-hColla1, fig. 3) cultivando una colonia resistente a ampicilina que apareció en medio LB agar

[Ejemplo 5] Preparación de vectores de expresión de colágeno (4): aislamiento de ADNc de cadena $\alpha 1$ de tipo III humano

El gen de colágeno de cadena $\alpha 1$ de tipo III humano ya se ha clonado, y ya se ha informado de su secuencia de nucleótidos del mismo (Base de datos génica de EMBL, n.º de acceso: X14420). La secuencia se muestra en SEQ ID NO: 10. Se amplificó el ADNc $\alpha 1$ de tipo III humano a partir de ADNc derivado de hígado humano por PCR. Específicamente, la secuencia de longitud completa de SEQ ID NO: 10 se amplificó por PCR usando ADNc derivado de hígado humano (Wako Pure Chemical Industries, Ltd) como molde y los oligonucleótidos de SEQ ID NO: 11 (GCGGCCGCCACCATGATGAGCTTTGTGCAAAAGGGGA) y SEQ ID NO: 12 (TCTAGATTATAAAAAGCAAACAGGGCCAAC) como cebadores. Se separó el producto de PCR obtenido por electroforesis en gel de agarosa y se ligó en un vector de clonación para productos de PCR (kits pT7Blue: Novagen Inc.) usando un kit de ligación (kit de ligación de ADN, ver.2: Takara Bio Inc.). Después de que el ADN ligado se

introdujera en la cepa de *Escherichia coli* XL-I Blue, se obtuvo el ADN plasmídico cultivando cuatro colonias resistentes a ampicilina que aparecieron en medio LB agar. Se escindió un fragmento de ADN que codifica el colágeno de cadena $\alpha 1$ de tipo I humano a partir del ADN de plásmido, y se ligó en el vector pNOW/CMV-AA escindido con Not I and Xba I usando el kit de ligación de ADN, ver.2. Después de que el ADN ligado se introdujera en la cepa de *Escherichia coli* XL-I Blue, se obtuvo el ADN plasmídico (pNOW-hColla1, fig. 4) cultivando una colonia resistente a ampicilina que apareció en medio LB agar

[Ejemplo 6] Producción de colágeno humano de tipo I: transferencia del gen de colágeno humano de tipo I usando los vectores de expresión pNOW-hColla1 y pNOW-hColla2, y establecimiento de clones primarios resistentes a G418.

Se transfirió un microgramo de cada uno de pNOW-hColla1 y pNOW-hColla2 obtenidos en los ejemplos 2 y 3 a 1,5 millones de células CHO deficientes en DHFR (células DG44 CHO; proporcionadas por Dr. Gail Urlaub) en un matraz de cultivo de 25 cm² por el método de lipofectina (reactivo de transfección Effectene, QIAGEN Inc.). Se llevó a cabo el procedimiento de transferencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 48 horas, se retiraron las células por tratamiento con tripsina y se contó el número de células. Después, se diluyeron 5x10⁵ células con 100 ml de medio de Dulbecco modificado de Iscove que contenía 0,8 mg/ml de G418 y un 10 % de suero fetal bovino dializado, y después se sembraron en diez placas de microvaloración de 96 pocillos (960 pocillos), seguido de cultivo a 37 °C durante tres semanas bajo la presencia de un 5 % de gas dióxido de carbono. Se transfirieron las células vivas en 197 pocillos a placas de 24 pocillos con 1 ml de medio Dulbecco modificado de Iscove que contenía 0,8 mg/ml de G418 y un 10 % de suero fetal bovino dializado y se cultivaron hasta confluencia. Después de desechar los sobrenadantes de cultivo, se añadió 1 ml de PBS (Invitrogen Inc.) en cada pocillo, y se descartaron de nuevo los sobrenadantes de cultivo. Se añadieron 0,5 ml de ProCHO4 (Takara Bio Inc.), un medio CD para células CHO, a cada pocillo y se cultivó a 37 °C durante 96 horas bajo la presencia de un 5 % de gas dióxido de carbono. Posteriormente, se examinó la cantidad de colágeno humano de tipo I producido en los sobrenadantes de cultivo.

[Ejemplo 7] Ensayo cuantitativo del colágeno humano de tipo I producido en clones celulares transducidos con pNOW-hColla1 y pNOW-hColla2

Se ensayó la cantidad producida por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. Se mezclaron 12,5 μ l del sobrenadante de cultivo con un volumen igual de solución de tratamiento de muestra Tris-SDS β -ME (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.), y se trató con calor a 95 °C durante 5 minutos. Se cargó la mezcla sobre un gel de poliacrilamida con SDS (PAGEL, ATTO Inc.) y se fraccionó por electroforesis. Después de la electroforesis, se detectó el colágeno humano de tipo I en el gel de poliacrilamida y se cuantificó tratando el gel con solución de tinción azul brillante de Coomassie (Amersham Biosciences). Como control comparativo, se usaron de 12,5 μ g/ml a 100 μ g/ml de colágeno humano de tipo I (Cosmo Bio Co., Ltd.) tratado de la misma manera.

[Ejemplo 8] Producción de colágeno humano de tipo I

Entre las líneas celulares resistentes a G418, se estabilizó un clon celular que produjo la mayor cantidad de colágeno humano de tipo I efectuando pases y cultivando. El nivel de colágeno humano de tipo I producido fue de 85 μ g/ml de medio de cultivo (cuatro días).

[Ejemplo 9] Análisis de SDS-PAGE de colágeno humano de tipo I recombinante en sobrenadantes de cultivo

Se ajustó el clon celular que producía masivamente colágeno humano de tipo I obtenido por amplificación genética hasta 1 x 10⁶ células/ml en un matraz de cultivo de 25 cm² usando la solución de cultivo celular IS CHO-CD (IS Japan Co., Ltd.). Después de cultivar a 37 °C durante 96 horas bajo la presencia de un gas dióxido de carbono al 5 %, se recogió el fluido de cultivo. Se retiraron las células por centrifugación para obtener un sobrenadante de cultivo. Se mezclaron 12,5 μ l del sobrenadante de cultivo con un volumen igual de solución de tratamiento de muestra Tris-SDS β -ME (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.), y se trató con calor a 95 °C durante 5 minutos. Se cargó la mezcla sobre un gel de poliacrilamida con SDS (PAGEL, ATTO Inc.) y se fraccionó por electroforesis. La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS descrita a continuación se llevó a cabo de la misma manera. Después de que terminara la electroforesis, se detectó el colágeno humano de tipo I en el gel de poliacrilamida tratando el gel con solución de tinción azul brillante de Coomassie (Amersham Biosciences). Se usaron 100 μ g/ml de colágeno humano de tipo I tratado de la misma manera como control comparativo. La fig. 5 muestra el resultado del análisis de SDS-PAGE del sobrenadante de cultivo obtenido a partir del clon celular que produce colágeno humano de tipo I. Los polipéptidos de 150 y 170 kDa que pueden ser cadenas $\alpha 1$ de colágeno humano de tipo I recombinante, y los polipéptidos de 130 y 150 kDa que pueden ser cadenas $\alpha 2$ de colágeno humano de tipo I recombinante se detectaron en el sobrenadante de cultivo.

[Ejemplo 10] Digestión con pepsina y análisis SDS-PAGE de colágeno humano de tipo I recombinante en el sobrenadante de cultivo

La digestión con pepsina del sobrenadante de cultivo obtenido a partir del clon celular que produce colágeno humano de tipo I se llevó a cabo añadiendo ácido acético al 99,7 % al sobrenadante hasta una concentración final de 0,5 M y luego la pepsina (Sigma Inc.) hasta una concentración final de 24 unidades/ml, seguido por incubación a 20 °C durante dos horas. La digestión con pepsina descrita a continuación se llevó a cabo de la misma manera. Se analizó la muestra obtenida de la digestión con pepsina por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. 185 μ g/ml de colágeno humano de tipo I recombinante disponible comercialmente (Beckton, Dickinson and Company) se usaron como control

comparativo. La fig. 6 muestra el resultado analítico de los productos digeridos con pepsina por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. Como se observó con el atelocolágeno humano de tipo I disponible comercialmente, cuando se trató con pepsina, se detectó el colágeno humano de tipo I recombinante en el sobrenadante de cultivo como polipéptidos de 130 y 120 kDa, que puede ser de cadena $\alpha 1$ y $\alpha 2$, respectivamente. Estos hechos mostraron que el colágeno humano de tipo I recombinante que tiene una resistencia a pepsina sustancialmente equivalente a la del tipo natural estaba contenido en el sobrenadante de cultivo obtenido a partir del clon celular que produce colágeno humano de tipo I.

[Ejemplo 11] Análisis por Western blot del colágeno humano de tipo I recombinante en el sobrenadante de cultivo

Se sumergió el gel de poliacrilamida después de la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS en un tampón de transferencia, y después se transfirió el colágeno humano de tipo I en el gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF por un procedimiento convencional. Después del bloqueo con Block Ace, se hizo reaccionar la membrana con 2 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo contra la cadena $\alpha 1$ del colágeno humano de tipo I y después con un anticuerpo de IgG anti-cabra marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Se detectaron los anticuerpos que reaccionaron por un procedimiento que usa el reactivo de peroxidasa TMB para detectar la actividad de HRP (Funakoshi Co.). Se usaron 50 $\mu\text{g/ml}$ de colágeno humano de tipo I recombinante (Beckton, Dickinson and Company) como control comparativo. Se detectó la cadena $\alpha 2$ del colágeno humano de tipo I usando un anticuerpo contra la cadena $\alpha 2$ del colágeno humano de tipo I en lugar de un anticuerpo de cadena $\alpha 1$ del colágeno humano de tipo I. Se usaron 10 $\mu\text{g/ml}$ de colágeno humano de tipo I como control comparativo. La fig. 7 muestra el resultado del análisis por Western blot. Un polipéptido de 170 kDa que puede ser una cadena $\alpha 1$ del colágeno humano de tipo I que se puede unir por un anticuerpo anti-cadena $\alpha 1$ del colágeno humano de tipo I y los polipéptidos de 130 y 150 kDa que pueden ser cadenas $\alpha 2$ de colágeno humano de tipo I recombinante que se pueden unir por un anticuerpo anti-cadena $\alpha 2$ del colágeno humano de tipo I, se detectaron en el sobrenadante de cultivo.

[Ejemplo 12] Purificación de colágeno humano de tipo I en el sobrenadante de cultivo

Se purificaron 100 ml del sobrenadante de cultivo que contenía colágeno humano de tipo I como sigue.

Se concentraron los 100 ml de sobrenadante de cultivo filtrados a través de un filtro de membrana de 0,45 μm (Millipore Co.) hasta 30 ml por centrifugación a 3.000 rpm a 4 °C usando un filtro de concentración para centrifuga (VIVASPIN20 (MWCO 10,000): Sartorius).

Se llevó a cabo el desalado añadiendo gradualmente 30 ml de solución de sulfato de amonio al 90 % al sobrenadante de cultivo concentrado anterior mientras se agitaba a 4 °C. Después de que se añadiera toda la solución de sulfato de amonio, se agitó adicionalmente la mezcla durante una hora. Después, se dejó que la muestra permaneciera en hielo durante una hora, y después se centrifugó a 18.000 rpm, 4 °C durante 30 minutos en una centrifuga refrigerada de alta velocidad. Se insolubilizó el colágeno en la solución desalando y flotó sobre la superficie de la solución, y después se recogió y se solubilizó completamente en 5 ml de D-PBS (Sigma Co.). Se filtró esta solución a través de un filtro de membrana de 0,45 μm (Millipore Co.), y después se purificó por filtración en gel usando Superose 6 (Amersham Biosciences) equilibrada con D-PBS, y se aisló el primer pico. Se concentró la fracción de pico recogida aproximadamente 20 veces usando VIVASPIN6 (MWCO 100.000). Se añadió una cantidad apropiada de D-PBS a la solución de colágeno concentrada para concentración adicional, y se retiraron los fragmentos de peso molecular bajo. Se repitió esta adición de D-PBS al menos tres veces o más.

Se concentró una solución de colágeno purificada obtenida a partir del sobrenadante de cultivo de 100 ml original hasta aproximadamente 300 μl y se sometió a electroforesis por SDS-PAGE para confirmar su pureza.

[Ejemplo 13] Prueba de producción de colágeno humano de tipo II: transferencia del gen de colágeno humano de tipo II usando el vector de expresión pNOW-hColla1 y establecimiento de clones primarios resistentes a G418.

Se transfirió un microgramo de pNOW-hColla1 en 1,5 millones de células CHO-DG44 en un matraz de cultivo de 25 cm^2 usando un método con lipofectina. Se llevó a cabo el método de transferencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 48 horas, se retiraron las células por tratamiento con tripsina y se contó el número de células. se diluyeron 5×10^5 células con 100 ml de medio de Dulbecco modificado de Iscove que contenía 0,8 mg/ml de G418 y un 10 % de suero fetal bovino dializado, y después se sembraron en diez placas de microvaloración de 96 pocillos (960 pocillos), seguido de cultivo a 37 °C durante tres semanas bajo la presencia de un 5 % de gas dióxido de carbono. Se transfirieron las células vivas en 126 pocillos a placas de 24 pocillos con 1 ml de medio Dulbecco modificado de Iscove que contenía 0,8 mg/ml de G418 y un 10 % de suero fetal bovino dializado y se cultivaron hasta la confluencia. Después de que se desecharon los sobrenadantes de cultivo, se añadió 1 ml de PBS (Invitrogen Inc.) en cada pocillo, y se descartaron de nuevo los sobrenadantes de cultivo. Se añadieron 0,5 ml de ProCHO4 (Takara Bio Inc.), un medio CD libre de suero para células CHO, a cada pocillo y se cultivó a 37 °C durante 96 horas bajo la presencia de un 5 % de gas dióxido de carbono. A continuación, se examinó la cantidad de colágeno humano de tipo II producido en los sobrenadantes de cultivo.

[Ejemplo 14] Ensayo cuantitativo del colágeno humano de tipo II producido en clones celulares transducidos con pNOW-hColla1

Se ensayó la cantidad producida por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. Se mezclaron 7,5 µl del sobrenadante de cultivo con un volumen igual de solución de tratamiento de muestra Tris-SDSβ-ME (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.), y se trató con calor a 95 °C durante 5 minutos. Se cargó la mezcla sobre un gel de poliacrilamida con SDS (PAGEL, ATTO Inc.) y se fraccionó por electroforesis. Después de que finalizara la electroforesis, se detectó el colágeno humano de tipo II en el gel de poliacrilamida y se cuantificó tratando el gel con solución de tinción azul brillante de Coomassie (Amersham Biosciences). Como control comparativo, se usaron de 12,5 µg/ml a 100 µg/ml de colágeno humano de tipo II (Cosmo Bio Co., Ltd.) tratado de la misma manera.

[Ejemplo 15] Amplificación de genes en líneas celulares resistentes a G418

Entre las líneas celulares resistentes a G418, se estabilizó un clon celular que producía la mayor cantidad de colágeno humano de tipo II efectuando pases y cultivando, y después se llevó a cabo una amplificación de genes usando MTX. Primero, se llevó a cabo la amplificación en un medio que contenía MTX 5 nM durante una semana, un medio que contenía MTX 25 nM durante una semana, un medio que contenía MTX 50 nM durante una semana, un medio que contenía MTX 250 nM durante tres semanas y un medio que contenía MTX 1 µM durante tres semanas. Como resultado, el nivel de producción de colágeno humano de tipo II se incrementó hasta 70 µg/ml de medio de cultivo (cuatro días) cuando MTX alcanzó 25 nM. En general, se usan concentraciones de MTX múltiples de entre 10 nM y 10 µM para la amplificación de genes, y 10 µM a menudo se usa como concentración final. Sin embargo, la exposición a una concentración alta es problemática cuando se establecen líneas celulares recombinantes estables debido a la toxicidad celular. Por tanto, también es importante que se logre el criterio de productividad alta a concentraciones de MTX bajas, y por tanto, en este experimento se usaron concentraciones de hasta 1 µM. Además, aunque el periodo de exposición a MTX, incluyendo la selección, normalmente es de seis a doce meses, el presente experimento se realizó aproximadamente en nueve semanas. A pesar de estas condiciones experimentales, se encontró que la cantidad de colágeno humano de tipo II producido se incrementó eficazmente. La amplificación de genes en las líneas celulares resistentes a G418 descrita a continuación se llevó a cabo de la misma manera.

[Ejemplo 16] Análisis de colágeno humano de tipo II recombinante en el sobrenadante de cultivo por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

Se ajustó el clon celular que producía masivamente colágeno humano de tipo II obtenido por amplificación de genes hasta 1×10^6 células/ml en un matraz de cultivo de 25 cm² usando la solución de cultivo celular IS CHO-CD (IS Japan Co., Ltd.). Después de cultivar a 37 °C durante 96 horas bajo la presencia de un gas dióxido de carbono al 5 %, se recogió el fluido de cultivo y se retiraron las células por centrifugación para obtener un sobrenadante de cultivo. Se mezclaron 7,5 µl del sobrenadante de cultivo con un volumen igual de solución de tratamiento de muestra Tris-SDSβ-ME (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.), y se trató con calor a 95 °C durante 5 minutos. Se cargó la mezcla sobre un gel de poliacrilamida con SDS (PAGEL, ATTO Inc.) y se fraccionó por electroforesis. La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS descrita a continuación se llevó a cabo de la misma manera. Después de que terminara la electroforesis, se detectó el colágeno humano de tipo II en el gel de poliacrilamida tratando el gel con solución de tinción azul brillante de Coomassie (Amersham Biosciences). Se usaron 100 µg/ml de colágeno humano de tipo II (Cosmo Bio Co., Ltd.) tratado de la misma manera como control comparativo. La fig. 8 muestra el resultado del análisis de SDS-PAGE del sobrenadante de cultivo obtenido a partir del clon celular que produce colágeno humano de tipo II. Los polipéptidos de 170 y 200-kDa que pueden ser colágeno humano de tipo II recombinante se detectaron en el sobrenadante de cultivo.

[Ejemplo 17] Análisis por Western blot del colágeno humano de tipo II recombinante en el sobrenadante de cultivo

Se sumergió el gel de poliacrilamida después de la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS en un tampón de transferencia, y después se transfirió el colágeno humano de tipo II en el gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF por un método convencional. Después del bloqueo con Block Ace, se hizo reaccionar la membrana con 1 µg/ml de un anticuerpo contra la cadena del colágeno humano de tipo II (Cosmo Bio Co., Ltd.) y después con un anticuerpo de IgG anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Se detectaron los anticuerpos que reaccionaron por un método de detección de la actividad de HRP usando el reactivo de peroxidasa TMB (Funakoshi Co.). Se usaron 10 µg/ml de colágeno humano de tipo II (Cosmo Bio Co., Ltd.) como control comparativo. El polipéptido de 170 kDa que puede ser colágeno humano de tipo II recombinante que se puede unir a un anticuerpo contra la cadena de colágeno humano de tipo II se detectó en el sobrenadante de cultivo (fig. 9).

[Ejemplo 18] Digestión con pepsina y análisis de SDS-PAGE y análisis por Western blot de colágeno humano de tipo II recombinante en el sobrenadante de cultivo

Se analizó una muestra obtenida de la digestión con pepsina por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. Se usaron 100 µg/ml de colágeno humano de tipo II (Cosmo Bio Co., Ltd.) como control comparativo. La fig. 10 muestra el resultado de analizar los productos digeridos con pepsina por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. Como se observó con el atelocolágeno humano de tipo II disponible comercialmente, cuando se trató con pepsina, el colágeno humano de tipo II recombinante en el sobrenadante de cultivo se detectó como un polipéptido de 130 kDa. Estos hechos mostraron que el colágeno humano de tipo II recombinante que tiene una resistencia a pepsina sustancialmente equivalente a la del tipo natural estaba contenido en el sobrenadante de cultivo obtenido a partir del clon celular que produce colágeno humano de tipo II. Se obtuvieron los mismos resultados por Western blot (fig. 11).

[Ejemplo 19] Prueba de producción de colágeno humano de tipo III: transferencia de gen de colágeno humano de tipo III usando el vector de expresión pNOW-hColIIIa1 y establecimiento de clones primarios resistentes a G418.

5 Se transfirió un microgramo de pNOW-hColIIIa1 en 1,5 millones de células CHO-DG44 en un matraz de cultivo de 25 cm² por un procedimiento con lipofectina. Se llevó a cabo el procedimiento de transferencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 48 horas, se retiraron las células por tratamiento con tripsina y se contó el número de células. Después, se diluyeron 3x 10³ células con 100 ml de medio de Dulbecco modificado de Iscove que contenía 0,8 mg/ml de G418 y un 10 % de suero fetal bovino dializado, y se sembraron en diez placas de microvaloración de 96 pocillos (960 pocillos), seguido de cultivo a 37 °C bajo la presencia de un 5 % de gas dióxido de carbono durante tres semanas. Como resultado, sólo se encontraron células vivas en 117 pocillos (resistentes a G418). Se transfirieron las células vivas a placas de 24 pocillos con 1 ml de medio Dulbecco modificado de Iscove que contenía 0,8 mg/ml de G418 y un 10 % de suero fetal bovino dializado y se cultivó hasta confluencia. Después de que se desecharon los sobrenadantes de cultivo, se añadió 1 ml de PBS (Invitrogen Inc.) en cada pocillo, y se descartaron de nuevo los sobrenadantes de cultivo. Se añadieron 0,5 ml de CHO-S-SFM II (Invitrogen Inc.), un medio libre de suero para células CHO, a cada pocillo y se cultivó a 37 °C durante 72 horas bajo la presencia de un 5 % de gas dióxido de carbono. Posteriormente, se examinó la cantidad de colágeno humano de tipo III producido en los sobrenadantes de cultivo.

[Ejemplo 20] Ensayo cuantitativo del colágeno humano de tipo III producido en clones celulares transducidos con pNOW-hColIIIa1

20 Se sometió a ensayo la cantidad producida por un procedimiento de transferencia en mancha. Se manchó una membrana de nailon con 1 µl de sobrenadante de cultivo de 72 horas, 1 µl cada de cada colágeno humano de tipo III disponible comercialmente (Beckton, Dickinson and Company) 2x diluido (de 0,125 a 8 µg/ml) en un medio libre de suero para células CHO, CHO-S-SFM II, y un 1 µl de CHO-S-SFM II solo; y después se secó en aire durante una hora. Después del bloqueo con Block Ace, se hizo reaccionar la membrana con 1 µg/ml de un anticuerpo anti-colágeno humano de tipo III (Cosmo Bio Co., Ltd) y después con un anticuerpo de IgG anti-ratón marcado con HRP. Se detectaron los anticuerpos que reaccionaron por un procedimiento de detección de la actividad de con el reactivo SuperSignal West Pico usando Lumino Capture.

[Ejemplo 21] Amplificación de genes en líneas celulares resistentes a G418

30 Entre las líneas celulares resistentes a G418, se estabilizó un clon celular que producía la mayor cantidad de colágeno humano de tipo III efectuando pases y cultivando, y después se llevó a cabo una amplificación de genes con MTX. Se llevó a cabo la amplificación de genes primero en un medio que contenía MTX 15 nM durante dos semanas, un medio que contenía MTX 60 nM durante dos semanas, un medio que contenía MTX 250 nM durante dos semanas, y un medio que contenía MTX 1 µM durante cuatro semanas. Como resultado, el nivel de producción de colágeno humano de tipo III se incrementó hasta 225 µg/ml de medio de cultivo (tres días).

[Ejemplo 22] Análisis SDS-PAGE del colágeno humano de tipo III recombinante en el sobrenadante de cultivo

35 Se ajustó el clon celular que producía masivamente colágeno humano de tipo III obtenido por amplificación de genes hasta 1 x 10⁶ células/ml en un matraz de cultivo de 25 cm² usando el medio de cultivo IS CHO-CD (IS Japan Co., Ltd.). Después de cultivar a 37 °C durante 96 horas bajo la presencia de un gas dióxido de carbono al 5 %, se recogió el fluido de cultivo y se retiraron las células por centrifugación para obtener un sobrenadante de cultivo. Se mezclaron 6,0 µl del sobrenadante de cultivo con un volumen igual de solución de tratamiento de muestra Tris-SDSB-ME (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.), y se trató con calor a 95 °C durante 5 minutos. Se cargó la mezcla sobre un gel de poliacrilamida con SDS (PAGEL, ATTO Inc.) y se fraccionó por electroforesis. La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS descrita a continuación se llevó a cabo de la misma manera. Después de que terminara la electroforesis, se detectó el colágeno humano de tipo III en el gel de poliacrilamida tratando el gel con solución de tinción azul brillante de Coomassie (Amersham Biosciences). Se usaron 100 µg/ml de colágeno humano de tipo III (Beckton, Dickinson and Company) tratado de la misma manera como control comparativo. La fig. 12 muestra el resultado del análisis de SDS-PAGE del sobrenadante de cultivo obtenido a partir del clon celular que produce colágeno humano de tipo III. Los polipéptidos de 140 y 170 kDa que pueden ser colágeno humano de tipo III recombinante se detectaron en el sobrenadante de cultivo.

[Ejemplo 23] Análisis por Western blot del colágeno humano de tipo III recombinante en el sobrenadante de cultivo

50 Se sumergió el gel de poliacrilamida después de la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS en un tampón de transferencia, y después se transfirió el colágeno humano de tipo III en el gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF por un procedimiento convencional. Después del bloqueo con Block Ace, se hizo reaccionar la membrana con 1 µg/ml de un anticuerpo contra la cadena del colágeno humano de tipo III (Cosmo Bio Co., Ltd) y después con un anticuerpo de IgG anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Se detectaron los anticuerpos que reaccionaron por un procedimiento de detección de la actividad de HRP usando el reactivo de peroxidasa TMB (Funakoshi Co.). Se usaron 100 µg/ml de colágeno humano de tipo III (Beckton, Dickinson and Company) como control comparativo. Los polipéptidos de 140 y 170 kDa que pueden ser colágeno humano de tipo III recombinante que se pueden unir a un anticuerpo contra la cadena de colágeno humano de tipo III se detectaron en el sobrenadante de

cultivo (fig. 13).

Como se observó con el atelocolágeno humano de tipo III disponible comercialmente (Beckton, Dickinson and Company), cuando se trató con pepsina, el colágeno humano de tipo III recombinante en el sobrenadante de cultivo se detectó como un polipéptido de 130 kDa. Estos hechos mostraron que el colágeno humano de tipo III recombinante que tiene una resistencia a pepsina sustancialmente equivalente a la del tipo natural estaba contenido en el sobrenadante de cultivo obtenido a partir del clon celular que produce colágeno humano de tipo III.

[Ejemplo 24] Purificación de colágenos humanos de tipo I y de tipo III en los sobrenadantes de cultivo

Se llevó a cabo la purificación usando 100 ml del sobrenadante de cultivo que contenía colágeno humano de tipo I o de tipo III en el ejemplo 12. Se concentró una solución de colágeno purificada obtenida del sobrenadante de cultivo de 100 ml original hasta aproximadamente 300 µl y se sometió a electroforesis por SDS-PAGE para confirmar su pureza. (fig. 14).

Aplicabilidad industrial

La presente invención puede proporcionar vectores de expresión y células que producen colágeno humano que permiten la producción de colágeno humano recombinante que tiene una calidad alta y que está más próximo al de tipo natural. La invención también puede proporcionar células que producen colágeno humano con estructura de triple hélice.

Los métodos de producción de la presente invención no sólo se pueden aplicar a colágeno sino también a proteínas que tienen una estructura de triple hélice, tales como colectina.

Además, el método de producción de colágeno de la presente invención se puede usar para producir grandes cantidades de colágeno con estructura de triple hélice con una composición molecular novedosa, que no se puede producir (o no se ha descubierto) en la naturaleza, expresando simultáneamente diferentes tipos de cadenas α. El colágeno con estructura de triple hélice con una composición molecular novedosa puede tener propiedades que son diferentes de las del colágeno conocido, y por lo tanto se espera que se pueda aplicar como un material nuevo.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.
GOBIERNO DE LA PREFECTURA DE OSAKA

<120> PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA QUE TIENE UNA ESTRUCTURA HELICOIDAL TRIPLE

<130> EP54146HV121pau

<140> aún no asignado

<141> adjunto

<150> PCT/JP2006/306941

<151> 2006-03-31

<150> JP 2005-102999

<151> 2005-03-31

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 4395

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 1
atgttcagct ttgtggacct cgggtcctg ctctcttag cggccaccgc cctcctgacg 60
cacggccaag aggaaggcca agtcgagggc caagacgaag acatcccacc aatcacctgc 120
gtacagaacg gcctcaggta ccatgaccga gacgtgtgga aacccgagcc ctgccggatc 180
tgcgtctgcy acaacggcaa ggtgttgtgc gatgacgtga tctgtgacga gaccaagaac 240
tgccccggcg ccgaagtccc cgagggcgag tgctgtcccg tctgccccga cggctcagag 300
tcaccaccg accaagaaac caccggcgtc gagggacca agggagacac tggccccga 360
ggcccaaggg gacccgcagg cccccctggc cgagatggca tccctggaca gcctggactt 420
cccggacccc ccggaccccc cggacctccc ggacccccctg gcctcggagg aaactttgct 480
ccccagctgt cttatggcta tgatgagaaa tcaaccggag gaatttccgt gcctggcccc 540
atgggtcctt ccggtcctcg tggctcctt ggccccctg gtgcacctg tccccaggc 600
ttccaaggtc cccctggtga gcctggcgag cctggagctt caggtcccat gggccccga 660
ggtccccag gtccccctgg aaagaatgga gatgatggg aagctgaaa acctggtcgt 720
cctggtgagc gtgggcctcc tgggcctcag ggtgcccag gattgcccgg aacagctggc 780
ctccttgaa tgaagggaca cagaggtttc agtggtttg atggtgcaa gggagatgct 840
ggtcctgctg gtccaaagg tgagcctggc agccctggtg aaaatggag tcctggtcag 900
atgggcccc gtggcctgcc tggtgagaga ggtcgcctg gagcccctg ccctgctggt 960
gctcgtgaa atgatggtgc tactggtgct gccgggcccc ctggtccac cggccccgct 1020
ggtcctcctg gcttccctgg tgctgttgg gctaagggtg aagctggtcc ccaagggccc 1080
cgaggctctg aaggtcccca ggggtgtcgt ggtgagcctg gccccctgg ccctgctggt 1140

gctgctggcc ctgctggaaa ccctgggtgct gatggacagc ctgggtgctaa aggtgccaat 1200
ggtgctcctg gtattgctgg tgctcctggc ttcctggtg cccgaggccc ctctggaccc 1260
cagggccccg gcggccctcc tgggcccaag ggtaacagcg gagaacctgg tgctcctggc 1320
agcaaaggag acactggtgc taagggagag cctggccctg ttgggtgttca aggacccct 1380
ggccctgctg gagaggaagg aaagcgagga gctcgaggtg aaccggacc cactggcctg 1440
cccggacccc ctggcgagcg tgggtgacct ggtagccgtg gtttcctgg cgcagatggt 1500
gttgctggtc ccaaggtcc cgctgggtgaa cgtggttctc ctggccctgc tggcccaaa 1560
ggatctcctg gtgaagctgg tcgtcccggg gaagctggtc tgcttgggtc caaggtctg 1620
actggaagcc ctggcagccc tggctctgat ggcaaaactg gccccctgg tcccgccgt 1680
caagatggtc gccccggacc cccaggccca cctgggtgcc gtggtcaggc tgggtgtgatg 1740
ggattccctg gacctaaagg tgctgctgga gagcccggca aggctggaga gcgaggtgtt 1800
cccggacccc ctggcgctgt cggctctgct ggcaaagatg gagaggctgg agctcagga 1860
ccccctggcc ctgctggtcc cgctggcgag agaggtgaac aaggccctgc tggctcccc 1920
ggattccagg gtctccctgg tcctgctggt cctccaggtg aagcaggcaa acctggtgaa 1980
caggtgttc ctggagacct tggcgccct ggcccctctg gagcaagagg cgagagaggt 2040
ttcctggcg agcgtggtgt gcaaggtccc cctggctctg ctgggtcccc aggggccaac 2100
ggtgctcccg gcaacgatgg tgctaagggt gatgctggtg cccctggagc tcccggtagc 2160
cagggcgccc ctggccttca gggaatgcct ggtgaacgtg gtgcagctgg tctccaggg 2220
cctaaggtg acagaggtga tgctgggtccc aaaggtgctg atggctctcc tggcaaagat 2280
ggcgtccgtg gtctgaccgg cccattggt cctcctggcc ctgctggtgc ccctggtgac 2340
aaggtgaaa gtggtcccag cggccctgct ggtcccactg gagctcgtgg tgccccgga 2400
gaccgtggtg agcctggtcc ccccggccct gctggctttg ctggccccc tggtgctgac 2460
ggccaacctg gtgctaaagg cgaacctggt gatgctggtg ctaaaggcga tgctggtccc 2520
cctggccctg ccggacccgc tggacccct ggcccattg gtaatgttg tgctcctgga 2580
gcaaaggtg ctcgcggcag cgctgggtccc cctgggtgcta ctggtttccc tgggtgctgt 2640
ggccgagtcg gtccctcctg cccctctgga aatgctggac cccctggccc tcctggtcct 2700
gctggcaaag aaggcggcaa aggtccccgt ggtgagactg gccctgctgg acgtcctggt 2760
gaagttggtc cccctggtcc ccctggccct gctggcgaga aaggatccc tgggtgctgat 2820
ggtcctgctg gtgctcctgg tactcccggg cctcaaggta ttgctggaca gcgtggtgtg 2880
gtcggcctgc ctggtcagag aggagagaga ggcttcctg gtcttcctgg ccctctggt 2940
gaacctggca aacaaggtcc ctctggagca agtgggtgaa gtggtcccc tgggtccatg 3000
ggccccctg gattggtg accccctggt gaatctggac gtgagggggc tcctggtgcc 3060
gaaggttccc ctggacgaga cggttctct ggcccaagg gtgaccgtgg tgagaccggc 3120
cccgtggac cccctggtgc tcctggtgct cctgggtgcc ctggccccgt tggccctgct 3180

ggcaagagtg gtgatcgtgg tgagactggt cctgctggtc ccgccgggcc tgtcggccct 3240
 gttggcgccc gtggccccgc cggaccccaa ggccccctg gtgacaaggg tgagacaggc 3300
 gaacagggcg acagaggcat aaagggctcac cgtggcttct ctggcctcca gggccccct 3360
 ggccctcctg gctctcctgg tgaacaaggt ccctctggag cctctgggcc tgctgggtccc 3420
 cgaggcctcc ctggctctgc tgggtctcct ggcaaagatg gactcaacgg tctccctggc 3480
 cccattgggc cccctgggcc tcgctggctgc actgggtgatg ctggctcctgt tggcccccc 3540
 ggccctcctg gacctcctgg tccccctggc cctcccagcg ctggtttcga cttcagcttc 3600
 ctgccccagc cacctcaaga gaaggctcac gatgggtggcc gctactaccg ggctgatgat 3660
 gccaatgtgg ttcgtgaccg tgacctcgag gtggacacca ccctcaagag cctgagccag 3720
 cagatcgaga acatccggag cccagagggc agccgcaaga accccgcccg cacctgcccgt 3780
 gacctcaaga tgtgccactc tgactggaag agtggagagt actggattga ccccaaccaa 3840
 ggctgcaacc tggatgccat caaagtcttc tgcaacatgg agactgggtga gacctgctgtg 3900
 taccctactc agcccagtggt ggcccagaag aactgggtaca tcagcaagaa ccccaaggac 3960
 aagaggcatg tctggttcgg cgagagcatg accgatggat tccagttcga gtatggcggc 4020
 cagggctccg accctgccga tgtggccatc cagctgacct tctgctcct gatgtccacc 4080
 gaggcctccc agaacatcac ctaccactgc aagaacagcg tggcctacat ggaccagcag 4140
 actggcaacc tcaagaaggc cctgctcctc cagggctcca acgagatcga gatccgcgcc 4200
 gagggcaaca gccgcttcac ctacagcgtc actgtcgtatg gctgcacgag tcacaccgga 4260
 gcctggggca agacagtgat tgaatacaaa accaccaaga cctcccgcct gcccatcatc 4320
 gatgtggccc ccttgacgt tgggtgcccc gaccaggaat tcggcttcga cgttggccct 4380
 gtctgcttcc tgtaa 4395

<210> 2
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>

<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

10

<400> 2
 ggggcccga ccatgttcag cttgtggac ctccg

35

<210> 3
 <211> 30

15

<212> ADN
 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

20

<400> 3
 ttctagatta caggaagcag acaggccaa

30

25

<210> 4
 <211> 4101

ES 2 387 467 T3

<212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 atgctcagct ttgtggatac gcggactttg ttgctgcttg cagtaacctt atgcctagca 60
 acatgccaat ctttacaaga ggaaactgta agaaagggcc cagccggaga tagaggacca 120
 cgtggagaaa ggggtccacc agggccccca ggcagagatg gtgaagatgg tcccacaggc 180
 cctcctggtc cacctgggcc tcttggcccc cctggctctg gtgggaactt tgctgctcag 240
 tatgatggaa aaggagtgg acttggccct ggaccaatgg gcttaatggg acctagaggc 300
 ccacctggtg cagctggagc cccaggccct caaggtttcc aaggacctgc tggtgagcct 360
 ggtgaacctg gtcaaacctg tcttgcaggt gctcgtggtc cagctggccc tcttggcaag 420
 gctggtgaag atggtcacc tggaaaacc ggacgacctg gtgagagagg agttgttga 480
 ccacaggggtg ctcgtggttt ccctggaact cctggacttc ctggcttcaa aggcattagg 540
 ggacacaatg gtctggatgg actgaaggga cagcccgggtg ctcctggtgt gaagggtgaa 600
 cctggtgccc ctggtgaaaa tggaaactca ggtcaaacag gagccccgtg gcttcttggc 660
 gagagaggac gtgttgggtg ccctggcccc gctggtgccc gtggcagtg tggaaagtgtg 720
 ggtcccgtgg gtcctgctgg tcccattggg tctgctggcc ctccaggctt cccaggtgcc 780
 cctggccccca agggtgaaat tggagctgtt ggtaacgctg gtcctgctgg tcccggcgg 840
 ccccgtggtg aagtgggtct tccaggcctc tccggccccg ttggacctcc tggtaatcct 900
 ggagcaaacg gccttactgg tgccaagggt gctgctggcc tccccggcgt tgctggggct 960
 cccggcctcc ctggaccccc cggatttcct ggcctgttg gtgctgccgg tgctactggt 1020
 gccagaggac ttgttggtga gcctggcca gctggctcca aaggagagag cggtaacaag 1080
 ggtgagcccc gctctgctgg gccccaagg cctcctggtc ccagtgtga agaaggaaag 1140
 agagccccta atggggaagc tggatctgcc ggccctccag gacctctgg gctgagaggt 1200
 agtccctggt ctcgtggcct tcttggagct gatggcagag ctggcgtcat gggccctcct 1260
 ggtagtctgt gtgcaagtgg ccctgctgga gtccgaggac ctaatggaga tgctggtcgc 1320
 cctgggggagc ctggtctcat gggaccaga ggtcttctg gttccccctg aaatatcggc 1380
 cccgctggaa aagaaggctc tgtcggcctc cctggcatcg acggcaggcc tggccaatt 1440
 ggccccctg gagcaagagg agagcctggc aacattggat tccctggacc caaaggcccc 1500
 actggtgatc ctggcaaaaa cggtgataaa ggtcatgctg gtcttctggt tgctcgggg 1560
 gctccaggtc ctgatggaaa caatggtgct cagggacctc ctggaccaca ggggtgtcaa 1620
 ggtggaaaag gtgaacaggg tcccgtggt cctccaggct tccagggtct gcctggcccc 1680
 tcaggctccg ctggtgaagt tggcaacca ggagaaagg gcctccatgg tgagtttgg 1740
 ctccctggtc ctgctggtcc aagaggggaa cgcggctccc caggtagag tggctgctgc 1800
 ggtcctactg gtcctattgg aagccgaggt ccttctggac cccagggcc tgatggaac 1860

aagggtgaac ctggtgtggt tgggtgctgtg ggcaactgctg gtccatctgg tcctagtgga 1920
ctcccaggag agaggggtgc tgctggcata cctggaggca agggagaaaa ggggtgaacct 1980
ggtctcagag gtgaaattgg taaccctggc agagatggtg ctctgtggtc ccctggtgct 2040
gtaggtgccc ctggtcctgc tggagccaca ggtgaccggg gcgaagctgg ggctgctggt 2100
cctgctggtc ctgctggtcc tcggggaagc cctggtgaac gtggtgaggt cggtcctgct 2160
ggccccaatg gatttgcctg tcctgctggt gctgctggtc aacctggtgc taaaggagaa 2220
agaggagcca aaggccctaa gggtgaaaac ggtgttgttg gtcccacagg ccccgttgga 2280
gctgctggcc cagctggtcc aaatggtccc cccggtcctg ctggaagtcg tggatgatgga 2340
ggccccctg gtatgactgg tttccctggt gctgctggac ggaccggtcc cccaggacct 2400
tctggtatct ctggccctcc tggccccctt ggtcctgctg ggaaagaagg gcttcgtggt 2460
ctctgtggtg accaaggctc agttggccga actggagaag taggtgcagt tggccccct 2520
ggcttcgctg gtgagaaggg tcccctctgga gaggtcggta ctgctggacc tcctggcact 2580
ccaggtcctc agggctctct tgggtctcct ggtattctgg gtctccctgg ctcgagaggt 2640
gaacgtggtc taccaggtgt tgctggtgct gtgggtgaac ctggtcctct tggcattgcc 2700
ggccctcctg gggcccgtgg tcctcctggt getgtgggta gtccctggagt caacgggtgct 2760
cctggtgaag ctggtcgtga tggcaaccct gggaacgatg gtccccagg tcgcatggt 2820
caaccggac acaagggaga gcgcggttac cctggcaata ttggtcccgt tgggtgctgca 2880
ggtgcacctg gtccctcatg ccccggtggg cctgctggca aacatggaaa ccgtggtgaa 2940
actggtccct ctggtcctgt tggctcctgct ggtgctggtg gcccaagagg tcctagtggc 3000
ccacaaggca tctgtggcga taagggagag cccggtgaaa aggggcccag aggtcttctc 3060
ggcttaaagg gacacaatg attgcaaggc ctgctcggta tcgctggtca ccattggtgat 3120
caagggtgctc ctggtcctgt gggctcctgct ggtcctaggg gcctgctgg tccttctggc 3180
cctgctggaa aagatggtcg cactggacat cctggtacag ttggacctgc tggcattcga 3240
ggccctcagg gccaccaagg ccctgctggc ccccctggc cccctggccc tcctggacct 3300
ccagggtgaa gcggtggtgg ttatgacttt ggttacgatg gagacttcta cagggtgac 3360
cagcctcgtc cagcacctc tctcagacc aaggactatg aagttgatgc tactctgaag 3420
tctctcaaca accagattga gacccttctt actcctgaag gctctagaaa gaaccagct 3480
cgcacatgcc gtgacttgag actcagccac ccagagtgga gcagtggta ctactggatt 3540
gaccctaacc aaggatgcac tatggatgct atcaaagtat actgtgattt ctctactggc 3600
gaaacctgta tccgggccca acctgaaaac atcccagcca agaactggta taggagctcc 3660
aaggacaaga aacacgtctg gctaggagaa actatcaatg ctggcagcca gtttgaatat 3720
aatgtagaag gagtgacttc caaggaaatg gctacccaac ttgccttcat gcgcctgctg 3780
gccaactatg cctctcagaa catcacctac cactgcaaga acagcattgc atacatggat 3840
gaggagactg gcaacctgaa aaaggctgct attctacagg gctctaata tgttgaactt 3900

gttgctgagg gcaacagcag gttcacttac actgttcttg tagatggctg ctctaaaaag 3960
 acaaatgaat ggggaaagac aatcattgaa tacaaaacaa ataagccatc acgcctgccc 4020
 ttccttgata ttgcacctti ggacatcggg ggtgctgacc aggaattctt tgtggacatt 4080
 ggcccagtct gtttcaaata a 4101

5 <210> 5
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 5
 gcggccgcca ccatgctcag ctttgtaggac acgcgga 37

15 <210> 6
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 6
 actagttat ttgaaacaga ctgggccaat 30

25 <210> 7
 <211> 4257
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 atgattcgcc tccggtgctc ccagtcgctg gtgctgctga cgctgctcgt cgcctgctg 60
 cttcgggtgctc agggccagga tgtccggcaa ccaggaccaa agggacagaa aggagaacct 120
 ggagacatca aggatattgt aggacccaaa ggacctcctg ggcctcaggg acctgcaggg 180
 gaacaaggac ccagagggga tcgtggtgac aaaggtgaaa aaggtgcccc tggacctcgt 240
 ggagagatg gagaacctgg gacccctgga aatcctggcc cccctggtcc tccggcccc 300
 cctggtcccc ctggtcttgg tggaaacttt gctgcccaga tggctggagg atttgatgaa 360
 aaggctggtg gcgcccagtt gggagtaatg caaggaccaa tgggccccat gggacctcga 420
 ggacctccag gccctgcagg tgctcctggg cctcaaggat ttcaaggcaa tcctggtgaa 480
 cctggtgaa cctggtgtctc tgggtccatg ggtccccgtg gtcctcctgg tccccctgga 540
 aagcctggtg atgatggtga agctggaaa cctggaaaag ctggtgaaag gggctccgct 600
 ggtcctcagg gtgctcgtgg ttcccagga acccagggc ttctggtgt caaaggtcac 660
 agaggttatc caggcctgga cgggtgctaag ggagaggcgg gtgctcctgg tgtgaagggt 720
 gagagtggtt ccccgggtga gaacggatct cgggcccga tgggtcctcg tggcctgcct 780
 ggtgaaagag gacggactgg ccctgctggc gctgcgggtg cccgaggcaa cgatggtcag 840
 ccaggccccg cagggcctcc gggctcctgct ggtcctgctg gtggtcctgg ctcccctggt 900

30

gctcctggag ccaagggtga agccggcccc actggtgccc gtggtcctga aggtgctcaa 960
 ggtcctcgcg gtgaacctgg tactcctggg tccccgggc ctgctggtgc ctccggtaac 1020
 cctggaacag atggaattcc tggagccaaa ggatctgctg gtgctcctgg cattgctggt 1080
 gctcctggct tccctgggcc acggggccct cctggccctc aagggtgcaac tggctcctcg 1140
 ggccccgaaag gtcagacggg tgaacctggt attgctggct tcaaagggtga acaaggcccc 1200
 aaggggagaac ctggccctgc tggccccag ggagcccctg gaccctgctg tgaagaaggc 1260
 aagagagggtg cccgtggaga gcctggtggc gttgggcca tcggtcccc tggagaaaga 1320
 ggtgctcccg gcaaccgcgg tttcccaggt caagatggtc tggcaggtcc caaggagacc 1380
 cctggagagc gaggggccag tggctctgct ggccccagg gagccaacgg tgaccctggc 1440
 cgtcctggag aacctggcct tcctggagcc cggggtctca ctggccgccc tggatgatgct 1500
 ggtcctcaag gcaaagttgg cccttctgga gccctggtg aagatggtcg tcctggacct 1560
 ccaggtcctc agggggctcg tgggcagcct ggtgtcatgg gtttcctgg ccccaaaggc 1620
 gccaacgggtg agcctggcaa agctggtgag aagggactgc ctggtgctcc tggctctgagg 1680
 ggtcttcctg gcaaagatgg tgagacaggt gctgcaggac cccctggccc tgctggacct 1740
 gctggtgaac gaggcgagca ggggtctcct gggccatctg ggttccaggg acttctctggc 1800
 cctcctggtc ccccaggtga aggtggaaaa ccaggtgacc aggggtgtcc cggtgaagct 1860
 ggagcccctg gcctcgtggg tcccaggggt gaacgaggtt tcccaggtga acgtggctct 1920
 cccggtgccc agggcctcca gggtecccg ggcctcccc gactcctgg cactgatggt 1980
 cccaaagggtg catctggccc agcaggcccc cctggggctc agggccctcc aggtcttcag 2040
 ggaatgcctg gcgagagggg agcagctggt atcgtgggc ccaaagggtga caggggtgac 2100
 gttggtgaga aaggccctga gggagcccct ggaaaggatg gtggacgagg cctgacaggt 2160
 cccattggcc cccctggccc agctggtgct aacggcgaga agggagaagt tggacctcct 2220
 ggtcctgcag gaagtgctgg tgctcgtggc gctccgggtg aacgtggaga gactgggccc 2280
 cccggaccag cgggatttgc tgggcctcct ggtgctgatg gccagcctgg ggccaagggt 2340
 gagcaaggag aggccggcca gaaaggcgat gctggtgccc ctggtcctca gggccctct 2400
 ggagcaccty ggcctcaggg tcctactgga gtgactggtc ctaaaggagc ccgaggtgcc 2460
 caaggcccc cgggagccac tggattccct ggagctgctg gccgcgttg acccccaggc 2520
 tccaatggca accctggacc ccctggtccc cctggtcctt ctggaaaaga tggteccaaa 2580
 ggtgctcgag gagacagcgg cccccctggc cgagctggtg aaccggcct ccaaggtcct 2640
 gctggacccc ctggcgagaa gggagagcct ggagatgacg gtccctctgg tgccgaaggc 2700
 ccaccaggtc cccaggtctt ggctggtcag agaggcatcg tcggtctgcc tgggcaacgt 2760
 ggtgagagag gattccctgg cttgcctggc ccgtcgggtg agcccggcaa gcagggtgct 2820
 cctggagcat ctggagacag aggtcctcct ggccccgtgg gtccctcctg cctgacgggt 2880
 cctgcaggtg aacctggacg agagggaaagc cccggtgctg atggcccccc tggcagagat 2940

ggcgctgctg gagtcaaggg tgatcgtggt gagactggtg ctgtgggagc tcctggagcc 3000
 cctgggcccc ctggctcccc tggccccgct ggtccaactg gcaagcaagg agacagagga 3060
 gaagctggtg cacaaggccc catgggaccc tcaggaccag ctggagcccc gggaatccag 3120
 ggtcctcaag gccccagagg tgacaaagga gaggctggag agcctggcga gagaggcctg 3180
 aagggacacc gtggcttcac tggctgcag ggtctgccc gcccctctgg tccttctgga 3240
 gaccaaggtg cttctggtcc tgctggtcct tctggccta gaggctctcc tggccccgct 3300
 ggtccctctg gcaaagatgg tgctaattga atccctggcc ccattgggccc tcctggtccc 3360
 cgtggacgat caggcgaaac cggccctgct ggtcctcctg gaaatcctgg accccctggt 3420
 cctccaggtc cccctggccc tggcatcgac atgtccgct ttgctggtt aggcccgaga 3480
 gagaagggcc cggacccct gcagtacatg cgggccgacc aggcagccgg tggcctgaga 3540
 cagcatgacg cggagtgga tgccacactc aagtcctca acaaccagat tgagagcatc 3600
 cgcagccccg agggctcccc caagaaccct gctcgcacct gcagagacct gaaactctgc 3660
 cacctgagt ggaagagtgg agactactgg attgacccca accaaggctg caccttggaac 3720
 gccatgaagg ttttctgcaa catgggagact ggcgagactt gcgtctaccc caatccagca 3780
 aacgttccca agaagaactg gtggagcagc aagagcaagg agaagaaaca catctggtt 3840
 ggagaaacca tcaatggtgg cttccatttc agctatggag atgacaatct ggctcccaac 3900
 actgccaacg tccagatgac cttcctacgc ctgctgtcca cggaaggctc ccagaacatc 3960
 acctaccact gcaagaacag cattgcctat ctggacgaag cagctggcaa cctcaagaag 4020
 gccctgctca tccagggtc caatgacgtg gagatccggg cagagggcaa tagcaggtc 4080
 acgtacactg ccctgaagga tggctgcacg aaacataccg gtaagtgggg caagactgtt 4140
 atcgagtacc ggtcacagaa gacctcacgc ctccccatca ttgacattgc acccatggac 4200
 ataggagggc cggagcagga attcgggtgtg gacatagggc cggctctgctt cttgtaa 4257

- 5 <210> 8
- <211> 29
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
- <400> 8
- ggccccgctg tgagccatga ttcgctcg 29

- 15 <210> 9
- <211> 30
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 20 <220>
- <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
- <400> 9
- tctagattac aagaagcaga cggccctat 30

- 25 <210> 10
- <211> 4401
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

<400> 10
atgatgagct ttgtgcaaaa ggggagctgg ctacttctcg ctctgcttca tcccactatt 60
atthttggcac aacaggaagc tghtgaagga ggatgttccc atcttgggtca gtectatgcy 120
gatagagatg tctggaagcc agaaccatgc caaatatgtg tctgtgactc aggatccggt 180
ctctgcygatg acataatatg tgacgatcaa gaattagact gcccacaacc agaaattcca 240
tttggagaat gttgtgcagt ttgccacag cctccaactg ctctactcg ccctcctaatt 300
ggtaaggac ctcaaggccc caagggagat ccaggccctc ctggtattcc tgggagaaat 360
ggtgaccctg gtattccagg acaaccaggg tccccgtgtt ctctggccc ccctggaatc 420
tgtgaatcat gccctactgg tcctcagaac tattctcccc agtatgattc atatgatgtc 480
aagtctggag tagcagtagg aggactcga ggctatcctg gaccagctgg cccccaggc 540
cctcccggtc ccctggtac atctggtcat cctggtccc ctggatctcc aggataccaa 600
ggacccccctg gtgaacctgg gcaagctggc ccttcaggcc ctccaggacc tcctggtgct 660
ataggtccat ctggtcctgc tggaaaagat ggagaatcag gtagaccgcy acgacctgga 720
gagcggagat tgcctggacc tccaggtatc aaaggtccag ctgggatacc tggattccct 780
ggatgaaaag gacacagagg ctctgatgga cgaaatggag aaaaggggtga aacaggtgct 840
cctggattaa aggggtgaaaa tggctctcca ggcgaaaatg gagctcctgg acctatgggt 900
ccaagagggg ctctggtgga gcgaggacgg ccaggacttc ctggggctgc aggtgctcgg 960
ggtaatgacg gtgctcgagg cagtgatggt caaccaggcc ctctggtcc tcctggaact 1020
gccgattcc ctggatcccc tggtgccaag ggtgaagttg gacctgcagg gtctcctggt 1080
tcaaatggtg cccctggaca aagaggagaa cctggacctc agggacacgc tggtgctcaa 1140
ggtcctcctg gccctcctgg gattaatggt agtcctggtg gtaaaggcga aatgggtccc 1200
gctggcattc ctggagctcc tggactgatg ggagcccggg gtcctccagg accagccggt 1260
gctaattggtg ctctggaact gcgaggtggt gcaggtgagc ctggtaagaa tggtgccaaa 1320
ggagagcccc gaccacgtgg tgaacgcggc gaggctggca ttccaggtgt tccaggagct 1380
aaaggcgaag atggcaagga tggatcacct ggagaacctg gtgcaaatgg gcttccagga 1440
gctgcaggag aaaggggtgc ccctgggttc cgaggacctg ctggaccaa tggcatccca 1500
ggagaaaagg gtcctgctgg agagcgtggt gctccaggcc ctgcagggcc cagaggagct 1560
gctggagaac ctggcagaga tggcgtccct ggaggtccag gaatgagggg catgcccgga 1620
agtccaggag gaccaggaag tgatgggaaa ccaggccctc ccggaagtca aggagaaagt 1680
ggtcgaccag gtcctcctgg gccatctggt ccccagggtc agcctggtgt catgggcttc 1740
cccggcccta aaggaaatga tggtgctcct ggtaagaatg gagaacgagg tggccctgga 1800

ggacctggcc ctcagggctcc tcctggaaa aatggtgaaa ctggacctca gggaccccc 1860
 gggcctactg ggcctgggtg tgacaaaagga gacacaggac cccctggctc acaaggatta 1920
 caaggcttgc ctggtagcagg tggctcctcca ggagaaaatg gaaaacctgg ggaaccagg 1980
 ccaaaggggtg atgccgggtgc acctggagct ccaggaggca agggatgatgc tggtgcccc 2040
 ggtgaacgtg gacctcctgg attggcaggg gccccaggac ttagagggtg agctggctcc 2100
 cctggctccc aaggaggaaa ggggtgctgct ggtcctcctg ggccacctgg tgctgctggt 2160
 actcctggte tgcaaggaat gcctggagaa agaggaggte ttggaagtcc tggtcctaa 2220
 ggtgacaagg gtgaaccagg cggctcagggt gctgatggtg tcccaggaa agacggccca 2280
 aggggtccta ctggctctat tggctcctct gggccagctg gccagcctgg agataagggt 2340
 gaagggtggt cccccggact tccaggata gctggacctc gtggtagccc tggtagaga 2400
 ggtgaaactg gccctccagg acctgctggt ttccctgggt ctcctggaca gaatggtgaa 2460
 cctggtggtg aaggagaaa aggggctccg ggtgagaaa gtgaaggagg cctcctgga 2520
 gttgcaggac cccctggagg ttctggacct gctggtcctc ctggctccc aggtgtcaa 2580
 ggtgaacgtg gcagctcctg tggacctggt gctgctggtc tcctgggtgc tctggtctt 2640
 cctggctctc ctggtagtaa tggtaaacca ggacccccag gtcccagcgg ttctccaggc 2700
 aaggatgggc ccccaggctc tgcgggtaac actggtgctc ctggcagccc tggagtgtct 2760
 ggacccaaaag gtgatgctgg ccaaccagga gagaaggat cgcctggtgc ccaggccca 2820
 ccaggagctc caggcccact tgggattgct gggatcactg gagcacgggg tcttgagga 2880
 ccaccaggca tgccaggctc taggggaagc cctggcccc aggggtgtaa gggtgaaagt 2940
 gggaaaccag gagctaaccg tctcagtggg gaacgtggte cccctggacc ccagggtctt 3000
 cctggctctg ctggtacagc tgggtgaacct ggaagagatg gaaacctgg atcagatggt 3060
 cttccaggtc gagatggatc tcctggtggc aagggtgatc gtggtgaaa tggctctcct 3120
 ggtgccccctg gcgctcctgg tcatccgggc ccacctggte ctgtcggctc agctgaaaag 3180
 agtggtgaca gaggagaaa tggccctgct gggcctgctg gtgctcccgg tcctgctggt 3240
 tcccagggtg ctctgggtcc tcaaggccca cgtggtgaca aagggtgaa aggtgaaagt 3300
 ggagctgctg gcatcaaagg acatcgagga ttccctggta atccagggtc ccaggttct 3360
 ccaggccctg ctggctagca ggggtgcaatc ggcagtccag gacctgcagg cccagagga 3420
 cctgttgac ccagtggacc tcctggcaaa gatggaacca gtggacatcc aggtccatt 3480
 ggaccaccag ggcctcgagg taacagagg gaaagaggat ctgagggtc cccaggccac 3540
 ccagggaac caggccctcc tggacctcct ggtgccccctg gtcctgctg tgggtggtgt 3600
 ggagccgctg ccattgctgg gattggagg gaaaaagctg gcggttttgc cccgtattat 3660
 ggagatgaac caatggattt caaatcaac accgatgaga ttatgacttc actcaagtct 3720
 gttaatggac aatatgaaa cctcattagt cctgatggtt ctcgtaaaaa ccccctaga 3780
 aactgcagag acctgaaatt ctgccatcct gaactcaaga gtggagaata ctgggttgac 3840

cctaaccaag gatgcaaatt ggatgctatc aaggatttct gtaatatgga aactggggaa 3900
 acatgcataa gtgccaatcc tttgaatggt ccacggaaac actggtggac agattctagt 3960
 gctgagaaga aacacgtttg gtttgagag tccatggatg gtggttttca gtttagctac 4020
 ggcaatcctg aacttcctga agatgtcctt gatgtgcagc tggcattcct tcgacttctc 4080
 tccagccgag cttcccagaa catcacatat cactgcaaaa atagcattgc atacatggat 4140
 caggccagtg gaaatgtaaa gaaggccctg aagctgatgg ggtcaaatga aggtgaattc 4200
 aaggctgaag gaaatagcaa attcacctac acagttctgg aggatggtg cacgaaacac 4260
 actggggaat ggagcaaaac agtctttgaa tatcgaacac gcaaggctgt gagactacct 4320
 attgtagata ttgcacccta tgacattggt ggtcctgatc aagaatttgg tgtggacgtt 4380
 ggccctgttt gctttttata a 4401

- 5 <210> 11
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
- 10 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
- <400> 11
 gcggccgcca ccatgatgag ctttgtaaa aagggga 37
- 15 <210> 12
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
- 20 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
- <400> 12
 tctagattat aaaaagcaaa caggccaac 30

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de una proteína que tiene una estructura de triple hélice, en el que el método comprende:
 - (a) introducir ADN que codifica una proteína que tiene una estructura de triple hélice en un vector;
 - (b) transformar una células de ovario de hámster chino (CHO) por transferencia del vector génico; y
 - (c) cultivar o reproducir el transformante, y recoger la proteína que tiene una estructura de triple hélice de la célula o del sobrenadante del cultivo de la misma,
- 5 en el que la proteína que tiene una estructura de triple hélice es colágeno humano de tipo I o un péptido parcial del mismo.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el colágeno humano de tipo I es un complejo de cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$.
- 10 3. El método de la reivindicación 1, en el que el ADN que codifica una proteína que tiene una estructura de triple hélice es al menos un ADN seleccionado de:
 - (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 ó 4; y
 - (b) un ADN que hibrida bajo condiciones astringentes con un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 ó 4.
- 15 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el vector que se va a introducir con el ADN que codifica una proteína que tiene una estructura de triple hélice es pNOW/CMV-AA.

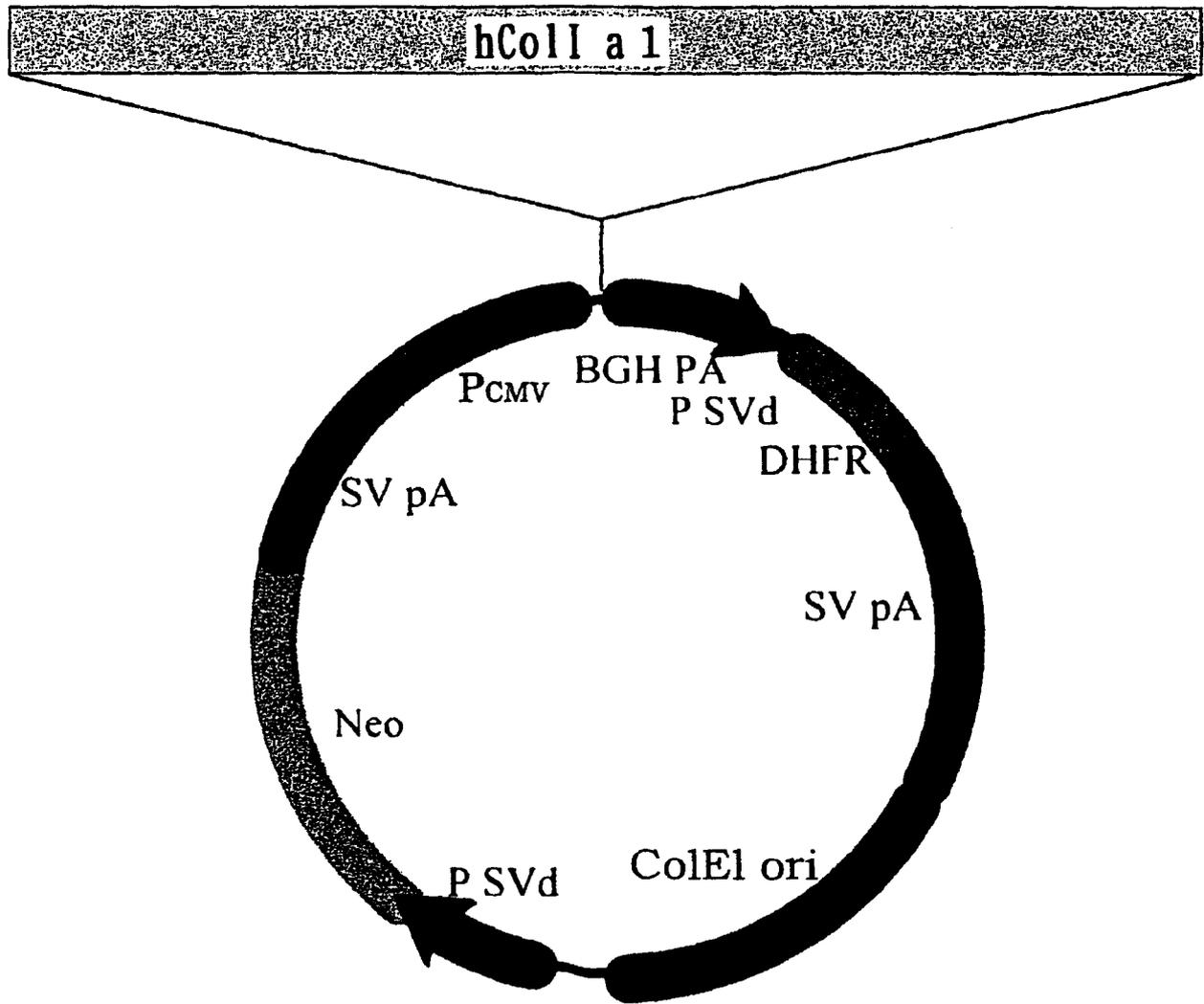


FIG. 1

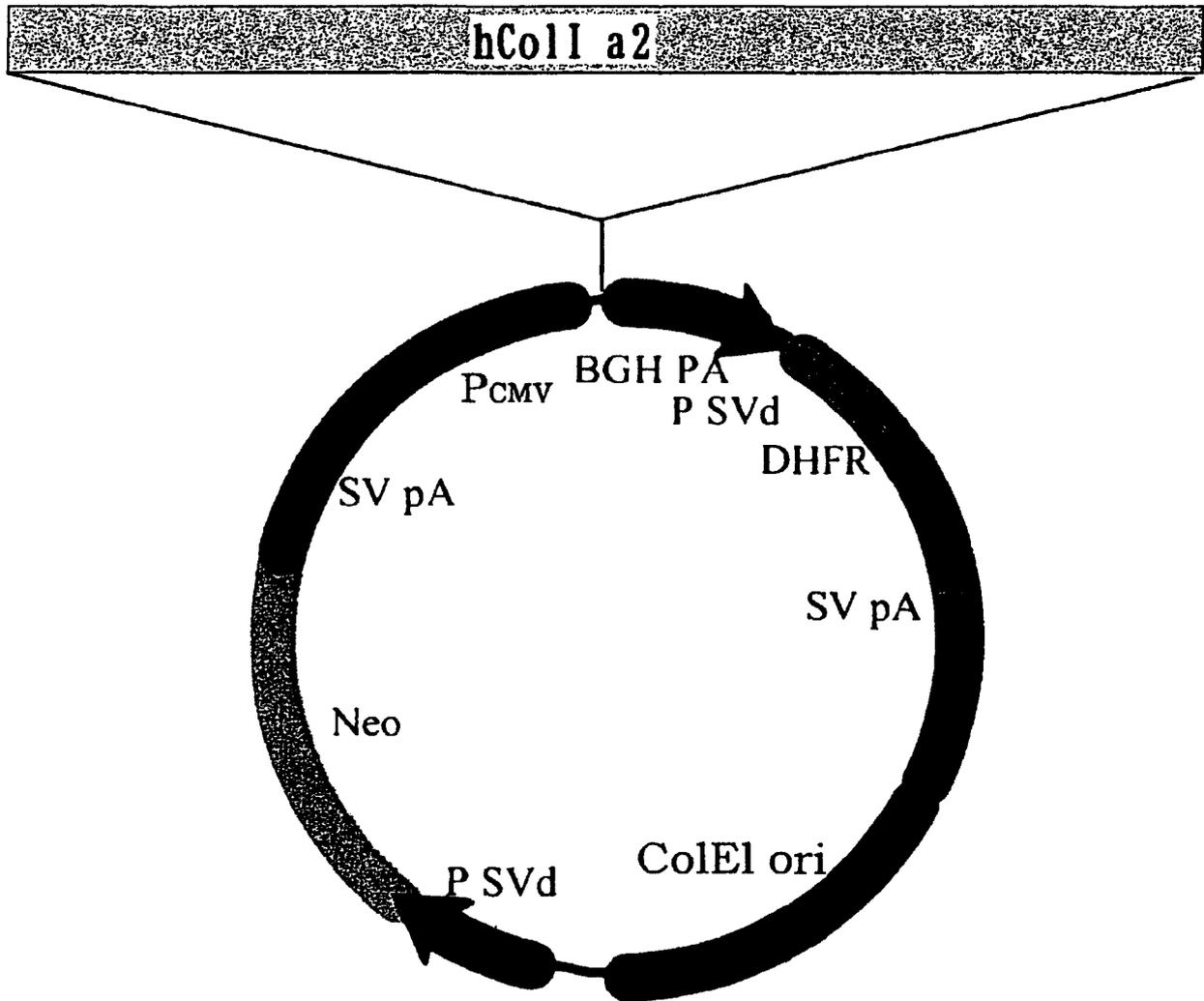


FIG. 2

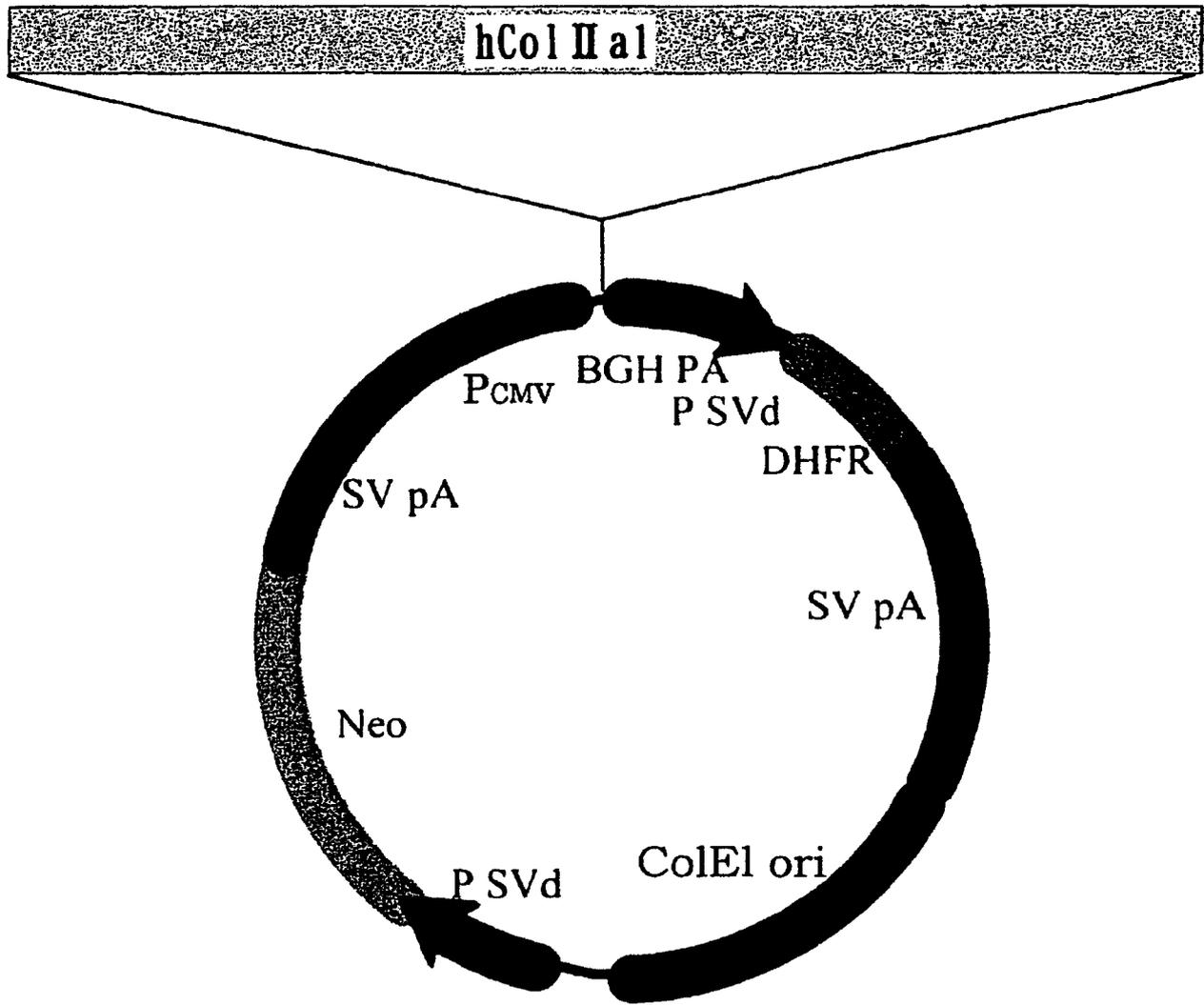


FIG. 3

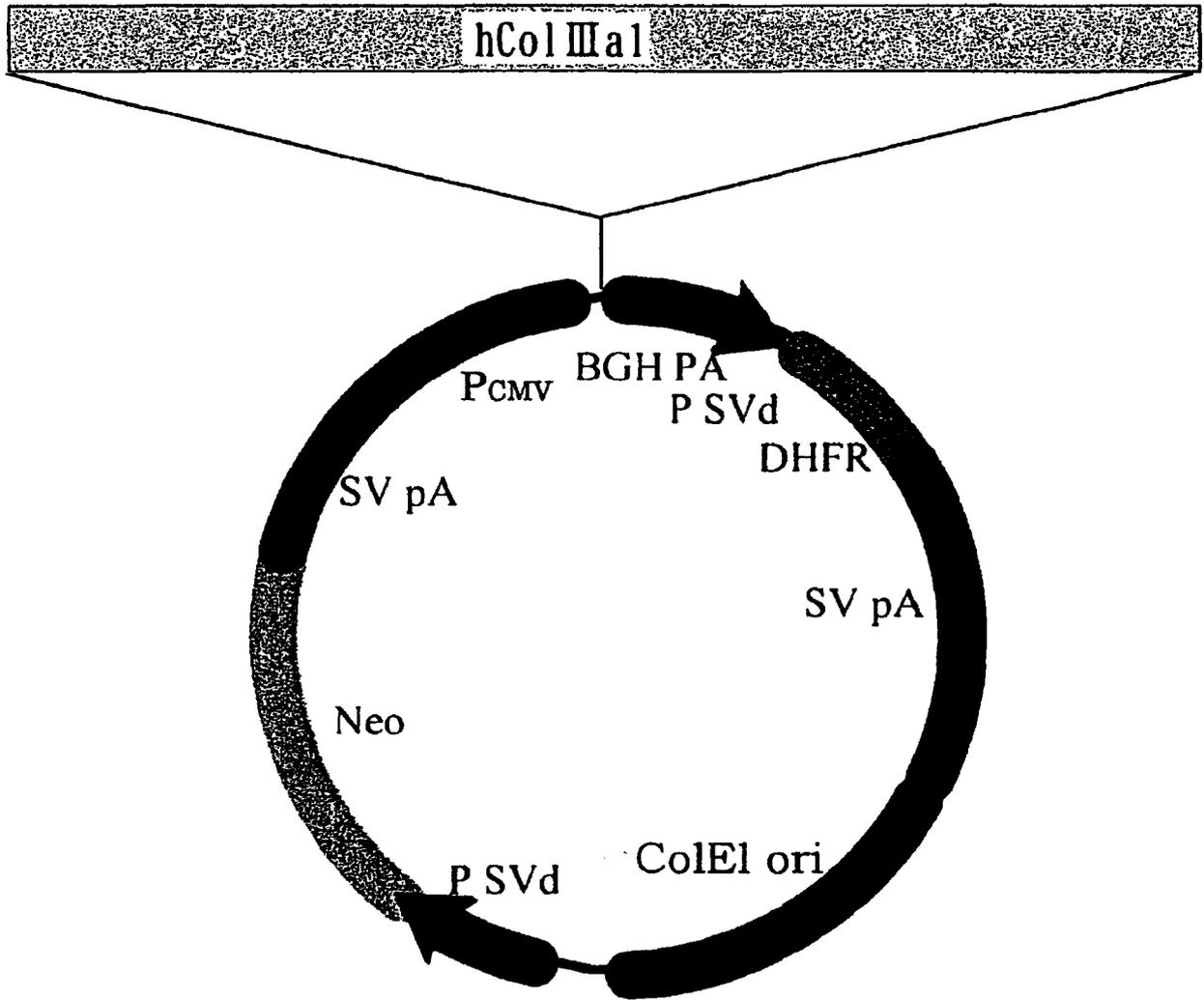


FIG. 4

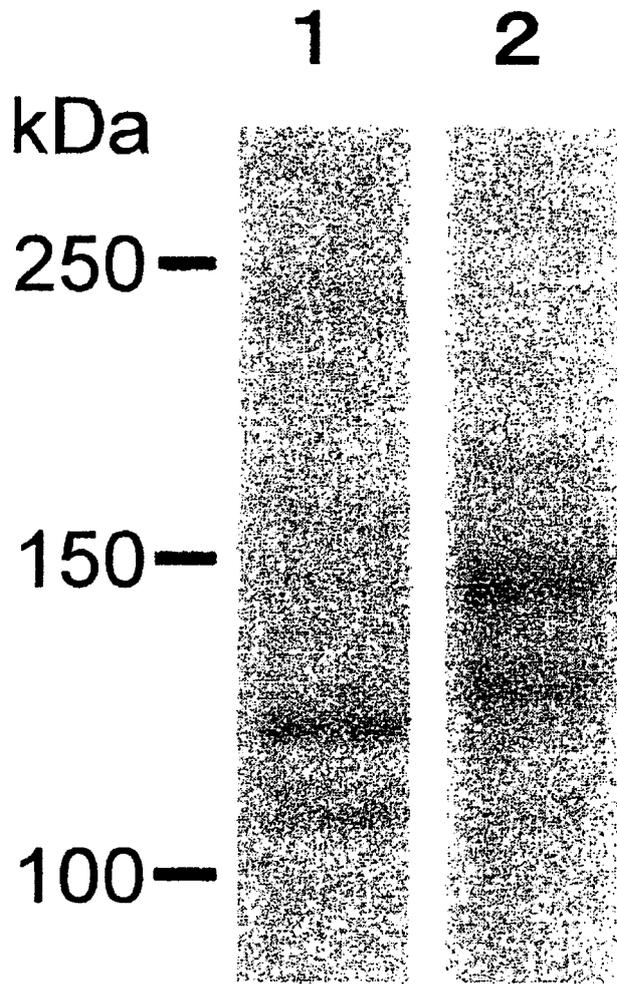


FIG. 5

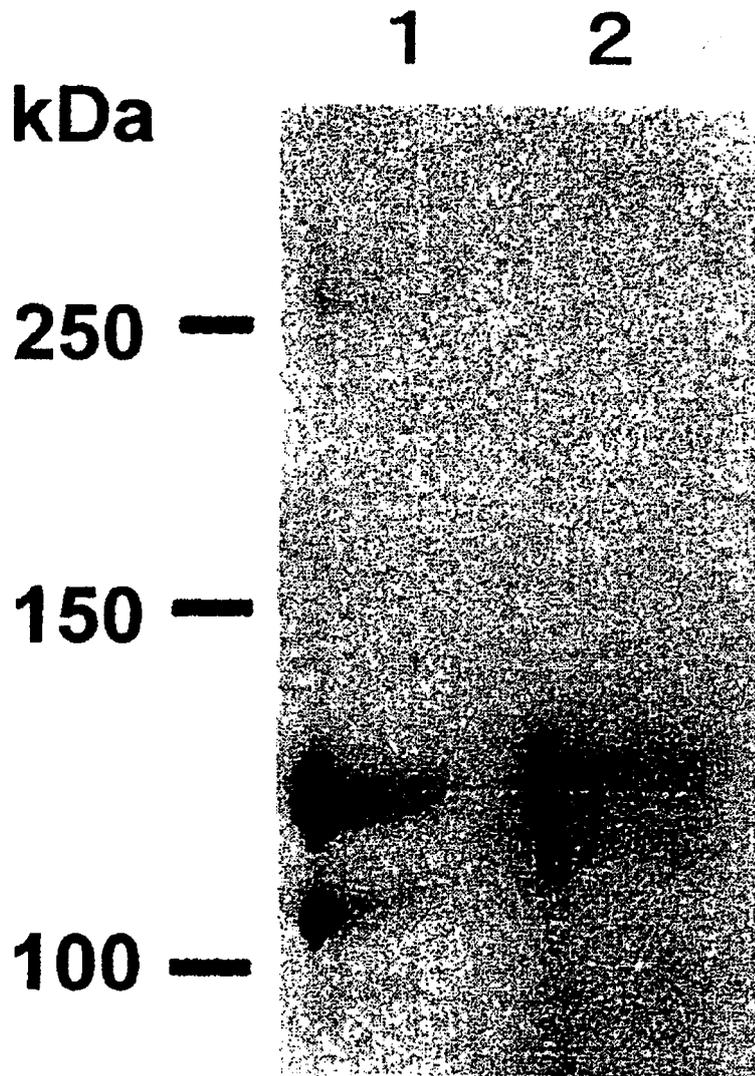


FIG. 6

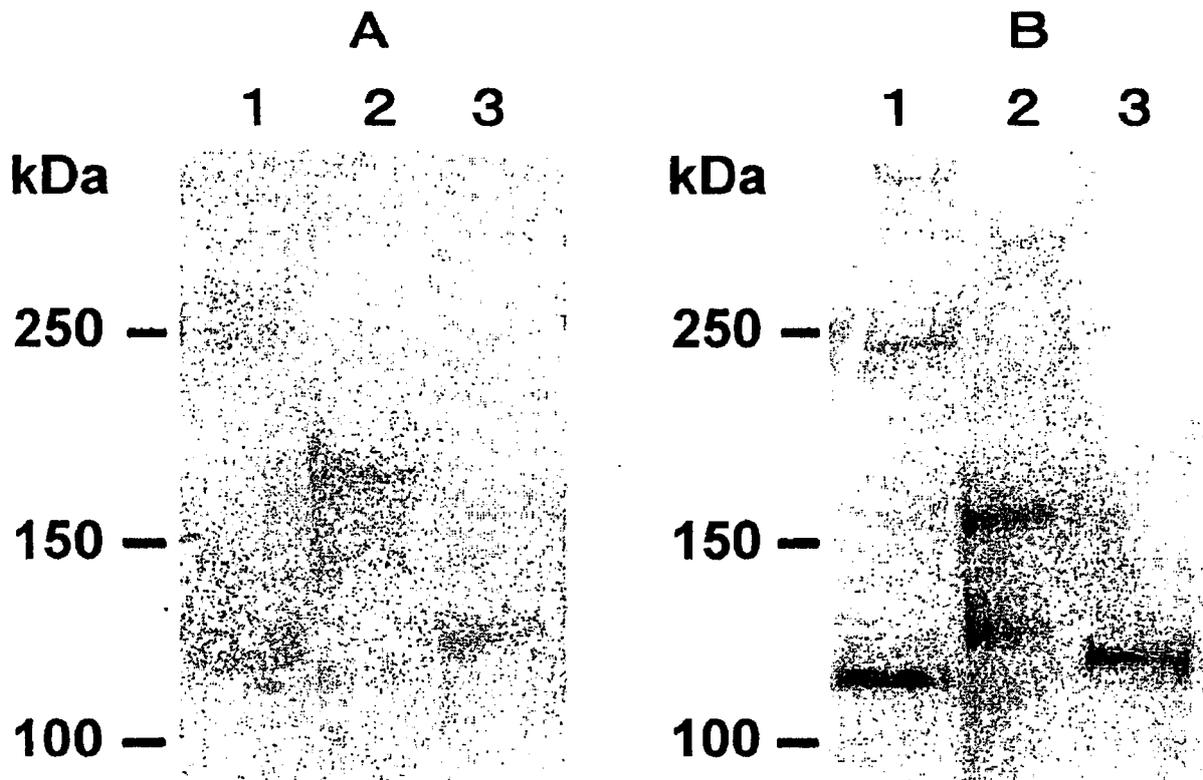


FIG. 7

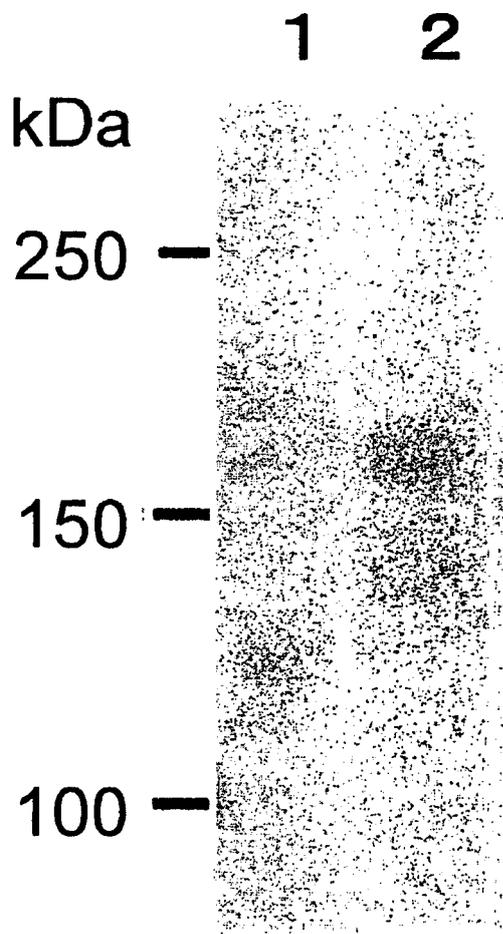


FIG. 8

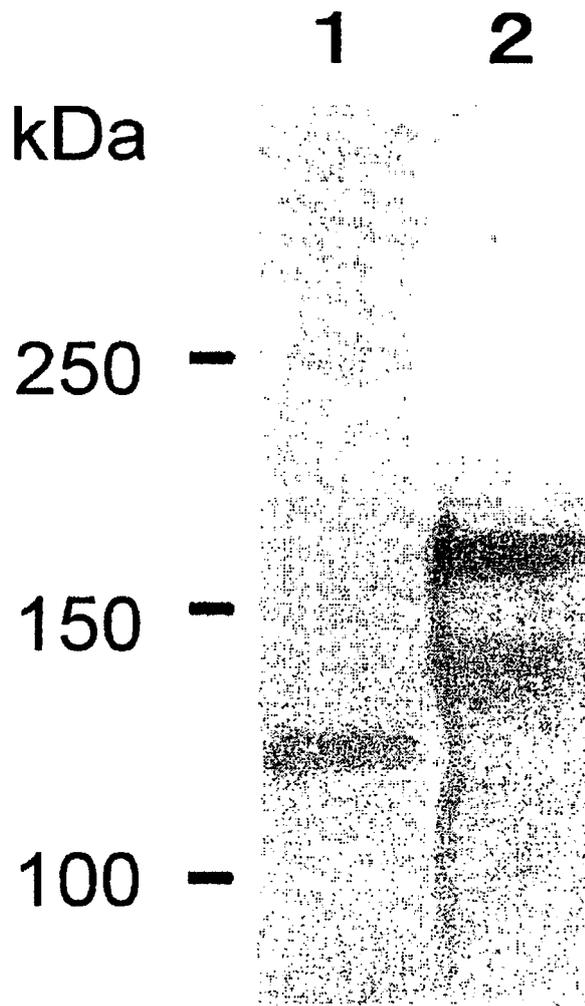


FIG. 9

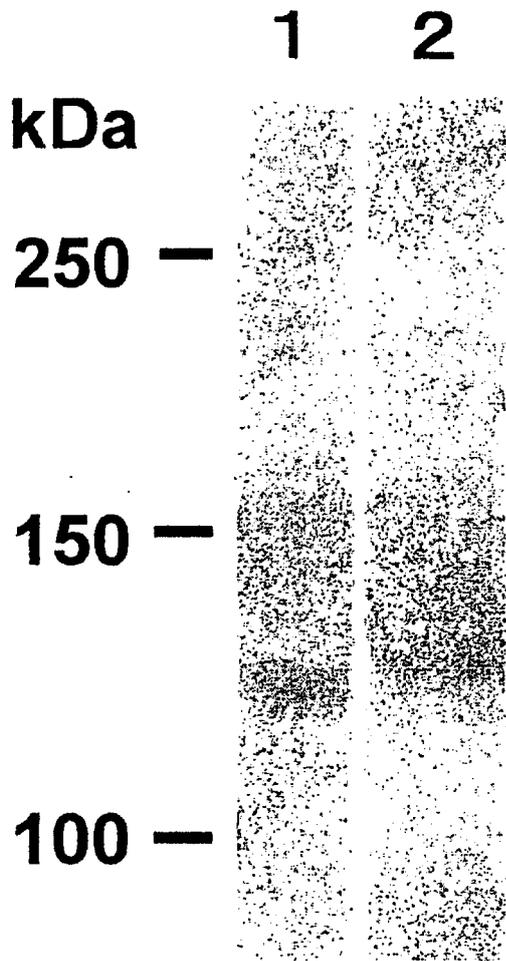


FIG. 10

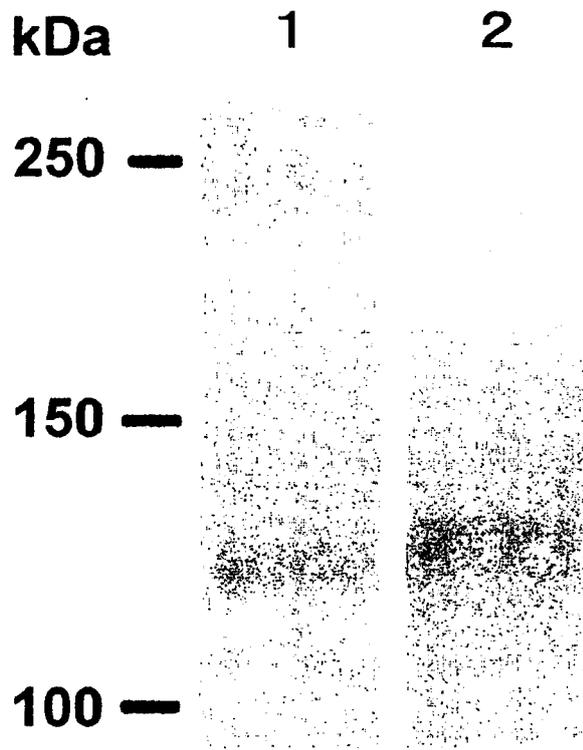


FIG. 11

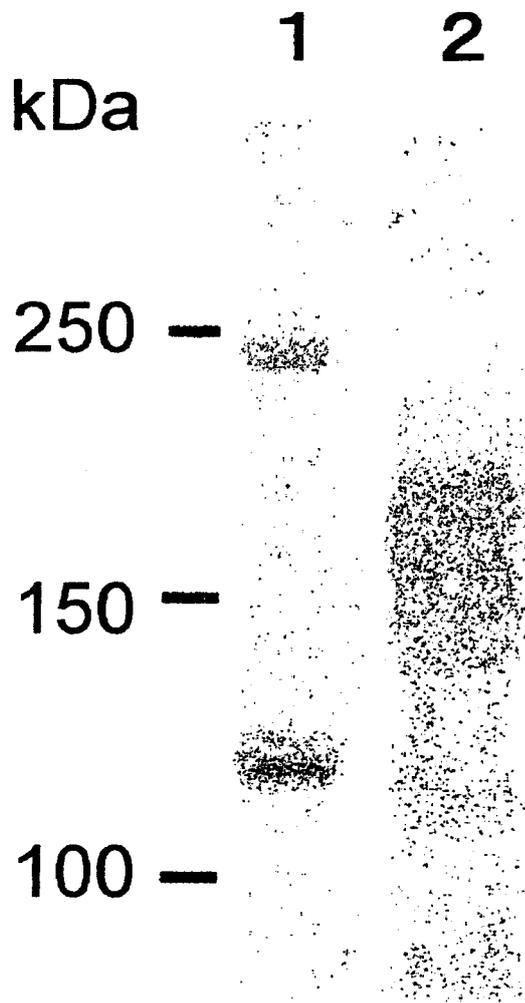


FIG. 12

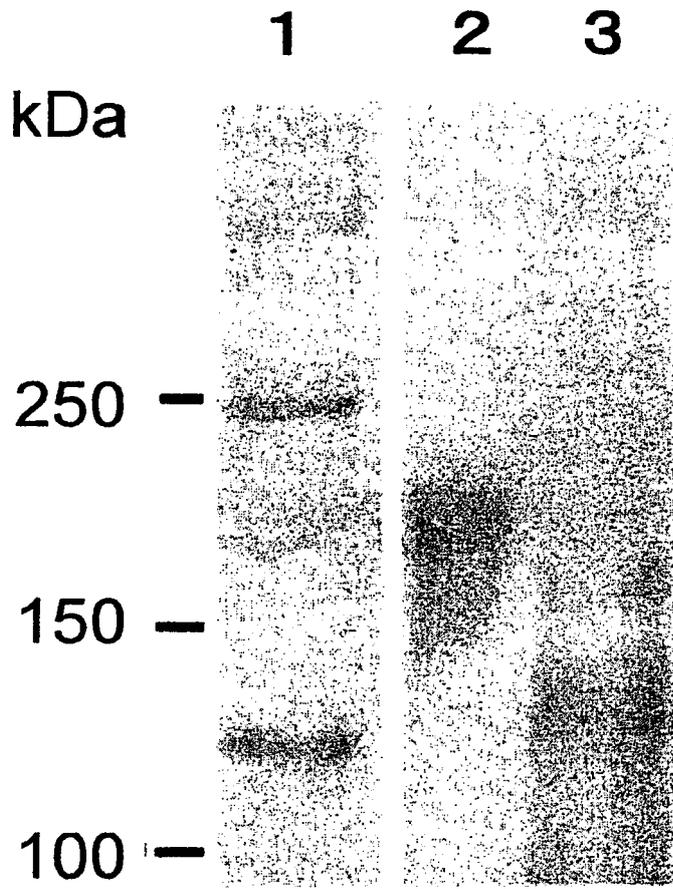


FIG. 13

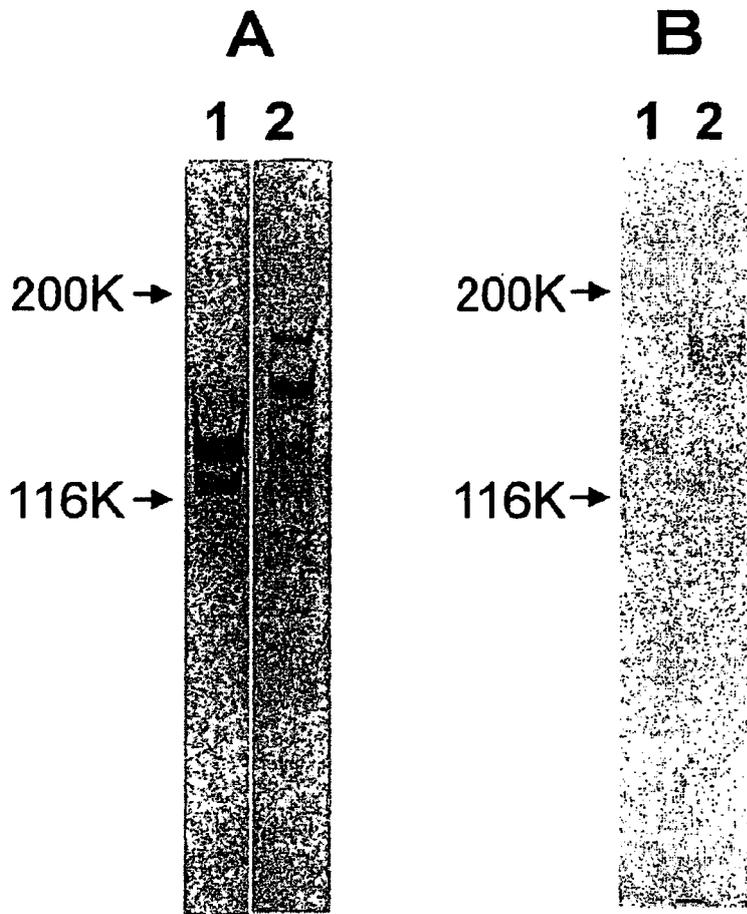


FIG. 14