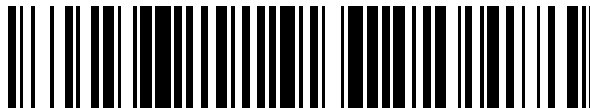


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 489 715**

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 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2006 E 11002048 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.07.2014 EP 2390326**

54 Título: **Procedimiento para la producción de colágeno humano de tipo II**

30 Prioridad:

31.03.2005 JP 2005102999

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

02.09.2014

73 Titular/es:

**FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES LTD.
(50.0%)**

**7-10, Doshomachi 1-chome, Chuo-ku Osaka-shi
Osaka 541-0045, JP y
OSAKA PREFECTURAL GOVERNMENT (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KASE, TETSUO;
KIMURA, AKIO;
UEYAMA, HIROSHI;
NISHIHARA, MIZUKI;
KISAKI, HIROSHI y
KESHI, HIROYUKI**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 489 715 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

Procedimiento para la producción de colágeno humano de tipo II

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a procedimientos de producción de proteínas que tienen estructura de triple hélice. 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
10 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

15 El colágeno es una proteína que se distribuye en casi todos los tejidos del cuerpo incluyendo la piel, el hueso y el cartilago, 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
20 2).

25 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)

30 [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

35 [Problemas para ser solucionados por la invención]

40 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.

50 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
10 introducido estaba contaminado con una cantidad significativa de colágeno de tipo IV derivado de huésped. Por tanto, fue necesario separar el colágeno de tipo II endógeno del colágeno de tipo II derivado del gen introducido.

Fukui *et al.* (J. Biol. Chem., vol. 277, n.º 3, págs. 2193-2002, 2002) describen el procesamiento de amino-propéptido de procolágeno de tipo II mediante metaloproteinasas de matriz.

15 Ala-Kokko *et al.* (J. Biol. Chem., vol. 266, n.º 22, págs. 14175-14178, 1991) describen la formación de colágeno humano de tipo II en células NIH 3T3.

Stacey *et al.* (J. Virol., vol. 61, n.º 8, págs. 2549-2554, 1987) describen la expresión de la cadena pro- α 1 de tipo I humana en células Mov-13.

El documento WO 93/07889 se refiere a la síntesis de procolágenos y colágenos humanos en sistemas de ADN recombinante, y describe la síntesis de colágeno humano de tipo I, II y III en diferentes células huésped.

20 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
25 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.

30 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, en el que
35 la proteína de colágeno se deriva del gen introducido en un vector génico exógeno de expresión alta.

[Medios para resolver los problemas]

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
40 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.

45 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 un mamífero huésped con una expresión baja de colágeno (una proteína con estructura de triple hélice), y de este modo completaron la presente invención.

La presente invención está definida por las reivindicaciones.

50 Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 muestra una construcción de expresión de una cadena α 1 de colágeno humano de tipo I. hColla1: ADNc de cadena α 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
55

G418) y *Escherichia coli* (resistencia a kanamicina).

5 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).

10 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).

15 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).

20 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).

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

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.

30 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

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.

35 La fig. 9 es una fotografía que muestra un análisis por transferencia de tipo Western 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)

40 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 transferencia de tipo Western 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.

45 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.

50 La fig. 13 es una fotografía que muestra un análisis por transferencia de tipo Western 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.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

5 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 divulgación se refiere a métodos de producción de proteínas que tienen estructura de triple hélice, comprende las etapas de:

(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;

10 (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.

15 Las "proteínas que tienen una estructura de triple hélice" en la presente divulgación 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.

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

25 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.

30 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.

35 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 transferencia de tipo Western 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.

45 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 les introduce el vector de alta expresión génica exógena mencionado anteriormente con pepsina en una condición ácida, y examinando si la muestra tiene una estructura resistente a pepsina.

50 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.

5 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 son células CHO.

10 El cultivo a gran escala de las células CHO 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 de agitación por centrifugación 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.

15 En los sobrenadantes de cultivo de células CHO recombinantes a las que se les 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.

20 En la presente invención, el colágeno humano de interés es colágeno humano de tipo II, y también incluye péptidos parciales del mismo. El tipo de colágeno de la presente divulgación 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 .

30 La secuencia de nucleótidos de un ADN que codifica la cadena $\alpha 1$ de colágeno de tipo I 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.

45 Los ADN que codifican el colágeno de la presente divulgación 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 polipéptido) presente en una muestra de ADN o ARN bajo condiciones de hibridación de rigurosidad apropiada. Las condiciones de rigurosidad 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 rigurosidad 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 rigurosidad más apropiada.

55 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 que 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 ó 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 divulgación, "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 µg/ml de colágeno o más, preferentemente la expresión de 50 µg/ml o más de colágeno.

En la presente divulgación, "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.

A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá más específicamente usando ejemplos; sin embargo, no debe interpretarse que se limita a los mismos.

[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 se ha informado de su 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 molde y los oligonucleótidos de SEQ ID NO: 2 (GCGGCCGCCACCATGTTTCAGCTTTGTGGACCTCCG) y SEQ ID NO: 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 hasta finalizar la 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, se obtuvo el ADN plasmídico cultivando las colonias resistentes a ampicilina aparecidas en medio LB agar (Difco Inc.). Se cortó 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 se ha informado de su secuencia de nucleótidos (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 cortó un fragmento de ADN que codifica el colágeno de cadena $\alpha 2$ de tipo I humano a partir del ADN plasmídico, 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

5 El gen de colágeno de cadena $\alpha 1$ de tipo II humano ya se ha clonado, y se ha informado de su secuencia de nucleótidos (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 cortó un fragmento de ADN que codifica el colágeno de cadena $\alpha 1$ de tipo II humano a partir del ADN plasmídico, 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

20 El gen de colágeno de cadena $\alpha 1$ de tipo III humano ya se ha clonado, y se ha informado de su secuencia de nucleótidos (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 (GCGGCCGCCACCATGATGAGCTTTGTGCAAAGGGGA) 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 cortó un fragmento de ADN que codifica el colágeno de cadena $\alpha 1$ de tipo II humano a partir del ADN plasmídico, 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-hColla1a, fig. 4) cultivando una colonia resistente a ampicilina que apareció en medio LB agar.

35 [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.

40 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 de 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

55 Se sometió a ensayo 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

µg/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 µg/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 1×10^6 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 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 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 I 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 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 α1 de colágeno humano de tipo I recombinante, y los polipéptidos de 130 y 150 kDa que pueden ser cadenas α2 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 µg/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 α1 y α2, 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 transferencia de tipo Western 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 µg/ml de un anticuerpo contra la cadena α1 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 µg/ml de colágeno humano de tipo I recombinante (Beckton, Dickinson and Company) como control comparativo. Se detectó la cadena α2 del colágeno humano de tipo I usando un anticuerpo contra la cadena α2 del colágeno humano de tipo I en lugar de un anticuerpo de cadena α1 del colágeno humano de tipo I. Se usaron 10 µg/ml de colágeno humano de tipo I como control comparativo. La fig. 7 muestra el resultado del análisis por transferencia de tipo Western. Un polipéptido de 170 kDa que puede ser una cadena α1 del colágeno humano de tipo I que se puede unir por un anticuerpo anti-cadena α1 del colágeno humano de tipo I y los polipéptidos de 130 y 150 kDa que pueden ser cadenas α2 de colágeno humano de tipo I recombinante que se pueden unir por un anticuerpo anti-cadena α2 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 la precipitación con sales 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 centrífuga refrigerada de alta velocidad. Se insolubilizó el colágeno en la solución precipitando con sales 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 I 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 cm² 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 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 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 sometió a ensayo 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 1×10^5 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 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 transferencia de tipo Western 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 transferencia de tipo Western 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 transferencia de tipo Western (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.

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 3×10^3 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

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 HRP con el reactivo SuperSignal West Pico usando Lumino Capture.

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

5 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 μ M durante cuatro semanas. Como resultado, el nivel de producción de colágeno humano de tipo III se incrementó hasta 225 μ g/ml de medio de cultivo (tres días).

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

15 Se ajustó el clon celular que producía masivamente colágeno humano de tipo III obtenido por amplificación de genes hasta 1×10^6 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 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 III 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 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 transferencia de tipo Western del colágeno humano de tipo III recombinante en el sobrenadante de cultivo

30 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 μ g/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 μ g/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).

40 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

45 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 μ l y se sometió a electroforesis por SDS-PAGE para confirmar su pureza. (fig. 14).

Aplicabilidad industrial

50 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.

55 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.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.
GOBIERNO DE LA PREFECTURA DE OSAKA

10 <120> PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA QUE TIENE UNA ESTRUCTURA DE TRIPLE
HÉLICE

15 <130> EP54146IHV210pau

<140> aún no asignado
<141> adjunto

<150> 06 730 889.0
<151> 31-03-2006

<150> PCT/JP2006/306941
<151> 31-03-2006

20 <150> JP 2005-102999
<151> 31-03-2005

<160> 12

25 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 4395
<212> ADN
30 <213> Homo Sapiens

<400> 1

atgttcagct	ttgtggacct	ccggctcctg	ctcctcttag	cggccaccgc	cctcctgacg	60
cacggccaag	aggaaggcca	agtcgagggc	caagacgaag	acatcccacc	aatcacctgc	120
gtacagaacg	gcctcaggta	ccatgaccga	gacgtgtgga	aaccgcgagc	ctgccggatc	180
tgcgtctgcy	acaacggcaa	ggtgtttgtc	gatgacgtga	tctgtgacga	gaccaagaac	240
tgccccggcg	ccgaagtccc	cgagggcgag	tgctgtcccc	tctgccccga	cggtctcagag	300
tcaccaccg	accaagaaac	caccggcgtc	gagggaccca	agggagacac	tggccccga	360
ggcccaaggg	gaccgcaggg	ccccctggc	cgagatggca	tccctggaca	gcctggactt	420
cccggacccc	ccggaccccc	cggacctccc	ggacccccctg	gcctcggagg	aaactttgct	480
ccccagctgt	cttatggcta	tgatgagaaa	tcaaccggag	gaatttccgt	gcctggcccc	540
atgggtccct	ccggctcctg	tggctccct	ggccccctg	gtgcacctgg	tccccaggc	600
ttccaaggtc	cccctggtga	gcctggcgag	cctggagctt	caggtcccat	gggtccccga	660
ggtccccag	gtccccctgg	aaagaatgga	gatgatgggg	aagctggaaa	acctggctgt	720
cctggtgagc	gtgggcctcc	tgggcctcag	ggtgccccgag	gattgccccg	aacagctggc	780
ctccctggaa	tgaagggaca	cagaggtttc	agtggtttgg	atggtgcaa	gggagatgct	840
ggtcctgctg	gtcctaaggg	tgagcctggc	agccctggtg	aaaatggagc	tcctggtcag	900
atgggcccc	gtggcctgcc	tgggtgagaga	ggtcgccccg	gagccccctg	ccctgctggt	960
gctcgtggaa	atgatggtgc	tactggtgct	gccgggcccc	ctggtcccac	cggtccccgct	1020
ggtcctcctg	gcttcctgg	tgctgttgg	gctaaggggtg	aagctggtcc	ccaagggccc	1080
cgaggctctg	aaggtcccca	gggtgtgctg	ggtgagcctg	gccccctgg	ccctgctggt	1140

ES 2 489 715 T3

gctgctggcc ctgctggaaa ccctggtgct gatggacagc ctggtgctaa aggtgccaat 1200
ggtgctcctg gtattgctgg tgctcctggc ttccctggtg cccgaggccc ctctggaccc 1260
cagggccccg gcggccctcc tggccccaa ggtaacagcg gagaacctgg tgctcctggc 1320
agcaaaggag aactggtgct taagggagag cctggccctg ttggtgttca aggaccccct 1380
ggccctgctg gagaggaagg aaagcgagga gctcgaggtg aaccgagacc cactggcctg 1440
cccggacccc ctggcgagcg tggtagacct ggtagccgtg gtttccctgg cgcagatggt 1500
gttgctggtc ccaaggtcc cgctggtgaa cgtggttctc ctggccctgc tggcccaaa 1560
ggatctcctg gtgaagctgg tcgtcccggg gaagctggtc tgcctggtgc caaggtctg 1620
actggaagcc ctggcagccc tggctctgat ggcaaaactg gccccctgg tcccgccggt 1680
caagatggtc gccccggacc cccaggccca cctggtgccc gtggtcaggc tgggtgatg 1740
ggattccctg gacctaaagg tgctgctgga gagcccggca aggctggaga gcgaggtgtt 1800
cccggacccc ctggcgctgt cggctcctgct ggcaaatgag gagaggctgg agctcagga 1860
ccccctggcc ctgctggtcc cgctggcgag agaggtgaa aaggccctgc tggctcccc 1920
ggattccagg gtctccctgg tcctgctggt cctccaggtg aagcaggcaa acctggtgaa 1980
caggggtgtc ctggagacct tggcgcccct ggccccctct gagcaagagg cgagagaggt 2040
ttccctggcg agcgtggtgt gcaaggtccc cctggtcctg ctggtccccg aggggccaac 2100
ggtgctcccg gcaacgatgg tgctaagggt gatgctggtg cccctggagc tcccggtagc 2160
cagggcgccc ctggccttca gggaatgcct ggtgaacgtg gtgcagctgg tcttcaggg 2220
cctaagggtg acagaggtga tgctggtccc aaaggtgctg atggtctctc tggcaaatg 2280
ggcgtccgtg gtctgaccgg cccattggt cctcctggcc ctgctggtgc ccctggtgac 2340
aaggggtgaa gtggtcccag cggccctgct ggtcccactg gagctcgtgg tgccccgga 2400
gaccgtggtg agcctggtcc ccccgccct gctggtcttg ctggcccccc tgggtgctgac 2460
ggccaacctg gtgctaaagg cgaacctggt gatgctggtg ctaaaggcga tgctggtccc 2520
cctggccctg ccggacccgc tggaccccct ggccccattg gtaatgttgg tgctcctgga 2580
gcaaagggtg ctgcggcgag cgctggtccc cctggtgcta ctggtttccc tgggtgctgct 2640
ggccgagtcg gtctcctgg cccctctgga aatgctggac cccctggccc tctggtcct 2700
gctggcaaag aaggcggcaa aggtccccgt ggtgagactg gccctgctgg acgtcctggt 2760
gaagtgtgct cccctggtcc ccctggccct gctggcgaga aaggatcccc tgggtgctgat 2820
ggtcctgctg gtgctcctgg tactcccggg cctcaaggta ttgctggaca gcgtggtgtg 2880
gtcggcctgc ctggtcagag aggagagaga ggcttccctg gtcttccctgg cccctctggt 2940
gaacctggca aacaaggtcc ctctggagca agtgggtgaa gtggtcccc tgggtccatg 3000
ggccccctg gattggtggt acccctggt gaatctggac gtgagggggc tctggtgccc 3060
gaaggttccc ctggacgaga cggttctcct ggcgccaagg gtgaccgtgg tgagaccggc 3120
cccgtggtgac cccctggtgc tcctggtgct cctggtgccc ctggccccgt tggccctgct 3180

ggcaagagtg gtgatcgtgg tgagactggt cctgctggtc ccgccgggtcc tgtcggccct 3240
 gttggcgccc gtggccccgc cggaccccaa ggcccccggtg gtgacaaggg tgagacaggc 3300
 gaacagggcg acagaggcat aaaggggtcac cgtggcttct ctggcctcca ggggtccccct 3360
 ggccctcctg gctctcctgg tgaacaaggt ccctctggag cctctggtcc tgctggtccc 3420
 cgagggtccc ctggctctgc tgggtgctcct ggcaaagatg gactcaacgg tctccctggc 3480
 cccattgggc ccctggtcc tcgctgctgc actggtgatg ctggtcctgt tgggtcccccc 3540
 ggccctcctg gacctcctgg tccccctggt cctcccagcg ctggtttcga cttcagcttc 3600
 ctgccccagc cacctcaaga gaaggctcac gatgggtggcc gctactaccg ggctgatgat 3660
 gccaatgtgg ttcgtgaccg tgacctcgag gtggacacca ccctcaagag cctgagccag 3720
 cagatcgaga acatccggag cccagagggc agccgcaaga accccgcccc cacctgccgt 3780
 gacctcaaga tgtgccactc tgactggaag agtggagagt actggattga cccaaccaa 3840
 ggctgcaacc tggatgccat caaagtcttc tgcaacatgg agactggtga gacctgcgtg 3900
 taccctactc agcccagtgt ggcccagaag aactggtaca tcagcaagaa cccaaggac 3960
 aagaggcatg tctggttcgg cgagagcatg accgatggat tccagttcga gtatggcggc 4020
 cagggctccg accctgccga tgtggccatc cagctgacct tcctgcccct gatgtccacc 4080
 gaggcctccc agaacatcac ctaccactgc aagaacagcg tggcctacat ggaccagcag 4140
 actggcaacc tcaagaaggc cctgctcctc cagggctcca acgagatcga gatccgcgcc 4200
 gagggcaaca gccgcttcac ctacagcgtc actgtcgatg gctgcacgag tcacaccgga 4260
 gcctggggca agacagtgat tgaatacaaa accaccaaga cctcccgcct gcccatcatc 4320
 gatgtggccc cttggacgt tgggtgcccc a 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

gcggccgcca ccatgttcag ctttgggac ctccg

35

15

<210> 3
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

20

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

<400> 3

25

ttctagatta caggaagcag acagggccaa

30

ES 2 489 715 T3

<210> 4
 <211> 4101
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 4
 atgctcagct ttgtggatac gcggaacttg ttgctgcttg cagtaacctt atgcctagca 60
 acatgccaat ctttacaaga ggaaactgta agaaagggcc cagccggaga tagaggacca 120
 cgtggagaaa ggggtccacc aggccccca ggcagagatg gtgaagatgg tcccacaggc 180
 cctcctggtc cacctggtcc tcctggcccc cctggctctg gtgggaactt tgctgctcag 240
 tatgatggaa aaggagtgg acttggccct ggaccaatgg gcttaatggg acctagaggc 300
 ccacctggtg cagctggagc cccaggccct caaggtttcc aaggacctgc tggtagacct 360
 ggtgaacctg gtcaaaactg tcctgcaggt gctcgtggtc cagctggccc tcctggcaag 420
 gctggtgaag atggtcacc tggaaaacct ggacgacctg gtgagagagg agttggtgga 480
 ccacagggtg ctcgtggttt ccctggaact cctggacttc ctggctcaa aggcattagg 540
 ggacacaatg gtctggatgg actgaaggga cagcccgggt ctcctggtgt gaagggtgaa 600
 cctggtgccc ctggtgaaaa tggaactcca ggtcaaacag gagcccgtgg gcttcctggc 660
 gagagaggac gtgttggtgc ccctggcccc gctggtgccc gtggcagtgga tggaaagtgtg 720
 ggtcccgtgg gtctctgtgg tcccattggg tctgctggcc ctccaggctt cccagggtgcc 780
 cctggccccca agggtgaaat tggagctgtt ggtaacgctg gtcctgctgg tcccggcgggt 840
 ccccggtggtg aagtgggtct tccaggcctc tccggccccg ttggacctcc tggtaatcct 900
 ggagcaaacg gccttactgg tgccaagggt gctgctggcc tccccggcgt tgctggggct 960
 cccggcctcc ctggaccccc cggtatcctt ggccctgttg gtgctgccgg tgctactggt 1020
 gccagaggac ttgttggtga gcctggtcca gctggctcca aaggagagag cggtaacaag 1080
 ggtgagcccc gctctgctgg gccccagggt cctcctgggt ccagtgtgga agaaggaaag 1140
 agaggcccta atggggaaagc tggatctgcc ggccctccag gacctcctgg gctgagaggt 1200
 agtcctggtt ctcgtggcct tcctggagct gatggcagag ctggcgctat gggccctcct 1260
 ggtagtcgtg gtgcaagtgg ccctgctgga gtccgaggac ctaatggaga tgctggtcgc 1320
 cctggggagc ctggtctcat gggaccaga ggtcttctg gttccccctg aaatatcggc 1380
 cccgctggaa aagaagggtc tgtcggcctc cctggcatcg acggcaggcc tggccaatt 1440
 ggccccgctg gagcaagagg agagcctggc aacattgat tccctggacc caaaggcccc 1500
 actggtgatc ctggcaaaaa cggtgataaa ggtcatgctg gtcttctggt tgctcggggt 1560
 gctccagggtc ctgatggaaa caatggtgct cagggacctc ctggaccaca ggggttcaa 1620
 ggtggaaaag gtgaacaggg tcccgtggt cctccaggct tccagggtct gcctggcccc 1680
 tcagggtccc ctggtgaagt tggcaacca ggagaaagg gcctccatgg tgagtttgg 1740
 ctccctggtc ctgctggtcc aagaggggaa cgcggtcccc cagggtgagag tgggtgctgcc 1800
 ggtcctactg gtcctattgg aagccgaggt ccttctggac ccccagggcc tgatggaaac 1860

ES 2 489 715 T3

aaggggtaac ctggtgtggt tgggtgctgtg ggcactgctg gtccatctgg tcctagtgga 1920
ctcccaggag agaggggtgc tgctggcata cctggaggca agggagaaaa ggggtaacct 1980
ggtctcagag gtgaaattgg taaccctggc agagatggtg ctcgtggtgc ccctggtgct 2040
gtaggtgccc ctggtcctgc tggagccaca ggtgaccggg gcgaagctgg ggctgctggt 2100
cctgctggtc ctgctggtcc tcggggaagc cctggtgaac gtggtgaggt cggtcctgct 2160
ggccccaatg gatttgctgg tcctgctggt gctgctggtc aacctggtgc taaaggagaa 2220
agaggagcca aagggcctaa ggggtgaaaac ggtgttgtt gtcccacagg ccccggtgga 2280
gctgctggcc cagctggtcc aaatggtccc cccggtcctg ctggaagctg tggatgagga 2340
ggccccctg gtatgactgg tttccctggt gctgctggac ggaccggtcc cccaggacct 2400
tctggtatct ctggccctcc tggccccct ggtcctgctg ggaaagaagg gcttcgtggt 2460
cctcgtggtg accaaggctc agttggccga actggagaag taggtgcagt tggccccct 2520
ggcttcgctg gtgagaaggg tccctctgga gaggtggtg ctgctggacc tcctggcact 2580
ccaggctctc aggtctctct tgggtctcct ggtattctgg gtctccctgg ctcgagaggt 2640
gaacgtggtc taccaggtgt tgctggtgct gtgggtgaac ctggtcctct tggcattgcc 2700
ggccctcctg gggcccgtgg tcctcctggt gctgtgggta gtcctggagt caacggtgct 2760
cctggtgaag ctggtcgtga tggcaacctt gggaaacgat gtccccagg tcgcatggt 2820
caaccggac acaagggaga gcgcggttac cctggcaata ttggtcccgt tgggtgctgca 2880
ggtgcacctg gtcctcatgg ccccggtggg cctgctggca aacatggaaa ccgtggtgaa 2940
actggtccct ctggtcctgt tggctcctgct ggtgctgtt gcccaagagg tcctagtggc 3000
ccacaaggca ttcgtggcga taaggagag cccggtgaaa aggggccag aggtcttct 3060
ggcttaaagg gacacaatg attgcaagg ctgcctggtg tcgctggtca ccattggtgat 3120
caagggtgct ctggtccctg gggctcctgct ggtcctaggg gccctgctgg tccttctggc 3180
cctgctggaa aagatggtcg cactggacat cctggtacag ttggacctgc tggcattcga 3240
ggccctcagg gccaccaagg ccctgctggc cccctggtc cccctggccc tcctggacct 3300
ccagggtgaa gcggtggtg ttatgacttt ggttacgat gagacttcta cagggtgac 3360
cagcctcgtc cagcacctc tctcagacc aaggactatg aagttgatgc tactctgaag 3420
tctctcaaca accagattga gaccctctt actcctgaag gctctagaaa gaaccagct 3480
cgcacatgcc gtgacttgag actcagccac ccagagtgga gcagtgggta ctactggatt 3540
gaccctaacc aaggatgcac tatggatgct atcaaagtat actgtgattt ctctactggc 3600
gaaacctgta tcggggcca acctgaaaac atcccagcca agaactggta taggagctcc 3660
aaggacaaga aacacgtctg gctaggagaa actatcaatg ctggcagcca gtttgaatat 3720
aatgtagaag gactgacttc caaggaaatg gctacccaac ttgccttcat gcgcctgctg 3780
gccaaactatg cctctcagaa catcacctac cactgcaaga acagcattgc atacatggat 3840
gaggagactg gcaacctgaa aaaggctgct attctacagg gctctaata tggtaactt 3900

ES 2 489 715 T3

gttgctgagg gcaacagcag gttcacttac actgttcttg tagatggctg ctctaaaaag 3960
 acaaatgaat ggggaaagac aatcattgaa tacaaaacaa ataagccatc acgcctgccc 4020
 ttccttgata ttgcaccttt 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 cttgtggat acgcgga 37

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

20 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
 <400> 6

25 actagtttat ttgaaacaga ctgggccaat 30

30 <210> 7
 <211> 4257
 <212> ADN
 <213>Homo sapiens

<400> 7
 atgattcggc tcggtgctcc ccagtcgctg gtgctgctga cgctgctcgt cgccgctgctc 60
 cttcgggtgc agggccagga tgtccggcaa ccaggaccaa agggacagaa aggagaacct 120
 ggagacatca aggatattgt aggaccaaa ggacctcctg ggcctcaggg acctgcaggg 180
 gaacaaggac ccagagggga tcgtggtgac aaaggtgaaa aaggtgcccc tggacctcgt 240
 ggcagagatg gagaacctgg gaccctgga aatcctggcc cccctggctc tcccggcccc 300
 cctggtcccc ctggtcttgg tggaaacttt gctgcccaga tggctggagg atttgatgaa 360
 aaggctggtg gcgcccagtt gggagtaatg caaggaccaa tgggccccat gggacctcga 420
 ggacctccag gccctgcagg tgctcctggg cctcaaggat ttcaaggcaa tcctggtgaa 480
 cctggtgaa cttggtgtctc tgggtccatg ggtccccctg gtcctcctgg tccccctgga 540
 aagcctggtg atgatggtga agctggaaaa cctggaaaag ctggtgaaag gggctccgct 600
 ggtcctcagg gtgctcgtgg tttcccagga acccaggcc ttcctggtgt caaaggctac 660
 agaggttatc caggcctgga cgggtgctaag ggagaggcgg gtgctcctgg tgtgaagggt 720
 gagagtgtt ccccggtgga gaacggatct ccgggcccga tgggtcctc tggcctgcct 780
 ggtgaaagag gacggactgg ccctgctggc gctgcggtg cccgaggcaa cgatggtcag 840
 ccaggccccg cagggcctcc gggctcctgc ggtcctgctg gtggtcctgg cttccctggt 900

ES 2 489 715 T3

gctcctggag ccaaggggtga agccggcccc actggtgccc gtggtcctga aggtgctcaa 960
ggtcctcgcg gtgaacctgg tactcctggg tcccctgggc ctgctggtgc ctccggtaac 1020
cctggaacag atggaattcc tggagccaaa ggatctgctg gtgctcctgg cattgctggt 1080
gctcctggct tcctggggcc acggggccct cctggccctc aagggtcaac tggctcctcg 1140
ggccccgaaag gtcagacggg tgaacctggt attgctggct tcaaaggtga acaaggcccc 1200
aagggagaac ctggccctgc tggccccag ggagcccctg gaccgctgg tgaagaaggc 1260
aagagaggtg cccgtggaga gcctggtggc gttgggcca tcggtcccc tggagaaaga 1320
ggtgctcccg gcaaccgcgg ttccaggt caagatggtc tggcaggtcc caaggagcc 1380
cctggagagc gaggccccag tggctctgct gggcccaagg gagccaacgg tgaccctggc 1440
cgtcctggag aacctggcct tcctggagcc cggggtctca ctggccgccc tggatgct 1500
ggtcctcaag gcaaagttgg ccttctgga gccctggty aagatggtc tctggacct 1560
ccaggctctc agggggctcg tgggcagcct ggtgtcatgg gtttccctgg ccccaaaggt 1620
gccaacggtg agcctggcaa agctggtgag aagggactgc ctggtgctcc tggctgagg 1680
ggtcttctcg gcaaagatgg tgagacaggt gctgcaggac cccctggccc tggctggacct 1740
gctggtgaa c gaggcgagca ggggtgctct gggccatctg ggttcaggg acttctggc 1800
cctcctggtc ccccaggtga aggtgaaaa ccaggtgacc aggggttcc cggatgaagct 1860
ggagccccctg gcctcgtggg tcccaggggt gaacgaggtt tcccaggtga acgtggctct 1920
cccggtgccc agggcctcca gggctcccgt ggcctccccg gcactcctgg cactgatggt 1980
cccaaaggtg catctggccc agcaggcccc cctggggctc agggccctcc aggtcttcag 2040
ggaatgcctg gcgagagggg agcagctggt atcgtgggc ccaaaggtga caggggtgac 2100
gttggtgaga aaggccctga gggagcccc ggaaggatg 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
ggagcacctg ggctcaggg tcctactgga gtgactggtc ctaaaggagc ccgaggtgcc 2460
caaggcccc cgggagccac tggattccct ggagctgctg gccgcgttg acccccaggc 2520
tccaatggca accctggacc ccctggtccc cctggtcctt ctggaaaaga tggctccaaa 2580
ggtgctcgag gagacagcgg cccccctggc cgagctggtg aaccggcct ccaaggctct 2640
gctggacccc ctggcgagaa gggagagcct ggagatgacg gtccctctgg tgccgaagg 2700
ccaccaggte cccagggctt ggctggtcag agaggcatcg tcggtctgcc tgggcaacgt 2760
ggtgagagag gattccctgg ctgacctggc ccgtcgggtg agcccggcaa gcagggtgct 2820
cctggagcat ctggagacag aggtcctcct gggcccgtgg gtcctcctgg cctgacgggt 2880
cctgcaggty aacctggacg agagggaagc cccggtgctg atggcccccc tggcagagat 2940

ES 2 489 715 T3

ggcgctgctg gagtcaaggg tgatcgtggt gagactggtg ctgtgggagc tcctggagcc 3000
 cctgggcccc ctggtccccc tggccccgct ggtccaactg gcaagcaagg agacagagga 3060
 gaagctggtg cacaaggccc catgggacct tcaggaccag ctggagcccc gggaatccag 3120
 ggtcctcaag gccccagagg tgacaaagga gaggtcggag agcctggcga gagagggcctg 3180
 aagggacacc gtggcttcac tggctcgcag ggtctgcccc gccctcctgg tccttctgga 3240
 gaccaagggtg cttctggtcc tgctggctct tctggcccta gaggtcctcc tggccccgtc 3300
 ggtcctctctg gcaaagatgg tgctaattga atccctggcc ccattgggcc tcctggtccc 3360
 cgtggacgat caggcgaaac cggccctgct ggtcctcctg gaaatcctgg acccctggt 3420
 cctccaggtc cccctggccc tggcatcgac atgtccgctt ttgctggctt aggcccgaga 3480
 gagaagggcc ccgaccccc gcagtacatg cgggccgacc aggcagccgg tggcctgaga 3540
 cagcatgacg ccgagggtga tgccacactc aagtcctca acaaccagat tgagagcatc 3600
 cgcagccccg agggctcccc caagaaccct gctcgcacct gcagagacct gaaactctgc 3660
 caccctgagt ggaagagtgg agactactgg attgacccca accaaggctg caccttgga 3720
 gccatgaagg tttctgcaa catgggagact ggcgagactt gcgtctaccc caatccagca 3780
 aacgttccca agaagaactg gtggagcagc aagagcaagg agaagaaaca catctggttt 3840
 ggagaaacca tcaatggtgg cttccatttc agctatggag atgacaatct ggetcccaac 3900
 actgccaacg tccagatgac ctctctacgc ctgctgtcca cggaaggctc ccagaaatc 3960
 acctaccact gcaagaacag cattgcctat ctggacgaag cagctggcaa cctcaagaag 4020
 gccctgctca tccagggctc caatgacgtg gagatccggg cagagggcaa tagcaggttc 4080
 acgtacactg cctgaagga tggctgcacg aacataccg gtaagtgggg caagactggt 4140
 atcgagtacc ggtcacagaa gacctcacgc ctccccatca ttgacattgc acctatggac 4200
 ataggagggc ccgagcagga 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

ggccccgcgg tgagccatga ttcgcctcg 29

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

20 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
 <400> 9

25 tctagattac aagaagcaga ccggccctat 30

<210> 10
 <211> 4401

ES 2 489 715 T3

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 10
atgatgagct ttgtgcaaaa ggggagctgg ctacttctcg ctctgcttca tcccactatt 60
atittggcac aacaggaagc tgttgaagga ggatgttccc atcttggca gtcctatgcg 120
gatagagatg tctggaagcc agaaccatgc caaatatgtg tctgtgactc aggatccggt 180
ctctgcatg acataatatg tgacgatcaa gaattagact gccccaaccc agaaattcca 240
tttgagaat gttgtgcagt ttgccacag cctccaactg ctctactcg cctcctaata 300
ggcaaggac ctcaaggccc caaggagat ccaggccctc ctggtattcc tgggagaaat 360
ggtgaccctg gtattccagg acaaccaggg tccccgggt ctctgccc ccctggaatc 420
tgtgaatcat gccctactgg tcctcagaac tattctccc agtatgatc atatgatgtc 480
aagtctggag tagcagtagg aggactcga ggctatcctg gaccagctgg cccccaggc 540
cctcccggtc ccctggtag atctggtcat cctggtccc ctggatctcc aggataccaa 600
ggacccctg gtgaacctg gcaagctgg ccttcaggcc ctccaggacc tcctggtgct 660
ataggccat ctggtcctgc tggaaaagat ggagaatcag gtagaccgg acgacctgga 720
gagcgaggat tgcctggacc tccaggatc aaaggtccag ctgggatacc tggattccct 780
ggtatgaaag gacacagagg ctctgatgga cgaatggag aaaagggtga aacagggtgct 840
cctggattaa aggggtaaaa tggcttcca ggcgaaaatg gagctcctgg acccatgggt 900
ccaagagggg ctctggtga gcgaggacgg ccaggactc ctggggctgc aggtgctcgg 960
ggtaatgacg gtgctcaggg cagtgatggt caaccaggcc ctctggtcc tcctggaact 1020
gccggattcc ctggatcccc tggtgccaag ggtgaagttg gacctgcagg gtctcctggt 1080
tcaaatggtg cccctggaca aagaggagaa cctggacctc agggacacgc tgggtctcaa 1140
ggtcctcctg gccctcctgg gattaatggt agtctggtg gtaaaggcga aatgggtccc 1200
gctggcattc ctggagctcc tggactgatg ggagcccggg gtcctccagg accagccggt 1260
gctaattggt ctctggact gcgaggtggt gcaggtgagc ctggtaagaa tggtgccaaa 1320
ggagagcccc gaccacgtg tgaacgcggt gaggtggca ttccagggtg tccaggagct 1380
aaaggcgaag atggcaagga tggatcacct ggagaacctg gtgcaaatgg gcttccagga 1440
gctgcaggag aaaggggtgc cctgggttc cgaggacctg ctggaccaa tggcatcca 1500
ggagaaaagg gtctgctgag agagcgtggt gctccaggcc ctgcagggcc cagaggagct 1560
gctggagaac ctggcagaga tggcgtccct ggaggtccag gaatgagggg catgcccgga 1620
agtccaggag gaccaggaag tgatgggaaa ccaggccctc ccggaagtca aggagaaagt 1680
ggtcgaccag gtccctcctg gccatctggt ccccagggtc agcctggtgt catgggcttc 1740
cccggcccta aaggaaatga tgggtctcct ggtaagaatg gagaacgagg tggccctgga 1800

ES 2 489 715 T3

ggacctggcc ctcagggtcc tcctggaaag aatggtgaaa ctggacctca gggaccccca 1860
 ggcctactg ggcctggtgg tgacaaagga gacacaggac cccctggtcc acaaggatta 1920
 caaggcttg cctgtacagg tggctctcca ggagaaaatg gaaaacctgg ggaaccaggt 1980
 ccaaagggtg atgccgggtg acctggagct ccaggaggca aggggatgct tgggtcccct 2040
 ggtgaacgtg gacctcctgg attggcaggg gccccaggac ttagagggtg agctggtccc 2100
 cctggtcccg aaggaggaaa ggggtgctgt ggtcctcctg gggcacctgg tgctgctggt 2160
 actcctggtc tgcaaggaat gcctggagaa agaggaggtc ttggaagtcc tggccaag 2220
 ggtgacaagg gtgaaccagg cgggtccagg gctgatggtg tcccaggaa agacggccca 2280
 aggggtccta ctggtcctat tggctcctct gggccagctg gccagcctgg agataagggt 2340
 gaagggtgtg cccccggact tccaggata gctggacctc gtggtagccc tggtgagaga 2400
 ggtgaaactg gccctccagg acctgctggt tccctggtg ctctggaca gaatggtgaa 2460
 cctggtggtg aaggagaaa aggggctccg ggtgagaaa gtgaaggagg ccctcctgga 2520
 gttgcaggac cccctggagg ttctggacct gctggtcctc ctggtcccca aggtgtcaa 2580
 ggtgaacgtg gcagtcctgg tggacctggt gctgctggtc tccctggtg tcgtggtctt 2640
 cctggtcctc ctggtagtaa tggaacca ggacccccag gtcccagcgg ttctccaggc 2700
 aaggatggc cccaggtcc tgcgggtaac actggtgctc ctggcagccc tggagtgtct 2760
 ggacaaaag gtgatgctgg ccaaccagga gagaaggat cgctggtg cccagggcca 2820
 ccaggagctc caggccact tgggattgct gggatcactg gagcacggg tctgcagga 2880
 ccaccaggca tgccaggctc taggggaagc cctggcccc aggggtgtaa ggggaaagt 2940
 gggaaaccag gagctaaccg tctcagtgga gaactggtc cccctggacc ccagggtctt 3000
 cctggtctgg ctggtacagc tgggtaacct ggaagagatg gaaacctg atcagatggt 3060
 ctccaggctc gagatggatc tctggtggc aagggtgatc gtggtgaaa tggctctct 3120
 ggtgccccct gcgctcctgg tcatccgggc ccacctggtc ctgctggtcc agctgaaaag 3180
 agtggtgaca gaggagaaa tggccctgct gggcctgctg gtgctcccgg tctgctggt 3240
 tcccgagggt ctctggtcc tcaaggcca cgtggtgaca aagggtgaa aggtgaacgt 3300
 ggagctgctg gcatcaaagg acatcgagga tccctggtg atccagggtc cccaggttct 3360
 ccaggccctg ctggtcagca ggggtgcaatc ggcagtccag gacctgcagg ccccagagga 3420
 cctgttgacc ccagtggacc tctggcaaa gatggaacca gtggacatcc aggtccatt 3480
 ggaccaccag ggcctcgagg taacagagg gaaaaggat ctgagggtc cccaggccac 3540
 ccagggcaac caggccctcc tggacctcct ggtgccccctg gtccttgctg tgggtggtt 3600
 ggagccgctg ccattgctgg gattggagg gaaaaagctg gcggttttg cccgtattat 3660
 ggagatgaa caatggattt caaatcaac accgatgaga ttatgactc actcaagtct 3720
 gttaatggac aaatagaaag cctcattag cctgatggtt ctcgtaaaa cccgctaga 3780
 aactgcagag acctgaaatt ctgccatcct gaactcaaga gtggagaata ctgggttgac 3840

ES 2 489 715 T3

cctaaccaag gatgcaaatt ggatgctatc aaggatttct gtaatatgga aactggggaa 3900
 acatgcataa gtgccaatcc tttgaatggt ccacggaaac actggtggac agattctagt 3960
 gctgagaaga aacacgtttg gtttgagag tccatggatg gtggtttca gtttagctac 4020
 ggcaatcctg aacttcctga agatgctctt gatgtgcagc tggcattcct tcgacttctc 4080
 tccagccgag cttcccagaa catcacatat cactgcaaaa atagcattgc atacatggat 4140
 caggccagtg gaaatgtaa gaaggccctg aagctgatgg ggtcaaatga aggtgaattc 4200
 aaggctgaag gaaatagcaa attcacctac acagttctgg aggatggtg cacgaaacac 4260
 actggggaat ggagcaaac agtctttgaa tatcgaacac gcaaggctgt gagactacct 4320
 attgtagata ttgcacccta tgacattggt ggtcctgatc aagaatttgg tgtggacgtt 4380
 ggccctgtt 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 cttgtgcaa aagggga 37

15 <210> 12
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
 <400> 12

25 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:
- 5 (a) introducir ADN que codifica una proteína que tiene una estructura de triple hélice en el vector pNOW/CMV-AA, en el que el ADN se selecciona de:
- (i) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7; y
- (ii) un ADN que se hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7;
- (b) transformar una célula CHO por transferencia del vector génico; y
- 10 (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,
- en el que la proteína que tiene una estructura de triple hélice es colágeno humano de tipo II o un péptido parcial del mismo.
2. Un vector introducido con al menos un ADN seleccionado de:
- 15 (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7; y
- (b) un ADN que se hibrida en condiciones rigurosas con ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7.
3. Una célula CHO que porta el vector de la reivindicación 2.
- 20 4. Un kit para producir una proteína que tiene una estructura de triple hélice, en el que el kit comprende el vector de la reivindicación 2 o la célula CHO de la reivindicación 3, y en el que la proteína que tiene una estructura de triple hélice es colágeno humano de tipo II o un péptido parcial del mismo.

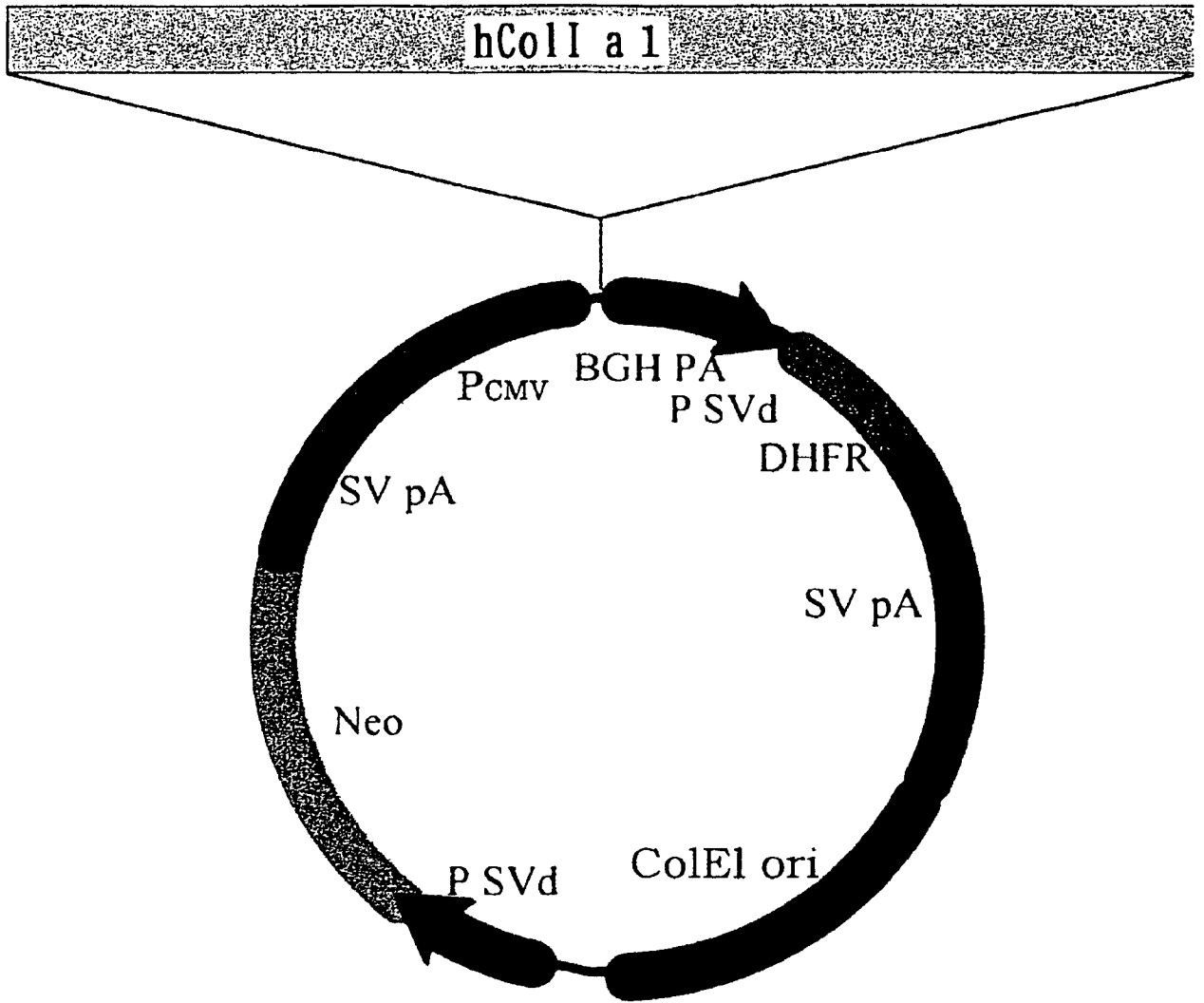


FIG. 1

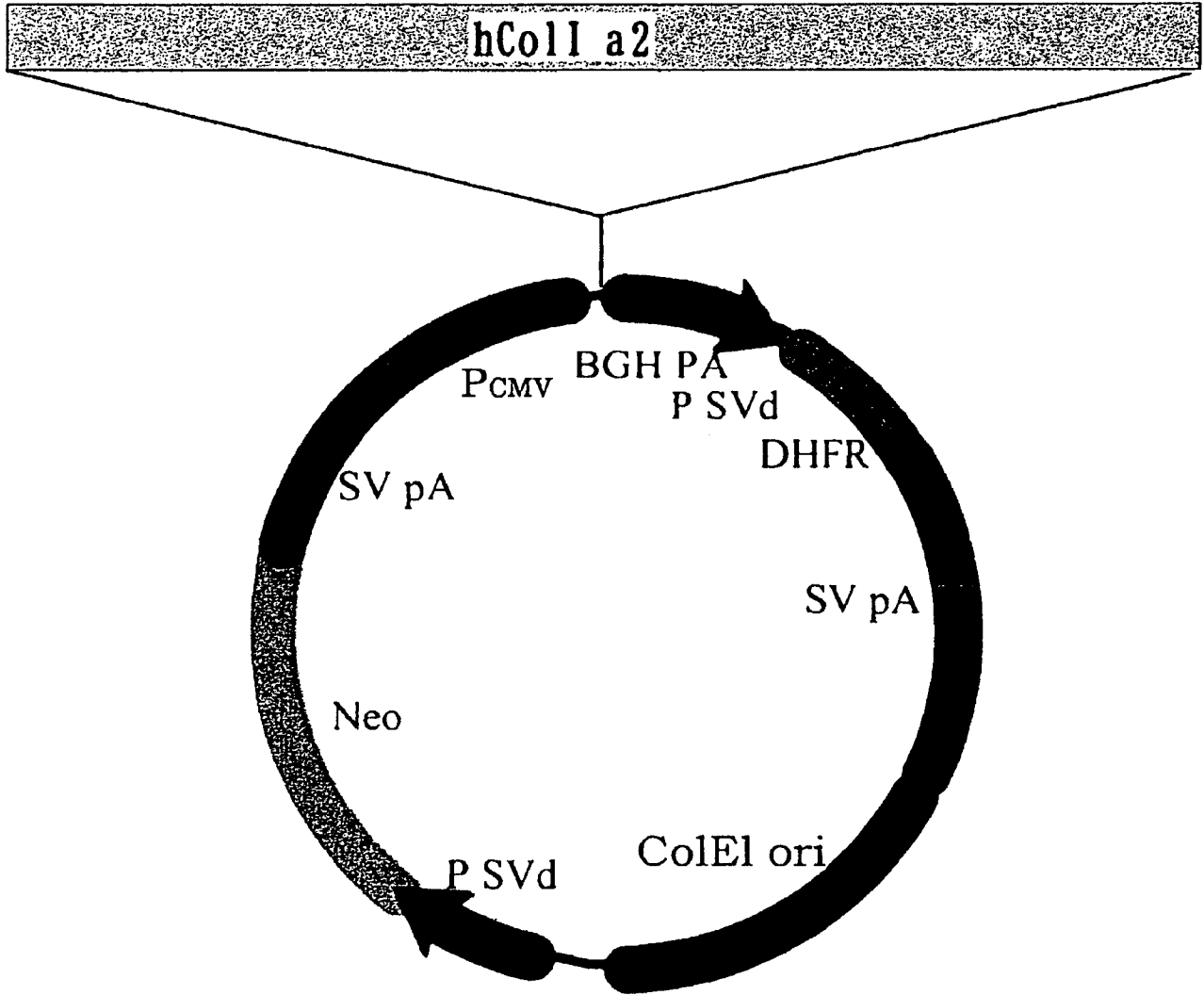


FIG. 2

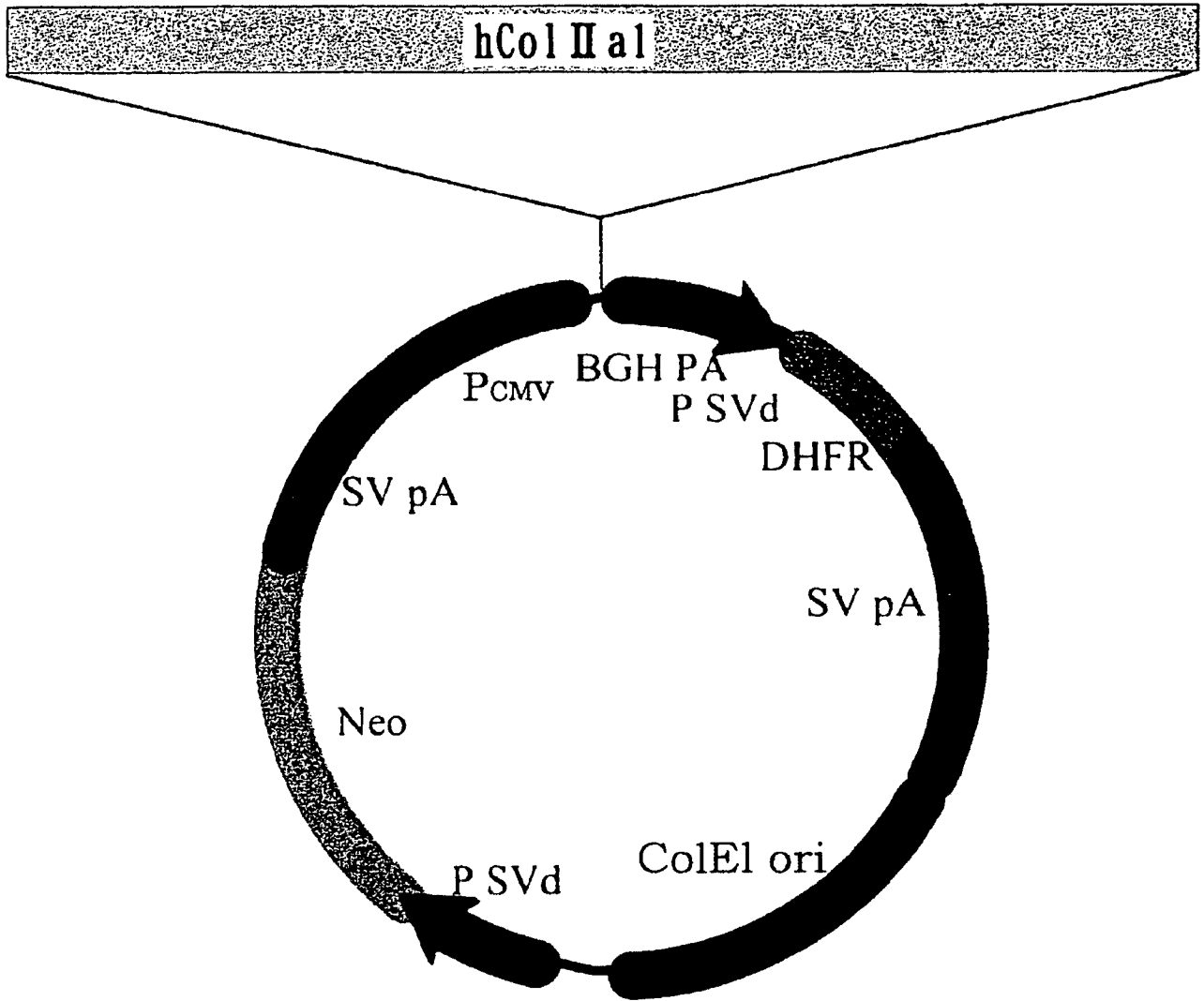


FIG. 3

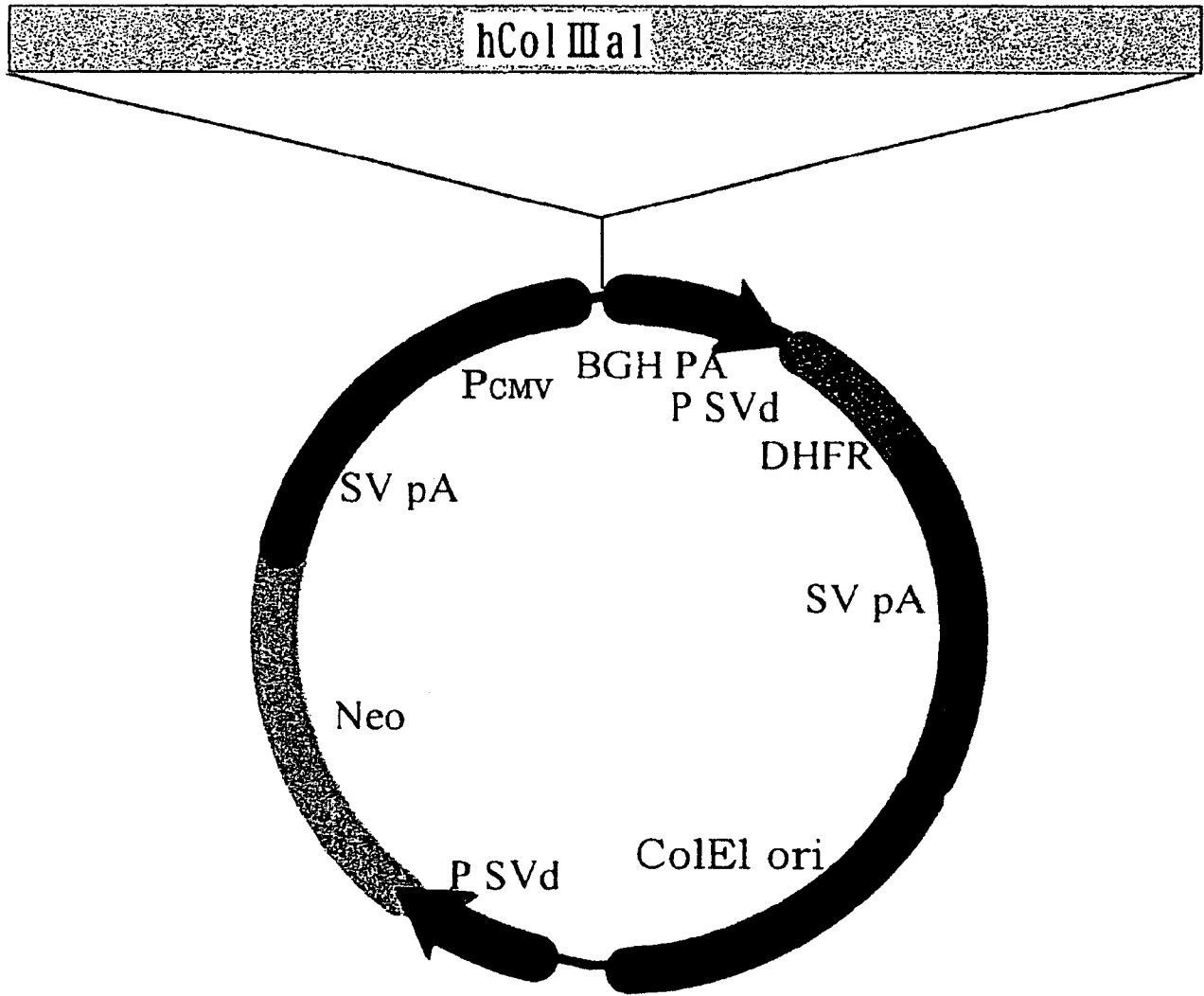


FIG. 4

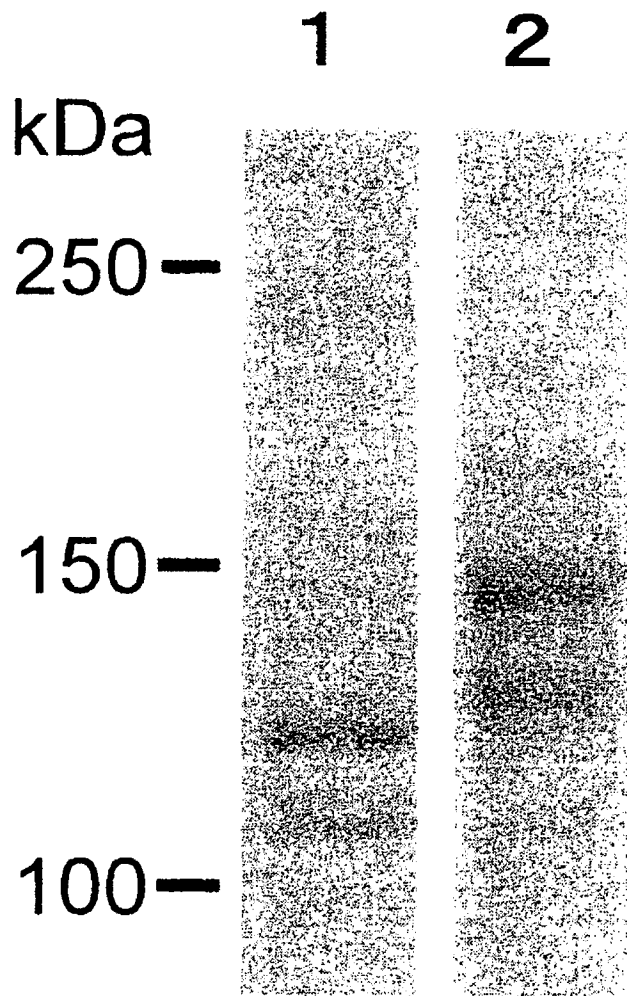


FIG. 5

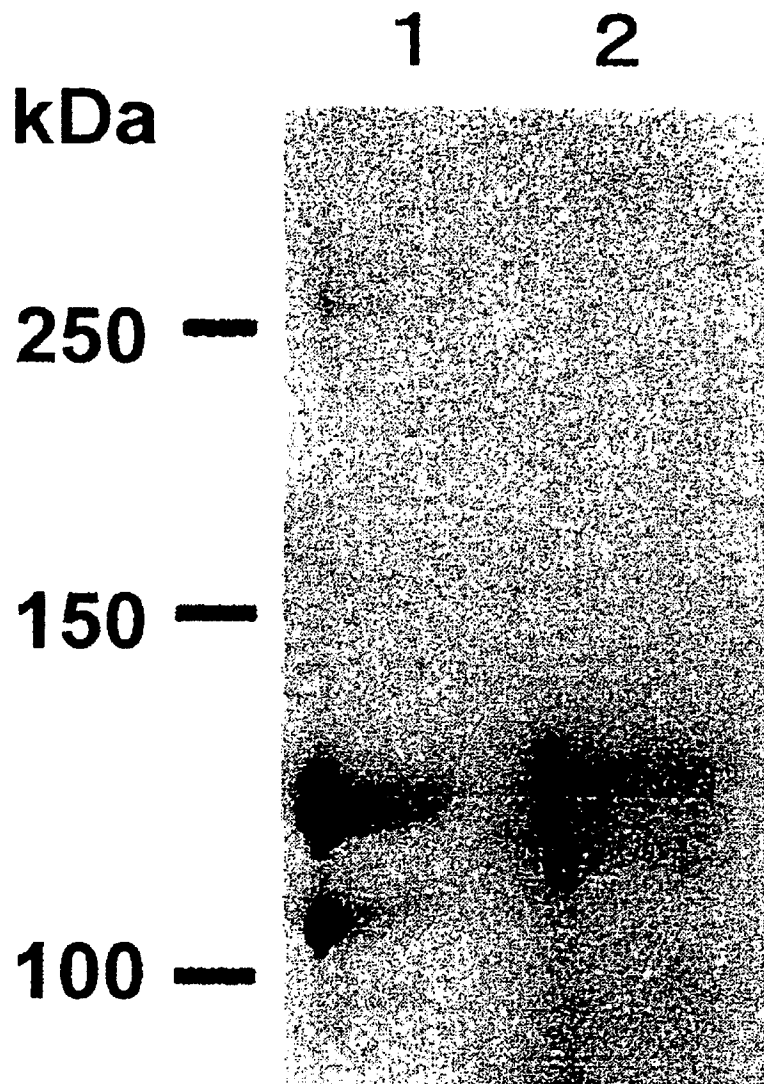


FIG. 6

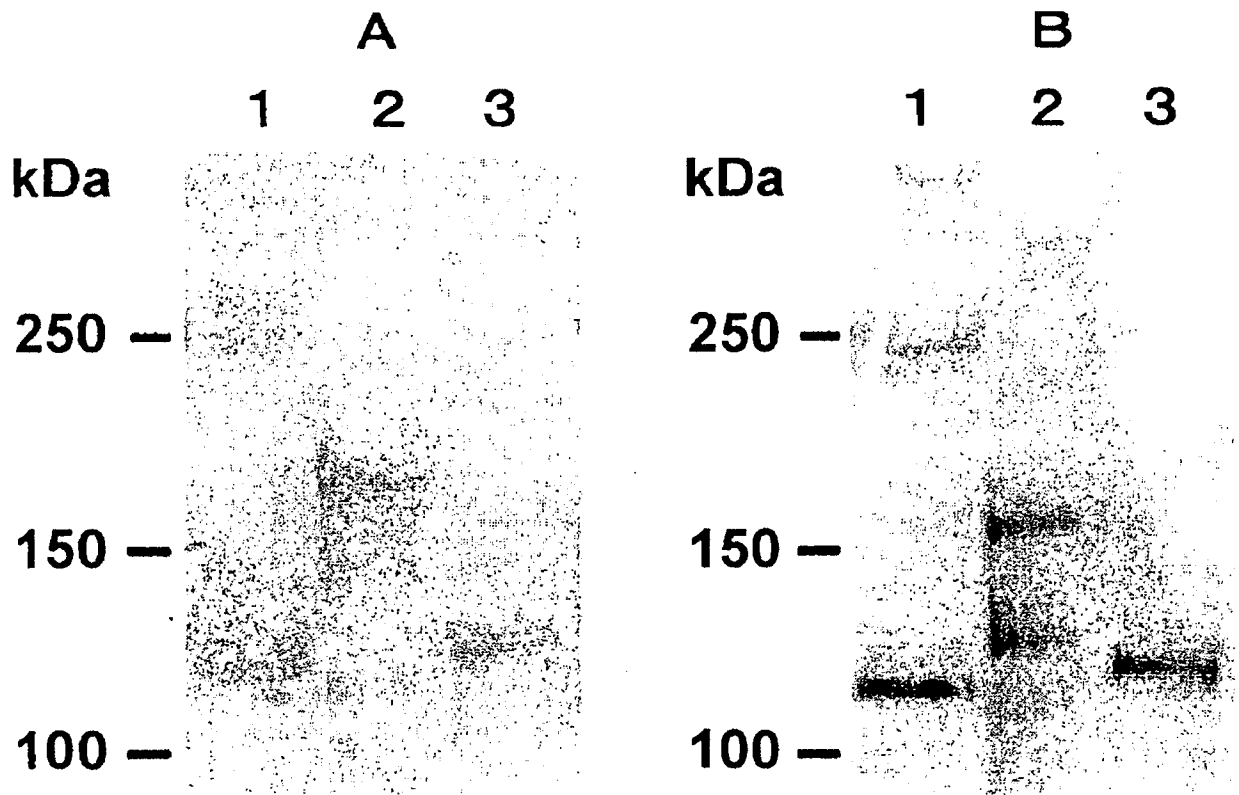


FIG. 7

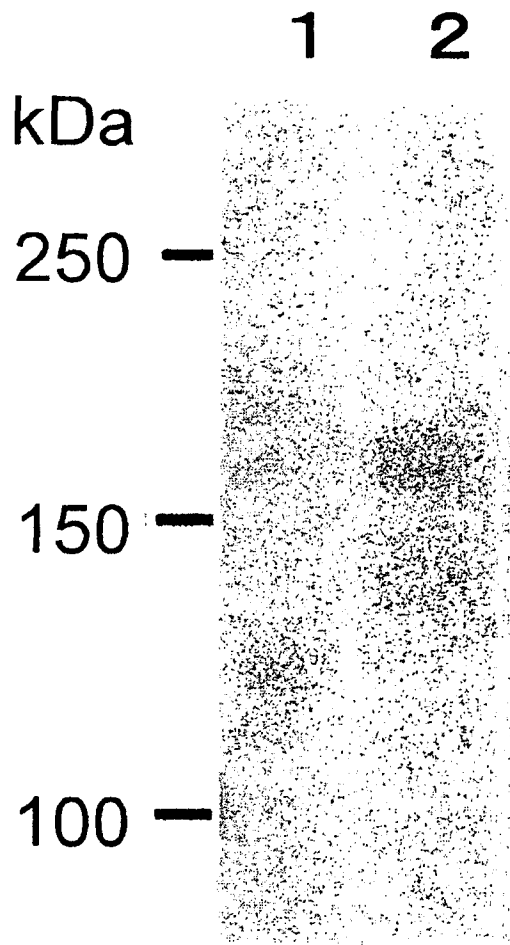


FIG. 8

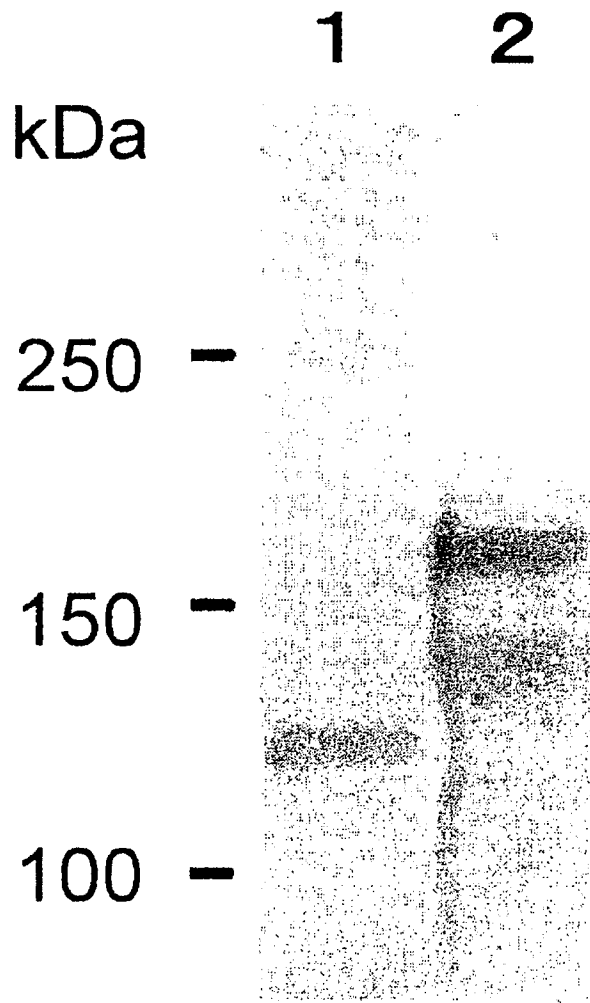


FIG. 9

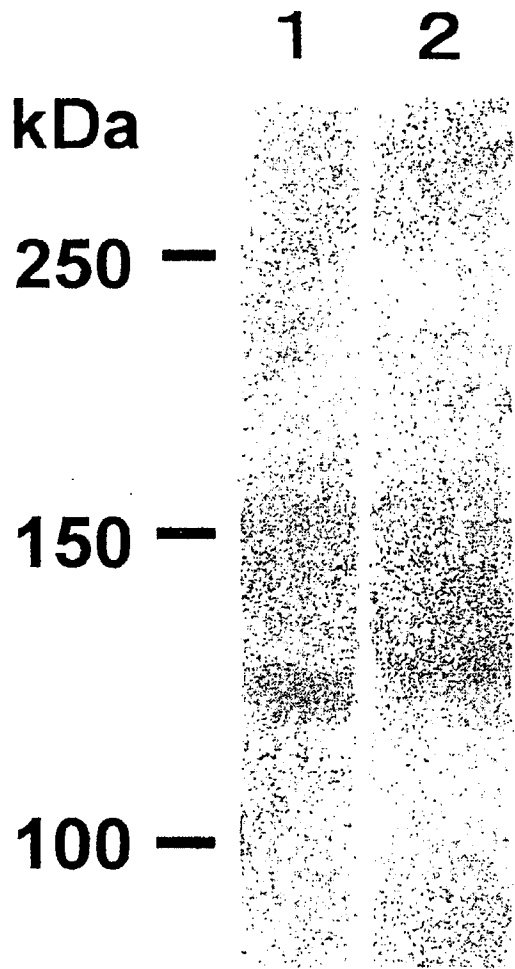


FIG. 10

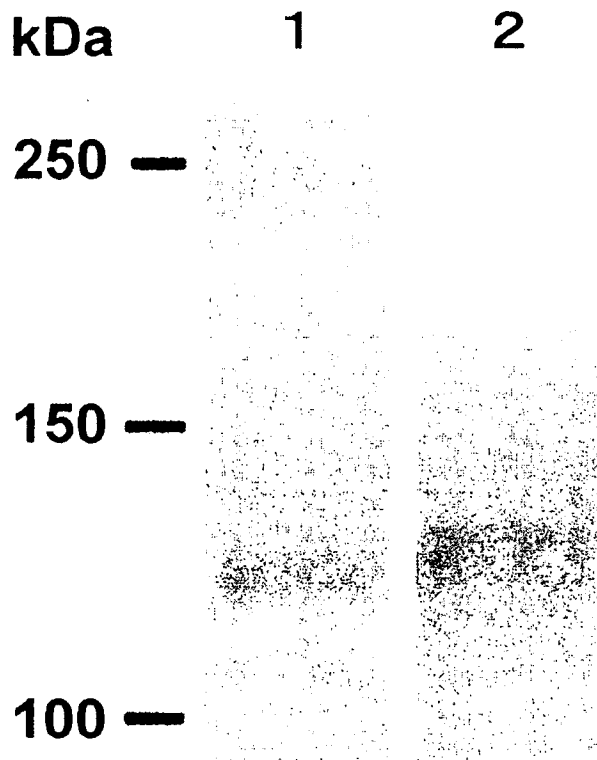


FIG. 11

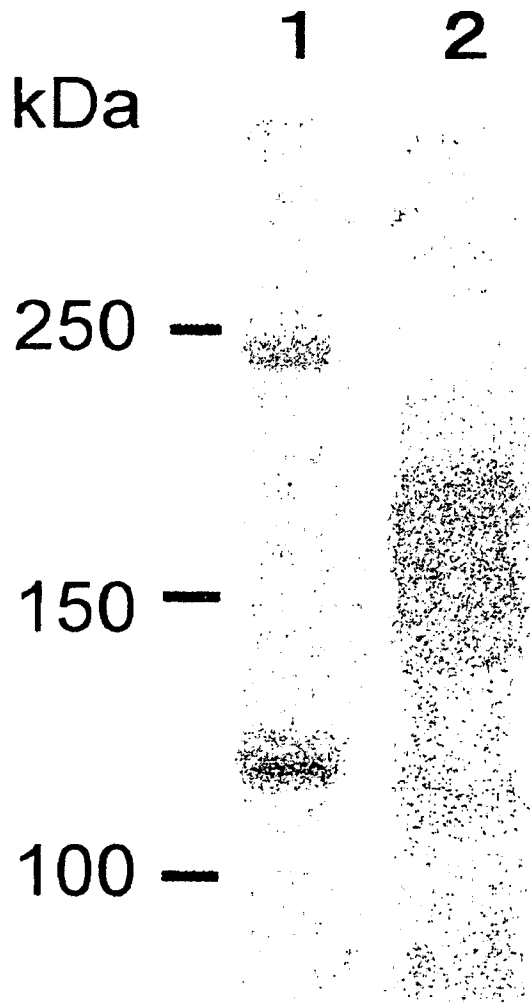


FIG. 12

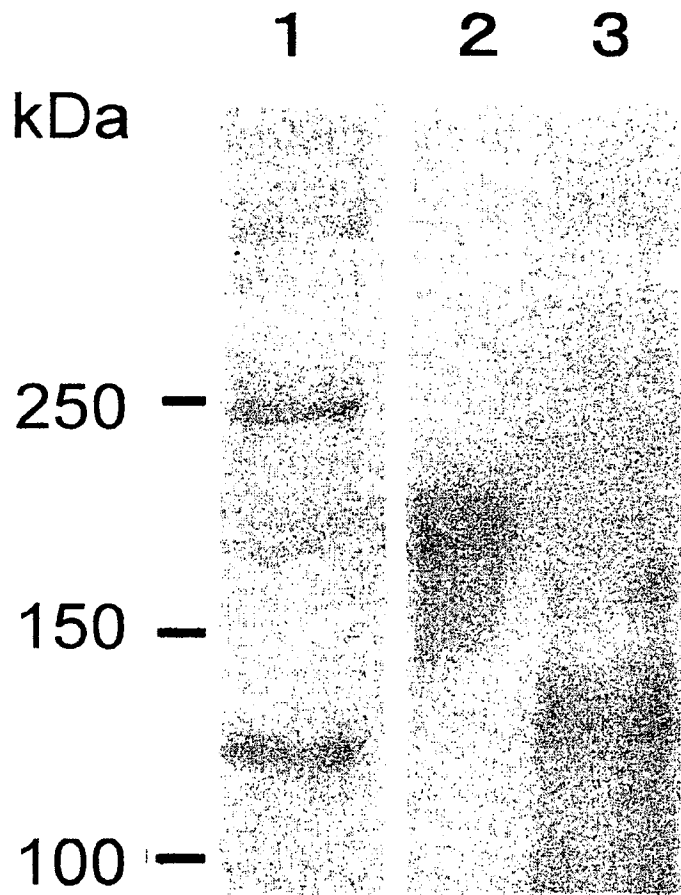


FIG. 13

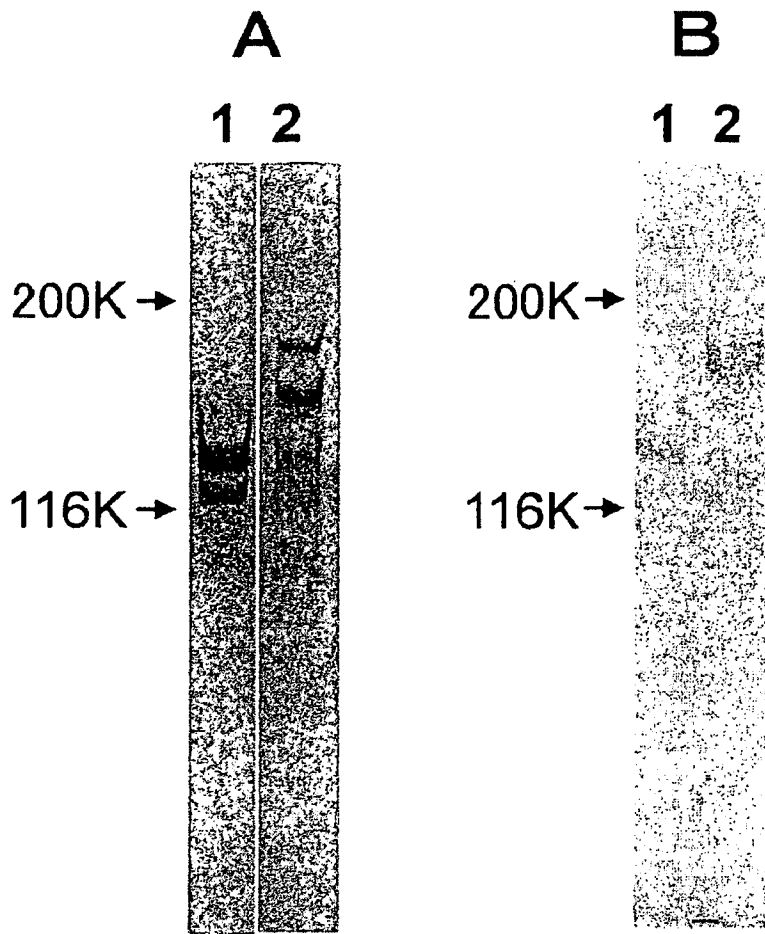


FIG. 14