

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 198**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)

**C07K 14/78** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2009 E 09834882 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2380979**

54 Título: **Sustancia proteínica que tiene estructura de hélice triple y método de producción de la misma**

30 Prioridad:

**22.12.2008 JP 2008325691**

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

**21.05.2015**

73 Titular/es:

**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION  
HOKKAIDO UNIVERSITY (50.0%)  
8, Kita 8-jo Nishi 5-chome Kita-ku Sapporo-shi  
Hokkaido 060-0808, JP y  
FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**SUZUKI, YUSUKE;  
TAHARA, HIROSHI;  
YAMAMOTO, KEIICHI;  
KITAHARA, YUZURU y  
SUZUKI, YASUHIKO**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 536 198 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**

Sustancia proteínica que tiene estructura de hélice triple y método de producción de la misma

Campo técnico

5 La presente invención se relaciona con proteínas que tienen una estructura de hélice triple y métodos para producirlas. Más específicamente, la presente invención se relaciona con análogos de colágeno tipo humano y métodos para producirlas. Un objetivo de la presente invención es proveer análogos de colágeno compuestos de proteínas recombinantes tipo humano que son seguras para los organismos vivos y pueden ser purificadas y obtenidas fácilmente, y métodos para producirlas. Más específicamente, la presente invención provee métodos para producir análogos de colágeno compuestos de una proteína recombinante en la cual los genes introducidos son todos de tipo humano, en donde el método es llevado a cabo mediante la transducción estable de un vector de expresión en mamíferos insertado con un ADNc de una proteína recombinante que comprende colágeno tipo humano en células de ovario de hámster chino (CHO).

Técnica antecedente

15 En años recientes, un ejemplo de los materiales más importantes en la medicina regenerativa es el colágeno. El colágeno es una proteína representativa distribuida en casi todos los tejidos (piel, huesos, cartílagos y similares) en organismos vivos, y es bien conocido que tiene funciones importantes en los organismos vivos tales como mantener la estructura de los tejidos y órganos biológicos convirtiéndose en un soporte para las células. Además, tiene diversas funciones fisiológicas que regulan la proliferación, diferenciación y migración de las células. A partir de estos hechos, está recibiendo atención en el campo de la medicina regenerativa a través de su uso junto con células, factores de crecimiento y similares en la medicina de la ingeniería de tejidos. Hasta ahora, el colágeno ha sido usado ampliamente en el campo médico como implantes de órganos artificiales (Documento de Patente 1), matrices de liberación de fármacos sostenida (Documento de Patente 2), piel artificial (Documento de Patente 3), y componentes de materiales biocompatibles para uso en matrices de vendajes para heridas y matrices para el tratamiento de heridas (Documento de Patente 4).

25 Cuarenta por ciento de todo el colágeno de un organismo vivo está en la piel, y el 70 por ciento o más del peso seco de la piel/tendones es colágeno. Por lo tanto, el colágeno es importante en el desarrollo de la piel artificial. En particular, el colágeno es utilizado como un biomaterial para reparar daños en organismos. Por ejemplo, se utiliza como material de recubrimiento para sitio de lesiones de piel, tales como una quemadura, y se ha reportado curación y mejora (Documentos no Patente 1 y 2). Esto significa que se pueden tener grandes esperanzas para aplicaciones en el campo actual significativamente avanzado de la medicina regenerativa. Además, se utiliza como un material útil en técnicas para el cultivo de células y órganos (Documentos de Patente 5 y 6). Además, se ha señalado que la ingestión oral de colágeno (colágeno tipo 2) y similares puede ser utilizada para suprimir la artritis reumatoide (Documento no Patente 3). Además, se ha reportado que es posible tratar diseñando un gen de expresar un péptido parcial de colágeno humano (colágeno tipo VII), e introducir un gen de colágeno de bajo peso molecular en las células de la epidermólisis bulosa (Documento no Patente 4).

40 Muchos de los colágenos usados actualmente son derivados de especies de mamíferos no humanos tales como bovinos o cerdos. Se ha reportado que cuando estos colágenos son trasplantados a humanos, se presenta reacción alérgica en aproximadamente el 3% de los pacientes (Documentos no Patentes 5 y 6). Adicionalmente, en años recientes, el riesgo de contaminación del colágeno derivado de especies de mamíferos no humanos con priones o patógenos se ha convertido en un problema principal. Por lo tanto, se desea fuertemente un sistema para producir colágenos tipo humano seguros con baja antigenicidad y libres de riesgo de contaminación por patógenos.

45 Para evitar tales problemas, algunos inventores han inventado un método para producir colágeno humano recombinante que tiene una estructura de hélice triple equivalente a la del cuerpo humano infectando células de insectos con un virus recombinante insertado con un ADNc que codifica colágeno humano, y han solicitado una patente (Documento de Patente 7). Adicionalmente, también se han diseñado métodos para producir colágeno humano utilizando células de mamíferos o células de levadura (Documento de Patente 8).

[Documentos de la técnica anterior]

[Documentos de Patente]

50 [Documento de Patente 1] Solicitud de Patente Japonesa de Kokai Publicación No. (JP-A) 2007-204881 (Solicitud de Patente Japonesa no examinada, publicada)

[Documento de Patente 2] JP-A (Kokai) 2001-316282

[Documento de Patente 3] JP-A (Kokai) 2005-314

[Documento de Patente 4] JP-A (Kokai) 2007-160092

[Documento de Patente 5] JP-A (Kokai) 2002-142753

[Documento de Patente 6] Solicitud de Patente Japonesa de Saikohyo Publicación No. (JP-A) 2005-014774 (Publicación de fase nacional Japonesa no examinada correspondiente a una publicación internacional Japonesa)

5 [Documento de Patente 7] JP-A (Kokai) 8-23979

[Documento de Patente 8] Solicitud de Patente Japonesa de Kohyo Publicación No. (JP-A) 7-501939 (Publicación de fase nacional Japonesa no examinada correspondiente a una publicación internacional no Japonesa).

[Documentos no Patente]

[Documento no Patente 1] Surg. Forum, 10, 303 (1960)

10 [Documento no Patente 2] J. Surg. Forum, 10, 485-491 (1960)

[Documento no Patente 3] Science, 261, 1727-1730 (1993)

[Documento no Patente 4] THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 275, No. 32, Expedido Agosto 11 11, pp. 24429-24435, 2000

[Documento no Patente 5] J. Immunol. 136:877-882, 1986

15 [Documento no Patente 6] Biomaterials 11:176-180, 1990

#### Resumen de la invención

[Problemas para ser resueltos por la invención]

De esta manera, el colágeno es una sustancia útil como un producto farmacéutico o un biomaterial para trasplante de donantes vivos o medicina regenerativa; sin embargo, el colágeno utilizado convencionalmente, es derivado de tejidos de especies de mamíferos no humanas tales como cerdos y ganado. El colágeno es originalmente una proteína con baja inmunogenicidad, y está siendo trasplantado, embebido o administrado en el cuerpo humano como un biomaterial. Sin embargo, aunque en baja frecuencia, hay reportes de que se evocan reacciones inmunes por parte del colágeno derivado de tejidos de especie de mamíferos no humanos (J. Immunol., 136, 877-882 (1986); Biomaterials, 11, 176-180 (1990)). Adicionalmente, debido a la posibilidad de contaminación con priones sugerida en el caso del ganado, no es posible utilizar colágeno derivado de ganado. Además, no hay garantía de que contaminantes desconocidos (virus patogénicos y similares) como la contaminación por priones no estén contenidos en mamíferos tales como los cerdos que se utilizan actualmente para la purificación y extracción de colágeno, y han ido surgiendo problemas de seguridad con el uso de colágeno derivado de mamíferos no humanos para humanos. Adicionalmente, un problema con el colágeno derivado biológicamente es que se hace necesaria una purificación de etapas múltiples durante la purificación debido a la inclusión de gran cantidad de proteínas contaminantes, y el método de purificación se hace complicado.

A la luz de los problemas antes mencionados, el colágeno derivado de humanos es deseable como biomaterial para ser utilizado directamente en humanos. El colágeno derivado de humanos puede ser purificado a partir de fuentes humanas (tales como placenta humana) (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,002,071 y 5,428,022). Sin embargo, hay varios problemas en el uso de colágenos derivado de humanos (1) puesto que el material es tejido humano, el material tiene suministro limitado; (2) no se puede eliminar completamente la posibilidad de la contaminación con virus patogénicos tales como virus de hepatitis y virus de inmunodeficiencia humana (HIV); (3) los tipos de colágeno recolectados de la placenta son desproporcionados y las calidades no son completamente idénticas; y (4) hay problemas éticos concernientes a la extracción y purificación de colágeno a partir de humanos. El problema cualitativo también existe puesto que la purificación se hace difícil debido a la formación de puentes no especificados en el colágeno obtenido.

Hasta el momento, se han investigado métodos que utilizan técnicas de ingeniería genética para producir colágeno para eliminar el riesgo de contaminación por patógenos y para obtener grandes cantidades de colágeno para las cuales las etapas de aislamiento y purificación son fáciles (Biochem. Soc., 28, 350-353 (2000)). Sin embargo, el peso molecular de una molécula de colágeno es 100,000 o más si es muy grande, y la producción de un vector de expresión para introducción en células anfitrionas es muy complicada. Además, los métodos convencionales no generan niveles de producción que puedan sostener las aplicaciones prácticas. Adicionalmente, el colágeno es una molécula que adopta una estructura de hélice triple en la cual se ensamblan tres cadenas de polipéptidos, y tal estructura es formada experimentando un número de modificaciones postraduccion (N. Engl. J. Med., 31, 376-386 (1984)), pero solamente se espera que células específicas posean tales capacidades de modificación.

Es sabido que con el fin de que el colágeno forme una estructura de hélice triple, las prolinas en el dominio del colágeno deben ser hidroxiladas. Para producir colágeno que tenga una estructura de hélice triple, se proveyó un método para producir colágeno recombinante por coexpresión de colágeno humano y prolina hidroxilasa en células de insecto (JP-A (Kokai) 2002-315580). Sin embargo, para coexpresar la prolina hidroxilasa, al menos tres genes, esto es, el de colágeno y la subunidad  $\alpha$  y la subunidad  $\beta$  de la prolina hidroxilasa, deben ser coexpresados y la clonación de las células se hace muy complicada.

La producción de colágeno recombinante derivado de humanos utilizando células de embrión de hámster, células de fibroblasto de ratón y similares como anfitriones ha sido probada desde antes (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84, 764-768 (1987); J. Biol. Chem., 264, 20683-20687 (1989)). Las estructuras moleculares de los colágenos obtenidos en estos ejemplos fueron normales, pero el colágeno derivado de las células anfitrionas y el colágeno derivado de genes foráneos fueron mezclados. Adicionalmente, en un ejemplo en donde se expreso el colágeno tipo II en células de fibrosarcoma humana HT1080 (Biochem. J., 298, 31-37 (1994)), el nivel de producción fue muy bajo (0.5 a 1 mg por 1 L de cultivo), y esto no fue sostenible para uso práctico. Adicionalmente, fue observada una cantidad igual de colágeno tipo IV derivado de células HT1080 de fibrosarcoma humanas como el del colágeno tipo II derivado de genes foráneos. Por lo tanto, el colágeno tipo II derivado de gen foráneo tiene que ser separado del colágeno tipo IV endógeno y fue impráctico también en este aspecto. Por lo tanto, incluso si se utiliza un sistema de expresión, se hace necesario examinar las condiciones de purificación meticulosas, y se considero que incluso bajo condiciones de contaminantes mixtos, es necesario un método de purificación simple y productivo.

Además de lo anterior, hay ejemplos en los cuales el colágeno humano fue expresado utilizando levadura, (JP-A (Kohyo) H07-501939) células de insecto (JP-A (Kokai) H08-23979), *Bacillus brevis* (JP-A (Kokai) H11-178574), y *Escherichia coli* (JP-A (Kokai) 2002-325584). Sin embargo, estos pueden tener el riesgo de producir el colágeno con diferentes modificaciones postraducción a partir de las del colágeno humano de origen natural. Como se describió anteriormente, todos los métodos indicados hasta ahora no son sostenibles para uso práctico como medios para producir colágeno humano por ingeniería genética, tanto cualitativa como cuantitativamente. Adicionalmente, hasta el momento no se han examinado métodos para producir una gran cantidad de proteína que tenga una estructura de hélice triple, tal como un colágeno recombinante diseñado para tener un peso molecular bajo.

A la vista de las circunstancias anteriores, los solicitantes han investigado la producción de colágeno tipo I humano mediante la aplicación de técnicas de ingeniería genética para obtener el colágeno no antigénico, eliminar el riesgo de contaminación por patógenos y obtener colágeno que sea fácil de aislar y purificar (Publicación Internacional WO 2006/106970). Aunque los métodos convencionales pueden asegurar un cierto nivel de producción, se requiere un sistema en el cual se formen más estructuras de hélice triple. La mejora fue considerada necesaria también en términos del nivel de expresión.

La presente invención fue lograda a la vista de las circunstancias anteriores. Un objetivo de la presente invención es proveer proteínas análogas al colágeno tipo humano seguras que tienen una estructura de hélice triple, y métodos para producirlas.

[Medios para resolver los problemas]

Los presentes inventores llevaron a cabo diversos exámenes para resolver los problemas antes mencionados y produjeron exitosamente análogos de colágeno purificados fácilmente (minicolágenos) que tienen una estructura de hélice triple y un peso molecular más pequeño que el de los colágenos de tipo de origen natural, introduciendo en células anfitrionas un constructo producido por la fusión de un gen de dominio peptídico de señalización de colectina humana y un gen de dominio rico en cisteína de colectina humana en el lado del terminal amino y un gen de dominio de cuello de colectina humana y un gen de dominio de reconocimiento de carbohidratos de colectina humana al lado del terminal carboxi del domino de colágeno del gen de colágeno el cual es una proteína que tiene una estructura de hélice triple.

Ejemplos de proteínas conocidas que tienen una estructura de hélice triple incluyen la lectina de enlace al manano humana (MBL) y la conglutinina. Al reducir el peso molecular de los análogos de colágeno de la presente invención para acercarlos a los de estas proteínas, las proteínas análogas al colágeno que tienen una estructura de hélice triple con peso molecular reducido, las cuales han sido difíciles de obtener hasta la fecha, fueron producidas exitosamente. Adicionalmente, estas proteínas análogas del colágeno demostraron tener una estructura de hélice triple y estabilidad térmica.

El colágeno humano de origen natural tiene pobre solubilidad en agua, mientras que los análogos de colágeno de la presente invención muestran alta solubilidad en agua puesto que comprenden el dominio rico en cisteína soluble en agua, el dominio de cuello, y el dominio de reconocimiento de carbohidratos de la colectina humana. Por lo tanto, son más fáciles de manejar en comparación con los colágenos de origen natural que tienen un peso molecular alto.

Los presente inventores precipitaron los análogos de colágeno promoviendo la formación de fibrilas agregando una alta concentración de sal neutra, y exitosa y fácilmente purificaron análogos de colágeno fibroso que tenían una estructura de hélice triple por centrifugación.

Adicionalmente, los presentes inventores purificaron exitosamente análogos de colágenos solubles en agua mediante un método de purificación simple de una etapa, utilizando manano agarosa la cual utiliza el enlazamiento del dominio de reconocimiento de carbohidratos al manano.

5 Utilizando los diferentes métodos de purificación descritos más arriba, los presentes inventores purificaron exitosamente dos análogos de colágeno que tienen diferentes propiedades físicas: un análogo de colágeno fibroso con alta resistencia física; y un colágeno soluble en agua con alta solubilidad que se enlaza al manano. Estos análogos de colágeno han demostrado tener los mismos grados de adhesividad celular y propiedades de elongación que el colágeno humano de origen natural cuando se utilizan como biomaterial en células adherentes humanas. Se espera que los análogos de colágeno de la presente invención puedan ser útiles como reemplazo para el colágeno usado convencionalmente derivado de especies de mamíferos no humanos, o como biomateriales para uso en humanos.

15 Como resultado de llevar a cabo diversos exámenes para resolver los problemas antes mencionados, los presentes inventores inventaron un constructo del gen de colágeno que puede ser purificado fácilmente y que mantiene una estructura de hélice triple equivalente a la del colágeno de origen natural a la vez que tiene bajo peso molecular. Específicamente, puesto que CR-D (un péptido de señalización) tiene un dominio de reconocimiento de carbohidratos, se permite purificación de una etapa por purificación por afinidad. Sustituyendo una porción de un gen estructural de colágeno humano de la presente invención con la porción de gen estructural similar a colágeno de MBL, ha sido posible obtener colágenos de bajo peso molecular que mantiene una estructura de hélice triple en grandes cantidades y con alta pureza.

20 Más específicamente, los presentes inventores produjeron exitosamente grandes cantidades de análogos de colágeno humano introduciendo un constructo en el cual un gen análogo de colágeno de la presente invención está contenido en un vector capaz de expresar altamente un gen foráneo utilizando como anfitrión células de ovario de hámster chino (CHO) las cuales (1) han sido utilizadas para producir agentes farmacéuticos y está confirmado que son seguras y (2) se cree que tienen modificaciones de cadena de azúcar y las correspondientes de proteínas que son cercanas a las de los humanos puesto que son células de mamíferos.

25 Más específicamente, los presentes inventores desarrollaron exitosamente un método para producir grandes cantidades de colágeno análogos de la presente invención sin la necesidad de etapas de purificación complicadas, minimizando la mezcla de colágeno derivado del anfitrión y colágeno derivado del gen foráneo, usando células de mamífero que tienen un bajo nivel de expresión de colágeno (una proteína que tiene estructura de hélice triple) como anfitrionas. A partir de lo anterior, se completó la presente invención.

Específicamente, la presente invención provee lo siguiente:

[1] una proteína recombinante que tiene una estructura de hélice triple, la cual comprende una proteína codificada por un polinucleótido que comprende (i) a (v) a continuación en orden desde el terminal amino:

(i) un gen de dominio de péptido de señalización de colectina humana;

35 (ii) un gen de dominio rico en cisteína de colectina humana;

(iii) un gen de dominio de colágeno de colágeno humano;

(iv) un gen de dominio de cuello de colectina humana; y

(v) un gen de dominio de reconocimiento de carbohidratos de colectina humana;

40 [2] teniendo la proteína recombinante una estructura de hélice triple de [1], en donde el gen de dominio de péptido de señalización de la colectina humana es un gen de dominio de péptido de señalización de la proteína D surfactante humana (SP-D) y un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4;

[3] la proteína recombinante que tiene una estructura de hélice triple de [1], en donde el gen de dominio rico en cisteína de la colectina humana es un gen de dominio rico en cisteína de la proteína D surfactante humana (SP-D) y un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5;

45 [4] la proteína recombinante que tiene una estructura de hélice triple de [1] en donde el gen de dominio de cuello de la colectina humana es un gen de dominio de cuello de la lectina de enlazamiento al manano humana (MBL) y un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6;

50 [5] la proteína recombinante que tiene una estructura de hélice de [1], en donde el gen de dominio de reconocimiento de carbohidratos de la colectina humana es un gen de dominio de reconocimiento de carbohidratos de lectina de enlazamiento a manano humano (MBL) y un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7;

- [6] teniendo la proteína recombinante una estructura de hélice triple de [1], en donde el gen de dominio de colágeno del colágeno humano comprende al menos uno o más tipos de genes de dominio de colágeno de colágenos humanos de cadena  $\alpha$ ;
- 5 [7] la proteína recombinante que tiene una estructura de hélice triple [1], en donde el dominio de gen de colágeno de colágeno humano es un gen de dominio de colágeno de un colágeno tipo I humano que comprende un colágeno humano de cadena  $\alpha$ ;
- [8] teniendo la proteína recombinante una estructura de hélice triple de [6] o [7], en donde el gen de dominio de colágeno de un colágeno humano de cadena  $\alpha$  es un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8;
- 10 [9] teniendo la proteína recombinante una estructura de hélice triple de [1], la cual comprende una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;
- [10] teniendo la proteína recombinante una estructura de hélice triple de [1], en donde el polinucleótido es un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3;
- 15 [11] un método para producir una proteína que tiene una estructura de hélice triple, en donde el método comprende las etapas de:
- (a) introducir un vector en un polinucleótido que comprende de (i) a (v) por debajo en orden desde el terminal amino:
- (i) un gen de dominio de péptido de señalización de colectina humana;
- (ii) un gen de dominio rico en cisteína de colectina humana;
- (iii) un gen de dominio de colágeno de colágeno humano;
- 20 (iv) un gen de dominio de cuello de colectina humana; y
- (v) un gen de dominio de reconocimiento de carbohidratos de colectina humana;
- (b) transformando una célula del anfitrión por introducción de genes usando el vector; y
- (c) cultivar o cruzar el transformante y recolectar una proteína que tenga una estructura de hélice triple a partir del aceite o de su sobrenadante de cultivo;
- 25 [12] el método de [11], en donde el gen de dominio de péptido de señalización de la colectina humana es un gen de dominio del péptido de señalización de proteína D surfactante humana (SP-D) y un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4;
- [13] el método de [11], en donde el gen de dominio rico en cisteína de colectina humana es un gen de dominio rico en cisteína de la proteína D surfactante humana (SP-D) y un polinucleótido que comprende la secuencia de
- 30 nucleótidos de SEQ ID NO: 5;
- [14] el método de [11], en donde el dominio del gen de cuello de colectina humana es un dominio de gen del cuello versus lectina enlazante a manano humana (MBL) y un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6;
- 35 [15] el método de [11], en donde el gen de dominio de reconocimiento de carbohidrato de una colectina humana es un gen de dominio de reconocimiento de carbohidratos de la lectina de enlazamiento humana (MBL) y un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótido de SEQ ID NO: 7;
- [16] el método de [11], en donde el gen de dominio de colágeno de colágeno humano comprende al menos uno o más tipos de genes de dominio de colágeno de colágenos humanos de cadena  $\alpha$ ;
- 40 [17] el método de [11], en donde el gen de dominio de colágeno del colágeno humano es un gen de dominio de colágeno de un colágeno tipo I humano que comprende un colágeno humano de cadena  $\alpha$ ;
- [18] el método [16] o [17], en donde el gen de dominio de colágeno de un colágeno humano de cadena  $\alpha$  es un polinucleótido que comprende la secuencia del nucleótido de SEQ ID NO: 8;
- [19] el método de [11], en donde el vector utilizado en la etapa (a) es pNC1 de SEQ ID NO: 2; y
- [20] el método de [11], en donde el vector utilizado en la etapa (a) es pDC6/CF de SEQ ID NO: 9.

Breve descripción de los dibujos

- La figura 1 muestra el constructo pNC1/minicolágeno tipo I con las respectivas abreviaturas mostradas a continuación. PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento de conejo; minicolágeno tipo I: ADN minicolágeno; PABGH: señal de adición poliA del gen de la hormona del crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 de simio con potenciador eliminado; NPT: ADNc de neomicina fosfotransferasa; PASV: señal de adición poliA 40 de virus de simio; y Amp<sup>r</sup>: marcador de selección (resistencia a la ampicilina) en E. coli.
- La figura 2 muestra el constructo pDC6/CF\_minicolágeno tipo I con las respectivas abreviaturas mostradas a continuación. PCMV5: promotor de citomegalovirus 5; minicolágeno tipo I: ADN minicolágeno; PABGH: señal de adición poliA de gen de hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor de virus 40 de simio con potenciador eliminado; cd180DHFR: gen DHFR con traducción impedida producido por la alteración de codones en el rango de 180 bases del extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de DHFR a los codones menos frecuentemente usados en mamífero; PASV: señal de adición poliA 40 de virus de simio; y Amp<sup>r</sup>: marcador de selección (de resistencia a la ampicilina) en E. coli.
- La figura 3 es un diagrama de flujo de la purificación de minicolágeno. Todas las etapas fueron llevadas a cabo a 4°C a menos que se especifique otra cosa. En la figura, \* 1 indica la etapa de ajustar las células a  $2.0 \times 10^5$  células/mL con medio IS CD-CHO con hidrolizado (IS JAPAN) suplementado para tener una concentración final de Gluta MAX™-I 4 mM (GIBCO), 0.4 mg de cultivo celular probado G418 (CALBIOCHEM), y solución de suplemento 1 x HT (GIBCO), y cultivado por cultivo estacionario en matraces T75 (FALCON) a 37°C en la presencia de dióxido de carbono al 5% durante 14 días (Celda 150 HERA, Heraeus). \*2 indica la etapa de centrifugación a 1,750 x g durante una hora (EX-126, TOMY). \*3 indica la etapa de adición de cloruro de sodio (Wako) al sobrenadante (1.4 L) para obtener 0.4 M. \*4 indica la etapa de ajustar el pH a 7.4 (F-51, HORIBA) a 4°C utilizando hidróxido de sodio (Wako). \*5 indica la etapa de concentrar el sobrenadante del cultivo a 1/20 veces su volumen utilizando filtración de flujo transversal (VIVAFLOW50; 10,000 MWCO PES; VIVASIENCE). \*6 indica la etapa de dializar (membranas de diálisis Spectra/Pro™ Biotech; 10,000 MWCO; Spectrum Laboratories, Inc.) durante tres días contra TBS (TBS en polvo, Takara) que contiene EDTA 5 mM (Dojindo). \*7 indica la etapa de agregar cloruro de calcio (Wako) y cloruro de sodio (Wako) para obtener 20 mM y 2 M, respectivamente. \*8 indica la etapa de dializar (membranas de diálisis Spectra/Pro™ Biotech éster de celulosa (CE); 25,000 MWCO; Spectrum Laboratories, Inc.) contra agua MilliQ (MILLIPORE) durante cinco días. \*9 indica las etapas de llenar una Econo-Column (Bio-RAD) con 4.5 mL de gel de manano agarosa (SIGMA), lavando y equilibrando el gel con 45 mL de TBS (TBS en polvo, Takara) que contiene EDTA 5 mM (Dojindo) y TBS (TBS en polvo, Takara) que contiene cloruro de calcio 5 mM (Wako), cargando el sobrenadante por circulación a una tasa de flujo de 1.0 mL/minuto durante 17.5 horas, removiendo el sobrenadante, lavando luego con 10 mL de TBS (TBS en polvo, Takara) que contiene cloruro de calcio 5 mM (Wako), y eluyendo el minicolágeno con 20 mL de TBS (TBS en polvo, Takara) que contiene EDTA 5 mM (Dojindo). \* 10 indica la etapa de dializar (membranas de diálisis Spectra/Pro™ Biotech; 10,000 MWCO; Spectrum Laboratories, Inc.) contra cloruro de sodio 0.4 M – regulador Tris-clorhidrato 0.1 M (pH 7.4 a 4°C) durante 5 días. \*11 indica la etapa de concentrar a 1/10 veces el volumen por ultrafiltración a 1,750 x g durante 30 minutos utilizando Amicon Ultra-15 (10,000 MWCO; MILLIPORE).
- La figura 4 muestra en una fotografía el resultado del análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS bajo condiciones reductoras (con adición de 2-mercaptoetanol) de proteínas purificadas a partir del sobrenadante de cultivo y minicolágeno soluble en agua. La línea 1 muestra proteínas purificadas como un precipitado y la línea 2 es un minicolágeno soluble en agua purificado sobre una columna de manano agarosa. El peso molecular y el oligómero del minicolágeno están indicados en la fotografía.
- La figura 5 muestra en una fotografía el resultado de análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS bajo condiciones no reductoras (sin adición de 2-mercaptoetanol) de proteínas purificadas a partir del sobrenadante de cultivo y de minicolágeno soluble en agua. La línea 1 muestra las proteínas purificadas como un precipitado y la línea 2 es minicolágeno soluble en agua purificado sobre una columna de manano agarosa. El peso molecular y los oligómeros de minicolágeno están indicados sobre la fotografía.
- La figura 6 muestra en una fotografía el resultado del análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones originales (sin adición de 2-mercaptoetanol y SDS) de proteínas purificadas a partir del sobrenadante del cultivo y minicolágeno soluble en agua. La línea 1 muestra proteínas purificadas como un precipitado y la línea 2 es minicolágeno soluble en agua purificado sobre una columna de manano agarosa. El peso molecular y los oligómeros de minicolágeno están indicados sobre la fotografía.
- La figura 7 muestra en una fotografía resultados obtenidos llevando a cabo electroforesis en gel de poliacrilamida SDS bajo condiciones reductoras (con adición de 2-mercaptoetanol) de proteínas purificadas a partir del sobrenadante de cultivo y minicolágeno soluble en agua (llevando a cabo inmunoprecipitación Western utilizando un anticuerpo policlonal anti-MBL de conejo (dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD)), y reversando el contraste de la fotografía de la detección por quimioluminiscencia. La línea 1 muestra proteínas purificadas como un

precipitado y la línea 2 es minicolágeno soluble en agua purificado sobre una columna de manano agarosa. El peso molecular y el oligómero de minicolágeno están indicados sobre la fotografía.

5 La figura 8 muestra en una fotografía el resultado obtenido llevando a cabo electroforesis en gel de poliacrilamida SDS bajo condiciones no reductoras (sin adición de 2-mercaptoetanol) de proteínas purificadas a partir del sobrenadante del cultivo y de minicolágeno soluble en agua, llevando a cabo inmunoprecipitación Western utilizando un anticuerpo policlonal anti-MBL de conejo (dominio de reconocimiento de carbohidrato (CRD)), y luego reversando el contraste de la fotografía de detección por quimioluminiscencia. La línea 1 muestra proteínas purificadas como un precipitado y la línea 2 es minicolágeno soluble en agua purificado sobre una columna de manano agarosa. El peso molecular y los oligómeros de minicolágeno están indicados sobre la fotografía.

10 La figura 9 muestra en una fotografía el resultado del análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS bajo condiciones reductoras (con adición de 2-mercaptoetanol) de la proteína purificada y del atelocolágeno tipo I humano de origen natural digerido con pepsina bajo condiciones ácidas. Las posiciones de las bandas para el minicolágeno, el dominio de colágeno del minicolágeno restante después de la digestión, y la pepsina están indicadas sobre la fotografía. Línea 1: marcador de peso molecular, línea 2: proteína purificada no digerida con pepsina; línea 3: proteína purificada digerida con pepsina; línea 4: atelocolágeno tipo I humano de origen natural no digerido con pepsina; línea 5: atelocolágeno tipo I humano de origen natural digerido con pepsina; y línea 6: pepsina sola agregada.

15 La figura 10 muestra en una fotografía los resultados de analizar la estabilidad térmica sometiendo a las proteínas purificadas a tratamiento con calor en un rango de temperatura de 30°C a 50°C, llevando a cabo un tratamiento con enzimas utilizando una combinación de tripsina y quimotripsina altamente concentradas bajo condiciones en las cuales no se digiere el colágeno, y llevando a cabo electroforesis en gel de poliacrilamida SDS bajo condiciones reductoras (con adición de 2-mercaptoetanol). Las posiciones de las bandas para minicolágeno, el dominio del colágeno del minicolágeno restante después de la digestión, tripsina y quimotripsina están indicadas sobre la fotografía. La línea 1 es el marcador de peso molecular, la línea 2 es la proteína purificada no sometida a tratamiento con enzima, las líneas 3 a 15 son proteínas purificadas sometidas a tratamiento con calor en un rango de temperatura de 30°C a 50°C, y luego sometidas a tratamientos con enzimas de tripsina y quimotripsina, la línea 16 es tripsina sola, y la línea 17 es quimotripsina sola.

20 La figura 11 es un diagrama de curva de fusión que muestra la proporción de la banda de dominio de colágeno digerida de acuerdo con la temperatura de calentamiento con base en el resultado del ensayo de estabilidad térmica ejecutado sobre la proteína purificando utilizando tripsina y quimotripsina de la figura 10.

25 La figura 12 es un diagrama de flujo de la purificación de minicolágeno utilizando precipitación. Todas las etapas fueron llevadas a cabo a 4°C al menos que se especifique otra cosa. En la figura, \* 1 indica la etapa de ajustar las células CHO que expresan minicolágeno (pNC7/MC21) a  $2.0 \times 10^5$  células/mL con medio IS CHO-CD con hidrolizado (IS JAPÓN) suplementado hasta una concentración final de Gluta MAX™-I 4 mM (GIBCO), cultivo celular de sulfato G418 probado 0.4 mg/mL (CALBIOCHEM), y solución de suplemento 1 x HT (GIBCO), y cultivando por cultivo estacionario en matraces T-75 (FALCON) a 37°C en la presencia de dióxido de carbono al 5% durante 14 días (Celda 150 HERA, Heraeus). \*2 indica la etapa de centrifugar a 1,750 x g durante 10 minutos (EX-126, TOMY). \*3 indica la etapa de agregar cloruro de sodio (Wako) al sobrenadante para obtener 0.4 M (pH 7.4) e incubar a 4°C. \*4 indica la etapa de centrifugar a 10,000 x g durante 30 minutos (EX-126, TOMY). \*5 indica la etapa de concentrar el sobrenadante del cultivo a un volumen de 320 mL utilizando filtración por flujo cruzado (VIVAFLOW50; 10,000 MWCO PES; VIVASIENGE). \*6 indica la etapa de agregar cloruro de sodio (Wako) para obtener 4 M (pH 7.4) e incubar a 4°C. \*7 indica la etapa de centrifugar a 9,400 x g durante 30 minutos (EX-126, TOMY). \*8 indica la etapa de agregar 1.5 mL de solución de ácido acético 50 mM (Wako) al precipitado. \*9 indica la etapa de dializar (membranas de diálisis de éster de celulosa (CE) Spectra/Pro™ Biotech; 10,000 MWCO; Spectrum Laboratories, Inc.) contra una solución de ácido acético 50 mM (Wako). \*10 indica la etapa de agregar 7.4 mL de la solución de ácido acético 50 mM al precipitado.

30 La figura 13 es un diagrama de flujo de la purificación de minicolágeno utilizando el enlazamiento con manano. Todas las etapas fueron llevadas a cabo a 4°C a menos que se especifique otra cosa. En la figura \*1 indica la etapa de ajustar células CHO que expresan minicolágeno (pNC7/MC-21) a  $2.0 \times 10^5$  células/mL con medio IS CHO-CD con hidrolizado (IS JAPÓN) suplementado para tener concentraciones finales de Gluta MAX™-I 4 mM (GIBCO), cultivo de células sulfato G418 probada a 0.4 mg/mL (CALBIOCHEM), y solución de suplemento 1 x HT (GIBCO), y cultivando por cultivo estacionario en matraces T-75 (FALCON) a 37°C en la presencia de dióxido de carbono al 5% durante 14 días (Celda 150 HERA, Heraeus). \*2 indica la etapa de centrifugar a 1,750 x g durante 10 minutos (EX-126, TOMY). \*3 indica la etapa de agregar cloruro de sodio (Wako) al sobrenadante para obtener 0.4 M (pH 7.4) e incubar a 4°C. \*4 indica la etapa de centrifugar a 10,000 x g durante 30 minutos (EX126, TOMY). \*5 indica la etapa de concentrar el sobrenadante del cultivo hasta un volumen de 320 mL utilizando filtración de flujo cruzado (VIVAFLOW50; 10,000 MWCO PES; VIVASIENGE). \*6 indica la etapa de agregar cloruro de sodio (Wako) para obtener 4 M (pH 7.4) e incubar a 4°C. \*7 indica la etapa de centrifugar a 9,400 x g durante 30 minutos (EX-126, TOMY). \*8 indica la etapa de agregar una solución de cloruro de calcio 1 M para obtener 20 mM y luego incubar a 4°C durante 18 horas. \*9 indica la etapa de concentrar el volumen a 56 mL utilizando filtración de flujo cruzado

(VIVAFLOW200; 30,000 MWCO PES; VIVASIENGE). \*10 indica la etapa de dializar (membranas de diálisis Spectra/Pro™ Biotech; 10,000 MWCO; Spectrum Laboratories, Inc.) contra TBS (TBS en polvo, Takara) que contiene EDTA 5 mM (Dojindo) durante siete días. \*11 indica las etapas de llenar una Econo-Column (Bio-RAD) con 5 mL de gel de manano agarosa (SIGMA), lavando y equilibrando el gel con 15 mL de TBS (TBS en polvo, Takara) que contiene EDTA 5 mM (Dojindo) y 45 mL de TBS (TBS en polvo, Takara) que contiene cloruro de calcio 5 mM (Wako), cargando el sobrenadante a una rata de flujo de 1.0 mL/min, luego lavando con 40 mL de TBS (TBS en polvo, Takara) que contiene cloruro de calcio 5 mM (Wako), y eluyendo el minicolágeno con 15 mL de TBS (TBS en polvo, Takara) que contiene EDTA 5 mM (Dojindo) para recolectar el primer pico (9 mL). \*12 indica la etapa de dializar (membranas de diálisis Spectra/Pro™ Biotech; 10,000 MWCO; Spectrum Laboratories, Inc.) el eluido contra cloruro de sodio 0.4 mM, regulador tris-clorhidrato 0.1 mM (pH 7.4 a 4°C) durante cinco días.

La figura 14 muestra los resultados de absorbancia medida en osteoblastos humanos las cuales son células adherentes (línea celular MG-63, ATCC), después de que fueron adheridas a 37°C durante una hora a placas recubiertas con atelocolágeno tipo I humano de origen natural, atelocolágeno tipo I bovino de origen natural, MC-sal, MC-Man, solución de BSA al 3% (p/v) desnaturalizada por calor, o PBS, las células no adheridas fueron removidos lavando, se agregó MTS, las placas fueron cultivadas a 37°C durante tres horas. El eje vertical muestra la absorbancia medida a la longitud de onda de 490 nm con la longitud de onda de 655 nm como control, y el eje horizontal muestra los nombres de cada una de las muestras colocadas como recubrimiento sobre las placas.

La figura 15 muestra en fotografías en contraste de fases microgramos de células después de que el atelocolágeno tipo I humano de origen natural, el atelocolágeno tipo I bovino de origen natural, MC-sal, MC-Man, solución de BSA al 3% (p/v) desnaturalizada por calor, y PBS fueron colocados como recubrimiento sobre las placas, los osteoblastos humanos se hicieron adherir a 37°C durante una hora, y las células no adheridas fueron removidas por lavado. Las fotografías muestran los estados de los osteoblastos humanos que se hicieron adherir sobre las placas recubiertas con: 1) atelocolágeno tipo I humano de origen natural; 2) atelocolágeno tipo I bovino de origen natural; 3) MC-sal; 4) MC-Man; 5) solución de BSA al 3% (p/v) desnaturalizada por calor; y 6) PBS. Las células para las cuales se observo elongación están indicadas por flechas.

La figura 16 muestra en fotografías de contraste de fases microgramos de células después de que el atelocolágeno tipo I humano de origen natural, el atelocolágeno tipo I bovino de origen natural, MC-sal, MC-Man, solución de BSA al 3% (p/v) desnaturalizada por calor, y PBS fueron colocados como recubrimiento sobre las placas, se hicieron adherir osteoblastos humanos a 37°C durante una hora, las células no adheridas fueron removidas por lavado y las placas fueron incubadas a 37°C durante tres horas. Las fotografías muestran los estados de los osteoblastos humanos que se hicieron adherir sobre las placas las cuales estaban recubiertas con: 1) atelocolágeno tipo I humano de origen natural; 2) atelocolágeno tipo I bovino de origen natural; 3) MC-sal; 4) MC-Man; 5) solución de BSA al 3% (p/v) desnaturalizada por calor; y 6) PBS. Las células para las cuales se observó la elongación están indicadas por flechas.

La figura 17 muestra las estructuras de minicolágeno tipo I y MC-GPP. A: dominio de péptido de señalización de proteína D surfactante humana (SP-D); B: dominio rico en cisteína de SP-D; C: colágeno tipo I humano (COL1A1) de hélice triple (593-769); D: triple hélice COL1A1 (1178-1192); E: dominio de cuello de manosa humana que enlaza lectina (MBL); F: dominio de reconocimiento de carbohidratos de MBL; y G: región 6 x His.

La figura 18 muestra el constructo pDC6/MC-GPP con las respectivas abreviaturas mostradas a continuación. PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de hormona de crecimiento de conejo; MC-GPP: ADNc de minicolágeno que carece de la porción de la región terminal C a la región GPP; PABGH: señal de adición poli A de gen de hormona de crecimiento bovina; PdSV: promotor 40 de virus de simio con eliminación de potenciado; cd180DHFR: gen DHFR con traducción impedida producido por la alteración de los codones en el rango de 180 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de DHFR a los codones menos frecuentemente usados en mamíferos; PASV: señal de adición poli A 40 de virus de simio; y Amp<sup>r</sup>: marcador de selección (de resistencia a la ampicilina) en E. coli.

La figura 19 muestra en una fotografía el resultado de análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS bajo condiciones reductoras (con adición de 2-mercaptoetanol) de MC-GPP purificado a partir del sobrenadante del cultivo. La línea 1 es la MC-GPP purificada, y el peso molecular y los oligómeros de MC-GPP están indicados sobre la fotografía.

La figura 20 muestra en una fotografía el resultado de análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS bajo condiciones no reductoras (sin adición de 2-mercaptoetanol) de MC-GPP purificada del sobrenadante del cultivo. La línea 1 es la MC-GPP purificada, y el peso molecular y los oligómeros de MC-GPP están indicados sobre la fotografía.

La figura 21 muestra en una fotografía el resultado del análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones nativas (sin adición de 2-mercaptoetanol y SDS) de MC-GPP purificada a partir del sobrenadante del cultivo. La línea 1 es la MC-GPP, y el peso molecular y los oligómeros de MC-GPP están indicados sobre la fotografía.

La figura 22 muestra en una fotografía el resultado obtenido llevando a cabo inmunoprecipitación Western bajo condiciones de reducción (con adición de 2-mercaptoetanol) de MC-GPP purificada a partir del sobrenadante del cultivo y reversando el contraste de la fotografía de detección por quimioluminiscencia. La línea 1 es la MC-GPP purificada, y el peso molecular y el oligómero de MC-GPP están indicados en la fotografía.

5 La figura 23 muestra en una fotografía el resultado obtenido llevando a cabo inmunoprecipitación Western bajo condiciones no reductoras (sin adición de 2-mercaptoetanol) de MC-GPP purificada a partir del sobrenadante del cultivo y reversando el contraste de la fotografía de detección por quimioluminiscencia. La línea 1 es la MC-GPP purificada, y el peso molecular y los oligómeros de la MC-GPP están indicados sobre la fotografía.

10 La figura 24 muestra en una fotografía el resultado del análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS bajo condiciones reductoras (con adición de 2-mercaptoetanol) llevado a cabo sobre MC-GPP, atelocolágeno tipo I humano de origen natural, y minicolágeno fibroso purificado digerido con pepsina bajo condiciones ácidas. Las posiciones de las bandas para MC-GPP, atelocolágeno humano de origen natural (cadenas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ ), minicolágeno, el dominio de colágeno restante del minicolágeno o MC-GPP después de la digestión y pepsina están indicados en la fotografía. Línea 1: adición de MC-GPP; línea 2: adición de MC-GPP digerida con pepsina; línea 3: adición de pepsina sola (misma cantidad que en la línea 2); línea 4: adición de atelocolágeno tipo I humano de origen natural; línea 5: adición de atelocolágeno tipo I humano de origen natural digerido con pepsina; línea 6: adición de pepsina sola (misma cantidad que en la línea 5); línea 7: adición de minicolágeno fibroso purificado; línea 8: adición de minicolágeno fibroso purificado digerido con pepsina; línea 9: adición de pepsina sola (misma cantidad que en la línea 8); y línea 10: sin adición de MC-GPP, atelocolágeno tipo I humano de origen natural, minicolágeno y pepsina.

20 La figura 25 es un diagrama obtenido después de la digestión de MC-GPP y de minicolágeno fibroso purificado con pepsina bajo condiciones ácidas y analizando con el uso de ImageJ las bandas de la imágenes de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS llevada a cabo bajo condiciones reductoras (con adición de 2-mercaptoetanol). \*1 es MC-GPP, \*2 es MC-GPP digerida con pepsina, \*3 es pepsina sola (misma cantidad que en \*2), \*4 es minicolágeno fibroso purificado, \*5 es minicolágeno fibroso purificado digerido con pepsina, y \*6 es pepsina sola (misma cantidad que en \*5). Las bandas del marcador y sus pesos moleculares son analizados como se muestra en el diagrama.

#### Modo de ejecutar la invención

De aquí en adelante, se mostrarán modos para llevar a cabo la presente invención, y la presente invención será explicada en más detalle.

30 La presente invención se relaciona con una proteína recombinante que tiene una estructura de hélice triple, la cual comprende una proteína codificada por un polinucleótido que comprende (i) a (v) a continuación en orden desde el terminal amino:

(i) el gen de dominio de péptido de señalización de colectina humana;

(ii) el gen de dominio rico en cisteína de colectina humana;

35 (iii) el gen de dominio de colágeno de colágeno humano;

(iv) el gen de dominio de cuello de colectina humana; y

(v) el gen de dominio de reconocimiento de carbohidrato de colectina humana.

40 En la presente invención, una "proteína que tiene una estructura de hélice triple" puede ser una proteína en la cual una hélice triple es construida en la etapa de producción por cultivo, o una proteína en la cual una estructura de hélice triple es formada a través de operaciones tales como purificación después de la producción por cultivo. Aunque es una proteína que puede tomar una estructura de hélice triple, puede ser producida en grandes cantidades en la forma de una estructura de cadena sencilla. La proteína que puede formar una estructura de hélice triple puede ser parte de las proteínas expresadas.

45 En la presente invención, el "gen de dominio de péptido de señal de colectina humana" no está particularmente limitado, pero es preferiblemente ejemplificado por el "gen de dominio de péptido de señal de proteína D surfactante humana (SP-D)" o más preferiblemente un polinucleótido que comprende la secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 4.

50 En la presente invención, el "gen de dominio rico en cisteína de colectina humana" no está particularmente limitado, pero es ejemplificado preferiblemente por el "gen del dominio rico en cisteína de proteína D surfactante humana (SP-D)" o más preferiblemente un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5.

En la presente invención, el “gen de dominio de cuello de colectina humana” no está particularmente limitado, pero es ejemplificado preferiblemente por el “gen de dominio de cuello de lectina enlazante a manano humana (MBL)” o más preferiblemente un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6.

5 En la presente invención, el “gen de dominio de reconocimiento de carbohidratos de colectina humana” no está particularmente limitado, pero es ejemplificado particularmente por el “gen de dominio de reconocimiento de carbohidratos de lectina enlazante a manano humana (MBL)” o más preferiblemente un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7.

10 En la presente invención, el “gen de dominio de colágeno de colágeno humano” no está particularmente limitado, pero el gen comprende preferiblemente al menos uno o más tipos de genes de dominio de colágeno de colágenos humanos de cadena  $\alpha$ . Adicionalmente, este gen es preferiblemente un gen de dominio de colágeno de colágeno humano tipo I compuesto de colágeno humano de cadena  $\alpha$ . Un ejemplo de un dominio de gen de colágeno de colágeno humano de cadena  $\alpha$  de la presente invención es más preferiblemente un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8. Adicionalmente, puede ser un gen de dominio de colágeno que carece de la región de la región C terminal a la región GPP del gen de dominio de colágeno. Un ejemplo de tal gen de dominio de colágeno que carece de la porción de la región terminal C a la región GPP es más preferiblemente un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15.

20 Se conocen más de 20 diferentes tipos de colágeno y aproximadamente 25 tipos de cadenas  $\alpha$  constituyentes. Los genes que los codifican han sido clonados y las secuencias de nucleótidos de los mismos han sido elucidadas (“Connective Tissue and Its Heritable Disorders”, pp 145-165, publicado por Wiley-Liss Inc. (1992)). Estos genes pueden ser introducidos en un vector usado en la presente invención que puede expresar altamente genes foráneos por técnicas de recombinación de genes conocidas para los experimentado en la técnica (por ejemplo, “Molecular Cloning” second edition, published by Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). El ADNc de colágeno humano usado en la presente invención puede ser cualquiera de estos ADNc clonados de colágeno, e incluye ADNc de péptidos de colágeno parciales.

25 El tipo de colágeno de la presente invención no está limitado específicamente, pero el colágeno tipo mamífero es preferible, y el colágeno tipo humano es más preferible.

30 Adicionalmente, la proteína que tiene una estructura de hélice triple de la presente invención también incluye una proteína que tiene una estructura de hélice triple de la presente invención cuya secuencia de aminoácidos es modificada parcialmente por sustitución, eliminación o similares. Además, hay métodos conocidos para obtener células transducidas que expresan moléculas de proteína introduciendo un vector en células de mamífero anfitrionas. Pueden aplicarse métodos similares a la presente invención.

35 Una “proteína que tiene una estructura de hélice triple” de la presente invención es ejemplificada más preferiblemente por una proteína recombinante que tiene una estructura de hélice triple, incluyendo una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una proteína codificada por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 3.

Adicionalmente, la presente invención se relaciona con un método para producir una proteína que tiene una estructura de hélice triple, que comprende las etapas de:

(a) introducir en un vector un polinucleótido que comprende (i) a (v) a continuación en orden desde el terminal amino:

40 (i) el gen de dominio de péptido de señal de colectina humana;

(ii) el gen de dominio rico en cisteína de colectina humana;

(iii) el gen de dominio de colágeno de colágeno humano;

(iv) el gen de dominio de cuello de colectina humana; y

(v) el gen de dominio de reconocimiento de carbohidratos de colectina humana;

45 (b) transformar una célula anfitriona por introducción de un gen utilizando el vector; y

(c) cultivar o hacer crecer el transformante y recolectar las proteínas que tienen una estructura de hélice triple a partir de estas células o de su sobrenadante de cultivo.

50 El siguiente método puede ser utilizado para examinar si una proteína que tiene una estructura de hélice triple es sintetizada como proteína recombinante por células introducidas con el vector antes mencionado. Específicamente, los péptidos del colágeno pueden ser identificados por métodos inmunoquímicos tales como inmunoprecipitación

- Western utilizando anticuerpos disponibles comercialmente que se enlazan específicamente a colágeno humano. El colágeno usualmente no migra de acuerdo con el peso molecular en electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (Nature, 227, 680-685 (1970)). Así, la reactividad de una muestra con un anticuerpo anticolágeno puede ser examinada después de que la muestra es sometida a electroforesis simultáneamente con colágeno como marcador y transferida a una membrana de nylon o a una membrana de nitrocelulosa de acuerdo con el método de Matsudaira et al. (J. Biol. Chem., 261, 10035-10038 (1987)). Adicionalmente, si una molécula que tiene una estructura de hélice triple está presente en los productos de colágeno recombinante generados por el vector de expresión puede examinarse como sigue.
- El colágeno fibroso típico es una molécula de tres cadenas formada a partir de tres subunidades (cadena  $\alpha$ ), y tiene una estructura de hélice triple intramolecular. Adicionalmente, el colágeno que tiene una estructura de hélice triple es conocido por ser resistente a la digestión con pepsina. Así, la presencia de moléculas de tres cadenas en una muestra de proteína puede ser confirmada digiriendo los sobrenadantes del cultivo de células introducidas con el vector de expresión de genes exógeno alto antes mencionado con pepsina en condición ácida, y examinando si la muestra tiene una estructura resistente a la pepsina.
- Específicamente, en la presente invención, las muestras de proteína tratadas con pepsina fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida SDS bajo condiciones reductoras. Como resultado, el colágeno recombinante obtenido demostró tener resistencia a la pepsina similar a la del colágeno natural, y así se esperaba que los péptidos de colágeno que tienen una propiedad resistente a la pepsina estuvieran contenidos en sobrenadantes de cultivo de células introducidas con el vector de expresión de gen exógeno alto. Los resultados antes mencionados muestran que el vector de expresión de la presente invención tiene la capacidad de sintetizar en células anfitrionas, colágeno que tiene resistencia a la pepsina, lo cual es una característica equivalente al colágeno encontrado en el cuerpo vivo.
- Los métodos para producir y purificar las proteínas de la presente invención que tienen una estructura de hélice triple se muestran más abajo, sin estar limitado a los mismos.
- Las células de mamífero utilizadas para cultivo como célula anfitriona en la presente invención no están particularmente limitadas pero preferiblemente son células CHO.
- El cultivo a gran escala de las células CHO utilizadas en la presente invención puede hacerse por cultivo en suspensión. Por ejemplo, de  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$  células CHO recombinantes introducidas con un vector de expresión de colágeno humano que contienen un gen de neomicina fosfotransferasa debilitado, gen de hidrofolato reductasa de ratón, y ADNc que codifica colágeno humano o un péptido parcial del mismo pueden cultivarse en un matraz en agitación o en un matraz con rotación utilizando de 100 ml a 1 L de medio de cultivo. Después de cultivar estas células durante un período de tiempo apropiado, las proteínas pueden ser extraídas de los sobrenadantes de cultivo recolectados en grandes cantidades.
- En los sobrenadantes de cultivo de células CHO recombinante introducidas con el vector de expresión de colágeno humano que contienen un gen de neomicina fosfotransferasa debilitado, un gen de dihidrofolato reductasa de ratón, y ADNc que codifica colágeno humano o un péptido parcial de la misma, existen no solamente moléculas de proteína de tres cadenas con una estructura de hélice triple, sino también proteínas que no se han conformado en las moléculas de tres cadenas normales. Como se mencionó más arriba, las proteínas similares al colágeno que no tengan una estructura de hélice triple son digeridas por la pepsina. Así, las proteínas similares al colágeno que carecen de una estructura de hélice triple pueden ser removidas por digestión con pepsina. Este tratamiento puede al mismo tiempo degradar y remover las proteínas en los sobrenadantes de cultivo diferentes a las moléculas de proteína de tres cadenas que tenían una estructura de hélice triple. Utilizando las características antes mencionadas, las proteínas que no son colágeno así como las proteínas que carecen de una estructura de hélice triple pueden ser digeridas y removidas por tratamiento directo con pepsina de las proteínas totales presentes en los sobrenadantes del cultivo de células CHO recombinantes introducidas con el vector de expresión del 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 es todos los colágenos humanos incluyendo los colágenos tipo I a XXI que son conocidos actualmente, y también incluyen péptidos parciales de los mismos. El tipo del colágeno de la presente invención no está limitado 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 preferiblemente tipo I, tipo II, tipo III. Los tipos I, IV, V, IX, y XI consisten de dos o tres tipos de cadenas  $\alpha$ , y los tipos II, III, VII, XII, XVII, y XVIII consisten de un tipo de cadena  $\alpha$ . Tienen cada una 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 limitada particularmente. Adicionalmente, la composición molecular del colágeno de la presente invención no está restringida a la del colágeno natural, y puede ser compuesta artificialmente de tres diferentes tipos de cadenas  $\alpha$ .

Las secuencia de nucleótidos de un ADN que codifica la cadena 1 $\alpha$  del colágeno tipo I de la presente invención está indicada en SEQ ID NO: 10, la secuencia de nucleótidos de un ADN que codifica la cadena 2 $\alpha$  del colágeno tipo I está indicada en SEQ ID NO: 11, la secuencia de nucleótidos de un ADN que codifica la cadena 1 $\alpha$  de colágeno tipo II está indicada en SEQ ID NO: 12, y la secuencia de nucleótido de un ADN que codifica la cadena 1 $\alpha$  de colágeno tipo III está indicada en SEQ ID NO: 13.

Los ADN que codifican el colágeno de la presente invención incluyen oligonucleótidos que comprenden cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NOs: 10 a 13, y preferiblemente incluyen oligonucleótidos que hibridan selectivamente a oligonucleótidos que comprenden cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NOs: 10 a 13. "Hibridizantes selectivamente" se refiere a moléculas de ácidos nucleicos que hibridan, forman cadena dobles con, o se enlazan sustancialmente a moléculas que tienen una secuencia predeterminada (esto es, un segundo polipéptido) presentes en una muestra de ADN o ARN bajo condiciones de hibridación de restricción apropiada. Las condiciones restrictivas son, por ejemplo, usualmente condiciones de 42°C, 2x SSC, y 0.1% de SDS, preferiblemente condiciones de 50°C, 2x SSC, y 0.1% de SDS, y más preferiblemente condiciones de 65°C, 0.1x SSC, y 0.1% de SDS, pero no está limitados particularmente a estas condiciones. Los factores que afectan la restricción de la hibridación pueden incluir factores plurales tales como la temperatura y la concentración de sal, y los experimentados en la técnica pueden seleccionar apropiadamente estos factores para alcanzar la restricción más apropiada.

Las proteínas que tienen una estructura de hélice triple producidas por la presente invención pueden ser moléculas de procolágeno en las cuales un polipéptido está enlazado a los términos N y C en el dominio del colágeno, o pueden estar en una forma en la cual el polipéptido es removido.

En la presente invención, "péptidos parciales de colágeno" se refieren a polipéptidos que son codificados por 20% o más (por ejemplo, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, o 90%) de los polinucleótidos de un ADNc que codifica colágeno (denominado de aquí en adelante como minicolágeno). Los péptidos también incluyen aquellos en los cuales las secuencias de aminoácidos de colágeno son modificadas parcialmente o aquellas que tienen una secuencia de aminoácidos no colágeno agregada.

En la presente invención "células de mamíferos con baja expresión de colágeno" se refiere a células que producen 50 ng/mL de colágeno o menos cuando se cultivan a  $1 \times 10^6$  células/mL; y ejemplos preferidos son células CHO. En la presente invención, "expresión alta" se refiere a la expresión de 1  $\mu$ g/mL de minicolágeno o más, preferiblemente expresión de 5  $\mu$ g/mL o más de minicolágeno por  $5.0 \times 10^5$  células/mL de células de CHO introducidas por el gen a 72 horas de cultivo.

En la presente invención, "vectores que pueden expresar altamente genes foráneos" se refiere, por ejemplo, a vectores que comprenden un gen marcador para la selección de fármacos en células de mamífero, con una actividad débil, de tal forma que la inserción ocurre selectivamente en una región activamente transcrita del cromosoma de las células de mamífero. Tales vectores incluyen preferiblemente el vector pNC1 (SEQ ID NO: 2), y más preferiblemente incluyen el vector pDC6/CF (SEQ ID NO: 9). Ejemplo de los vectores de expresión de la presente invención incluyen los vectores de expresión descritos específicamente en los Ejemplos, pero no se limitan a los mismos. En la presente invención, el método de cultivo puede ser bien cultivo por suspensión o por adhesión.

## Ejemplos

### [Ejemplo 1] Construcción de pNC1/minicolágeno tipo I

Utilizando métodos bien conocidos para los experimentados en la técnica, el pNC1/minicolágeno tipo I (figura 1) fue construido sustituyendo la secuencia de nucleótidos No. 1274 del vector pNC1 descrito en SEQ ID NO: 2 con el ADNc que codifica minicolágeno de SEQ ID NO: 3 (descrito de aquí en adelante como minicolágeno tipo I).

**[Ejemplo 2]** Introducción de pNC1/minicolágeno tipo I en células CHO, y selección de G418 utilizando un medio CD o un medio producido agregando un aditivo de base no animal a un medio CD.

10  $\mu$ g de pNC1/minicolágeno tipo I fueron transfectados en  $5.0 \times 10^5$  células CHO (células CHO DG44) en matraces de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> utilizando el método de la Lipofectina (se utilizó Lipofectamine™ LTX, Invitrogen). El método de transfección siguió las instrucciones del fabricante. A 48 horas después de la transfección se determino el número de células, y luego las células fueron diluidas en un medio CHO-CD con hidrolizado (IS Japón) que contenía Gluta MAX™-I 4 mM (Invitrogen). Las células fueron sembradas entonces en concentraciones de 1000 células/pozo y 100 células/pozo en cinco placas de microtitulación de 96 pozos cada una para un total de diez placa (960 pozos) y cuando se cultivaron en la presencia de gas dióxido de carbono 5% a 37°C durante aproximadamente tres semanas, se observaron células supervivientes (clones resistentes a G418). Se seleccionaron arbitrariamente 72 clones resistentes a G418 seleccionados de las células supervivientes, y subsecuentemente se determinaron los niveles de producción de minicolágeno en los sobrenadantes del cultivo.

**[Ejemplo 3]** Determinación de los niveles de producción de minicolágeno por clones transfectados con pNC1/minicolágeno tipo I

El nivel de producción fue examinado por ELISA. Tal como se indica en la figura 1, puesto que el minicolágeno contiene un dominio de reconocimiento de carbohidratos de MBL humano en su porción de terminal C, se utilizaron anticuerpos MBL humanos para la detección de minicolágeno. Utilizando 1 µg/mL de un anticuerpo MBL antihumano (obsequio del Dr. Otani en la Asahikawa Medical University, Japón) diluido con un regulador de recubrimiento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, NaN<sub>3</sub> al 0.05%, pH 9.6), se recubrieron placas de 96 pozos (F96 MAXI SORP Nunc-Immunoplate, Cat. no. 442404, Nunc) a 4°C durante 16 horas. Después de bloquear con Block Ace (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) al 4%, se aplicaron 100 µL de cada uno de los sobrenadantes del cultivo 14 días después de la transfección (dilución 1/10), una serie de diluciones de dos veces (20 a 0.3125 ng/mL) de MBL humano purificado (obsequio del Dr. Otani en la Asahikawa Medical University) en medio IS CHO-CD con hidrolizado (IS Japón) el cual es un medio libre de suero para células CHO, y medio IS CHO con hidrolizado (IS Japón), y la incubación se llevó a cabo a 37°C durante una hora. Adicionalmente, se aplicaron 0.1 µg/mL de un anticuerpo monoclonal MBL humano biotinilado (obsequio del Dr. Otani en la Asahikawa Medical University) a 100 µL/pozo y esto fue incubado a 37°C durante una hora. Se aplicó el kit VECTASTAION Elite ABC STANDARD (2 gotas de reactivo A, 2 gotas de reactivo B / 5 mL, Vector) el cual había sido incubado a 37°C durante 30 minutos, a 100 µL/pozo, y esto se dejó reaccionar a 37°C durante 45 minutos. Se aplicó adicionalmente PEROXIDASE SUBSTRATE KIT TMB (2 gotas de regulador, 3 gotas de TMB, 2 gotas de HYDROGEN PEROXIDE / 5 mL, Vector), el cual había sido incubado a temperatura ambiente durante 30 minutos, a 100 µL/pozo. Después de que esto se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 15 minutos, se agregó ácido fosfórico 1 M a 100 µL/pozo para detener la reacción. La concentración de minicolágeno fue calculada a partir de la curva de calibración de MBL humano purificado utilizando un lector de microplacas (modelo 680, manufacturado por BioRad) y midiendo la absorbancia a 450 nm. Las diez muestras superiores con los niveles de producción de minicolágeno más altos fueron determinadas de acuerdo con los resultados obtenidos por ELISA. Las diez muestras superiores fueron sembradas adicionalmente, transferidas a placas de 24 pozos junto con medio IS CHO-CD con hidrolizado (IS Japón) que contenía Gluta MAX<sup>TM</sup>-I 4 mM (Invitrogen), y las células fueron cultivadas hasta que ocuparon 1/3 o más de cada pozo. Se colocaron 0.4 mL de cada línea en un tubo esterilizado, y se centrifugó a 200 x g durante dos minutos. El sobrenadante fue descartado, las células fueron suspendidas en un medio fresco (medio IS CHO-CD con hidrolizado (IS Japón) que contenía Gluta MAX<sup>TM</sup>-I 4 mM (Invitrogen)), y se determinó el recuento celular. Luego el número de células fue ajustado a 5 x 10<sup>5</sup> células/mL por dilución en el medio, se transfirieron 0.2 mL de este a nuevas placas de 24 pozos, y se incubaron en la presencia de gas de dióxido de carbono al 5% a 37°C durante 72 horas. Después de la centrifugación a 9300 x g durante dos minutos, el sobrenadante fue recolectado. Subsecuentemente, se determinó el nivel de producción de minicolágeno en el sobrenadante del cultivo.

El nivel de producción fue examinado por ELISA, utilizando 1 µg/mL de un anticuerpo MBL antihumano (obsequio del Dr. Otani en la Asahikawa Medical University, Japón) diluido con un regulador de recubrimiento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, NaN<sub>3</sub> al 0.05%, pH 9.6), placas de 96 pozos (F96 MAXI SORP Nunc-Immunoplate, Cat. no. 442404, Nunc) recubiertas a 4°C durante 16 horas. Después de bloquear con Block Ace (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) al 4%, se aplicaron 100 µL de cada uno de los sobrenadantes de los cultivos de 72 horas (en dilución 1/1000), una serie de diluciones dos veces (de 20 a 0.3125 ng/mL) de MBL purificado (obsequio del Dr. Otani en la Asahikawa Medical University) en medio IS CHO-CD con hidrolizado (IS Japón) el cual es un medio libre de suero para células CHO, y medio IS CHO con hidrolizado (IS Japón), y la incubación se llevó a cabo a 37°C durante una hora. Posteriormente, se aplicó 0.1 µg/mL de un anticuerpo monoclonal MBL humano biotinilado (obsequio del Dr. Otani en la Asahikawa Medical University) a 100 µL/pozo y este fue incubado a 37°C durante una hora. Se aplicó el kit VECTASTAION Elite ABC STANDARD (2 gotas de reactivo A, 2 gotas de reactivo B / 5 mL, Vector), el cual había sido incubado a 37°C durante 30 minutos, a 100 µL/pozo, y este se dejó reaccionar a 37°C durante 45 minutos. Se aplicó posteriormente PEROXIDASE SUBSTRATE KIT TMB (2 gotas de regulador, 3 gotas de TMB, 2 gotas de HYDROGEN PEROXIDE / 5 mL, Vector) el cual había sido incubado a temperatura ambiente durante 30 minutos, a 100 µL/pozo. Después este se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 15 minutos, se agregó ácido fosfórico 1 M a 100 µL/pozo para detener la reacción. La concentración de minicolágeno fue calculada a partir de la curva de calibración de MBL humano purificado utilizando un lector de microplacas (modelo 680, manufacturado por BioRad) y midiendo la absorbancia de 450 nm. Las diez muestras superiores con los niveles de producción de minicolágeno más altos determinadas de acuerdo con los resultados obtenidos por ELISA se muestran en la Tabla 1.

[Tabla 1]

Niveles de producción de minicolágeno de clones resistentes a G418	
Nombre del clon	Nivel de producción (µg/mL)
MC 1	2.6

Niveles de producción de minicolágeno de clones resistentes a G418	
Nombre del clon	Nivel de producción (µg/mL)
MC 10	5.2
MC 11	1.8
MC 12	3.8
MC 13	4.5
MC 21	6.3
MC 24	3.5
MC 34	2.9
MC 51	0.6
MC 64	4.5

**[Ejemplo 4]** Construcción de pDC6/CF minicolágeno tipo I

Utilizando métodos bien conocidos para los experimentados en la técnica, se construyó pDC6/CF bajo minicolágeno tipo I (figura 2) sustituyendo la secuencia de nucleótidos No. 1059 del vector pDC6/CF descrito en SEQ ID NO: 9 con el ADNc que codifica minicolágeno de SEQ ID NO: 3 (descrito de aquí en adelante como minicolágeno tipo I).

**[Ejemplo 5]** Introducción de pDC6/CF minicolágeno tipo I en células CHO, y selección utilizando un medio CD o un medio producido por la adición de un aditivo con base no animal a un medio CD

Se transfectaron 10 µg de pNC1/minicolágeno tipo I en  $5.0 \times 10^5$  células CHO (células CHO DG44) en matraces de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> utilizando el método de Lipofectina (se utilizó Lipofectamine™ LTX, Invitrogen). El método de transfección siguió las instrucciones del fabricante. 48 horas después de la transfección, se determinó el número de células y luego las células fueron diluidas en un medio IS CHO-CD con hidrolizado (IS Japón) que contenía Gluta MAX™-I 4 mM (Invitrogen). Las células fueron sembradas a concentraciones de 4000 células/pozo y 1000 células/pozo en cinco placas de microtitulación de 96 pozos cada una para un total de diez placas (960 pozos), y después de ser cultivadas en la presencia de gas de dióxido de carbono al 5% a 37°C durante aproximadamente tres semanas, se observaron células supervivientes (clones supervivientes). Se seleccionaron arbitrariamente 157 clones supervivientes de las células supervivientes, y subsecuentemente se determinaron los niveles de producción de minicolágeno en los sobrenadantes del cultivo.

**[Ejemplo 6]** Determinación de los niveles de producción de minicolágeno por clones transfectados de pDC6/CF\_minicolágeno tipo I

El nivel de producción fue examinado por ELISA. Tal como se indica en la figura 2, puesto que el minicolágeno contiene el dominio de reconocimiento de carbohidratos de MBL humano en su porción terminal C, se utilizaron anticuerpos MBL humanos para la detección de minicolágeno. Utilizando 1 µg/mL de un anticuerpo MBL antihumano (obsequio del Dr. Otani en la Asahikawa Medical University, Japón) diluido con un regulador de recubrimiento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, NaN<sub>3</sub> al 0.05%, pH 9.6), se recubrieron placas de 96 pozos (F96 MAXI SORP Nunc-Immuplate, Cat. no. 442404, Nunc) a 4°C durante 16 horas. Después de bloquear con Block Ace (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) al 4%, se aplicaron 100 µL de cada uno de los sobrenadantes de cultivo 14 días después de la transfección (a dilución 1/1000), dilución en serie dos veces (de 20 a 0.3125 ng/mL) de MBL humano purificado (obsequio del Dr. Otani en la Asahikawa Medical University) en medio IS CHO-CD con hidrolizado (IS Japón) el cual es un medio libre de suero para células CHO, y medio IS CHO con hidrolizado (IS Japón), y la incubación se llevó a cabo a 37°C durante una hora. Adicionalmente, se aplicó 0.1 µg/mL de un anticuerpo monoclonal MBL biotinilado (obsequio del Dr. Otani en la Asahikawa Medical University) a 100 µL/pozo y este fue incubado a 37°C durante una hora. Se aplicó el kit VECTASTAION Elite ABC STANDARD (2 gotas de reactivo A, 2 gotas de reactivo B / 5 mL, Vector), el cual había sido incubado a 37°C durante 30 minutos, a 100 µL/pozo, y este se dejó reaccionar a 37°C durante 45 minutos. Se aplicó posteriormente el PEROXIDASE SUBSTRATE KIT TMB (2 gotas de regulador, 3 gotas de TMB, 2 gotas de HYDROGEN PEROXIDE / 5 mL, Vector), el cual había sido incubado a temperatura ambiente durante 30 minutos, a 100 µL/pozo. Después de que este se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 15 minutos, se agregó ácido fosfórico 1 M a 100 µL/pozo para detener la reacción. La

concentración de minicolágeno fue calculada a partir de la curva de calibración de MBL humano purificado utilizando un lector de microplacas (modelo 680, manufacturado por BioRad) y midiendo la absorbancia a 450 nm. Se determinaron diez muestras superiores con los niveles de producción de minicolágeno más altos de acuerdo con los resultados obtenidos por ELISA. Las diez muestras superiores fueron sembradas de nuevo, transferidas a placas de 24 pozos junto con medio IS CHO-CD con hidrolizado (IS Japón) que contenía Gluta MAX™-I 4 mM (Invitrogen), y las células fueron cultivadas hasta que ocuparon 1/3 o más de cada pozo. Se colocaron 0.4 mL de cada línea en un tubo esterilizado, y se centrifugó a 200 x g durante dos minutos. El sobrenadante fue descartado, las células fueron suspendidas en 0.1 mL de medio fresco (medio IS CHO-CD con hidrolizado (IS Japón) que contenía Gluta MAX™-I 4 mM (Invitrogen)), y se determinó el recuento celular. Luego el número de células fue ajustado a  $5.0 \times 10^5$  células/mL por dilución en el medio, 0.2 mL de este fueron transferidos a nuevas placas de 24 pozos, y se incubaron en presencia de gas de dióxido de carbono al 5% a 37°C durante 72 horas. Después de centrifugar a 9300 x g durante dos minutos, el sobrenadante fue recolectado. Subsecuentemente, se determinó el nivel de producción de minicolágeno en el sobrenadante del cultivo.

El nivel de producción fue examinado por ELISA. Utilizando 1 µg/mL de un anticuerpo MBL antihumano (obsequio del Dr. Otani en la Asahikawa Medical University, Japón) diluido con un regulador de recubrimiento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, NaN<sub>3</sub> al 0.05%, pH 9.6), se recubrieron placas de 96 pozos (F96 MAXI SORP Nunc-Immuplate, Cat. no. 442404, Nunc) a 4°C durante 16 horas. Después de bloquear con Block Ace (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) al 4%, se aplicaron 100 µL de cada uno de los sobrenadantes de los cultivos a 72 horas (a dilución 1/1000), de series en dilución a dos veces (de 20 a 0.3125 ng/mL) de MBL humano purificado (obsequio del Dr. Otani en la Asahikawa Medical University) en medio IS CHO-CD con hidrolizado (IS Japón) el cual es un medio libre de suero para células CHO, y medio IS CHO con hidrolizado (IS Japón), y la incubación se llevó a cabo a 37°C durante una hora. Adicionalmente, se aplicaron 0.1 µg/mL de un anticuerpo monoclonal MBL humano biotinilado (obsequio del Dr. Otani en la Asahikawa Medical University) a 100 µL/pozo y esto fue incubado a 37°C durante una hora. El kit VECTASTAION Elite ABC STANDARD (2 gotas de reactivo A, 2 gotas de reactivo B / 5 mL, Vector), el cual había sido incubado a 37°C durante 30 minutos, fue aplicado a 100 µL/pozo, y se dejó reaccionar a 37°C durante 45 minutos. Se aplicaron posteriormente PEROXIDASE SUBSTRATE KIT TMB (2 gotas de regulador, 3 gotas de TMB, 2 gotas de HYDROGEN PEROXIDE / 5 mL, Vector), el cual había sido incubado a temperatura ambiente durante 30 minutos, a 100 µL/pozo. Después se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 15 minutos, se agregó ácido fosfórico 1 M a 100 µL/pozo para detener la reacción. La concentración de minicolágeno fue calculada a partir de la curva de calibración de MBL humano purificado utilizando un lector de microplacas (modelo 680, manufacturado por BioRad) y se midió la absorbancia a 450 nm. Las diez muestras superiores con los niveles de producción más altos de minicolágeno determinados de acuerdo con los resultados obtenidos por ELISA se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Niveles de producción de minicolágeno de clones cultivados en medio libre de HT	
Nombre del clon	Nivel de producción (µg/mL)
MC6-22	8.6
MC6-33	8.5
MC6-35	7.1
MC6-55	9.7
MC6-57	9.9
MC6-97	8.6
MC6-116	9.9
MC6-126	8.4
MC6-137	5.6
MC6-145	9.5

35

**[Ejemplo 7]** Purificación de minicolágeno

Células CHO que expresan minicolágeno (pNC1/minicolágeno tipo I-21) fueron ajustadas a  $2.0 \times 10^5$  células/mL con medio IS CHO-CD con hidrolizado (IS JAPÓN) suplementado para tener concentraciones finales de Gluta MAX™-I 4 mM (GIBCO), cultivo celular probado de sulfato G418 (CALBIOCHEM) 0.4 mg, y 1 x HT solución de suplemento (GIBCO), y cultivado por cultivo estacionario y matraces T-75 (FALCON) a 37°C en la presencia de dióxido de carbono al 5% durante 14 días (celda 150 HERA, Heraeus). Las siguientes etapas fueron llevadas a cabo a 4°C a menos que se especifique otra cosa. Las soluciones de cultivo fueron recolectadas y centrifugadas a 1,750 x g durante una hora (EX-126, TOMY) para separar las células y el sobrenadante. A este sobrenadante (1.4 L), se agregó cloruro de sodio (Wako) para obtener 0.4 M y el pH fue ajustado (F-51, HORIBA) a 7.4 a 4°C utilizando hidróxido de sodio (Wako), y este fue concentrado a 1/20 veces su volumen utilizando filtración de flujo cruzado (VIVAFLOW50; 10,000 MWCO PES; VIVASIENCE). Los precipitados formados en este proceso fueron recolectados por centrifugación (EX-126, TOMY) a 1,750 x g durante una hora. El sobrenadante fue dializado durante tres días (membranas de diálisis Spectra/Pro™ Biotech; 10,000 MWCO; Spectrum Laboratories, Inc.) contra TBS (TBS en polvo, Takara) que contiene EDTA 5 mM (Dojindo), y cloruro de calcio (Wako) y se agregó el cloruro de sodio (Wako) para obtener 2 mM y 2 M, respectivamente, para generar la precipitación. Esto fue centrifugado a 1,750 x g durante una hora (EX-126, TOMY) para separar los precipitados y el sobrenadante. Estos precipitados fueron combinados con los precipitados recolectados previamente, dializados (membranas para diálisis de éster de celulosa (CE) Spectra/Pro™ Biotech; 25,000 MWCO; Spectrum Laboratories, Inc.) contra agua MilliQ (MILLIPORE) durante cinco días, y liofilizados (Concentrador 5301, Eppendorf) para obtener las proteínas purificadas. 1.47 mg de las proteínas purificadas fueron disueltas en 1.47 mL de solución de ácido acético 50 mM (Wako), y fue utilizado en los siguientes ensayos. Adicionalmente, el minicolágeno remanente en el sobrenadante fue purificado utilizando una columna de manano agarosa utilizando el enlazamiento con manano. Primero, se llenó una Econo-Column (BIO-RAD) con 4.5 mL de gel de manano agarosa (SIGMA), el gel fue lavado y equilibrado con 45 mL de TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía EDTA 5 mM (Dojindo) y TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía cloruro de calcio 5 mM (Wako), y el sobrenadante fue cargado por circulación a una tasa de flujo de 1.0 mL/minuto durante 17.5 horas. La remoción del sobrenadante fue seguida por lavado con 10 mL de TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía cloruro de calcio 5 mM (Wako) y eluyendo el minicolágeno con 20 mL de TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía EDTA 5 mM (Dojindo). El eluido fue dializado (membranas de diálisis Spectra/Pro™ Biotech; 10,000 MWCO; Spectrum Laboratories, Inc.) contra cloruro de sodio 0.4 M – regulador de tri-clorhidrato 0.1 M (pH 7.4 a 4°C) durante cinco días. Después de esto, el volumen fue concentrado a 1/10 por ultrafiltración a 1,750 x g durante 30 minutos utilizando Amicon Ultra-15 (10,000 MWCO; MILLIPORE). Finalmente, se recolectaron 7.7 mg de minicolágeno fibroso como precipitado a partir de 1.4 L del sobrenadante del cultivo, y subsecuentemente, se recolectaron 2.5 mg de minicolágeno soluble en agua que tenía la actividad de enlazamiento al manano a partir del sobrenadante remanente (Véase figura 3).

#### [Ejemplo 8] Análisis de minicolágeno

Las proteínas purificadas a partir del sobrenadante del cultivo y el minicolágeno soluble en agua fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS bajo condiciones reductoras.

Más específicamente, 10 µL del regulador de muestra Laemmli (BIO-RAD) que contenía 2-mercaptoetanol al 5% (Wako) fueron agregados a 10 µL de cada una de las proteínas purificadas y el minicolágeno soluble en agua (diluido cada uno diez veces con TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía cloruro de calcio 20 mM (Wako)) para reducción por calentamiento a 98°C durante cinco minutos (TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL, TaKaRa BIOMEDICALS). Se colocó un regulador de electroforesis (tris/glicina/SDS, BIO-RAD) y Super Sep™ al 5% a 20% de 17 pozos (Wako) en un recipiente de electroforesis (DPE-1020, DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD), se aplicaron 10 µL de soluciones de muestras tratadas con calor a Super Sep™ al 5% a 20% de 17 pozos (Wako), y se llevó a cabo la electroforesis a 40 mA (My Run, COSMO BIO CO., LTD) durante 50 minutos. Después de esto, el gel fue lavado con 25 mL de DW (MILLIPORE) con agitación durante cinco minutos, y esto se repitió por tres veces. El gel fue sometido a tinción con 25 mL de Quick-CBB PLUS (Wako) durante una hora, y luego se destiñó en 25 mL de DW (MILLIPORE) durante una hora (véase figura 4).

#### [Ejemplo 9] Análisis de minicolágeno

Las proteínas purificadas a partir del sobrenadante del cultivo y el minicolágeno soluble en agua fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS bajo condiciones no reductoras.

Más específicamente, 10 µL del regulador de muestra Laemmli (BIO-RAD) que no contiene 2-mercaptoetanol fue agregado a cada uno de proteínas purificadas y minicolágeno soluble en agua (diluido cada uno diez veces con TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía cloruro de calcio 20 mM (Wako)) y esto fue tratado por calentamiento a 98°C durante cinco minutos (TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL, TaKaRa BIOMEDICALS). Se colocó un regulador de electroforesis (tris/glicina/SDS, BIO-RAD) y Super Sep™ de 3% a 10% 17 pozos (Wako) en un recipiente de electroforesis (DPE-1020, DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD), y se aplicaron 10 µL de las soluciones de muestras tratadas con calor a Super Sep™ 3% a 17%, 17 pozos (Wako), y la electroforesis fue llevada a cabo a 40 mA (My Run, COSMO BIO CO., LTD) durante 50 minutos. Luego, el gel fue lavado con 25 mL de DW (MILLIPORE) con agitación (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries) durante cinco minutos, y esto fue repetido tres veces. El

gel fue sometido a tinción en 25 mL de Quick-CBB PLUS (Wako) durante una hora, y luego desteñido en 25 mL de DW (MILLIPORE) durante una hora (véase figura 5).

#### [Ejemplo 10] Análisis de minicolágeno

5 Las proteínas purificadas a partir del sobrenadante del cultivo y el minicolágeno soluble en agua fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida nativa.

Más específicamente, 10 µL del regulador de muestra nativo (BIO-RAD) que no contenía 2-mercaptoetanol ni SDS fueron agregados a 10 µL de cada uno de proteínas purificadas y minicolágeno soluble en agua (diluido cada uno diez veces con TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía cloruro de calcio 20 mM (Wako)). Se colocaron un regulador de electroforesis (tris/glicina/SDS, BIO-RAD) y Super Sep™ de 3% a 10% 17 pozos (Wako) en un recipiente de electroforesis (DPE-1020, DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD), se aplicaron 10 µL de las soluciones de muestras preparadas a Super Sep™ de 3% a 10% 17 pozos (Wako), y se llevó a cabo la electroforesis a 40 mA (My Run, COSMO BIO CO., LTD) durante 50 minutos. Luego el gel fue lavado con 25 mL de DW (MILLIPORE) con agitación durante (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries) durante cinco minutos, y esto fue repetido durante tres veces. El gel fue sometido a tinción en 25 mL de Quick-CBB PLUS (Wako) durante una hora, y luego desteñido en 25 mL de DW (MILLIPORE) durante una hora (véase figura 6).

#### [Ejemplo 11] Inmunoprecipitación Western bajo condiciones reductoras

Puesto que el minicolágeno codifica el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) del MBL, el dominio CRD está incluido en el minicolágeno expresado. Por lo tanto, los anticuerpo anti-MBL (con reconocimiento del dominio CRD) pueden enlazarse al mismo. Esto fue utilizado para llevar a cabo inmunoprecipitación Western bajo condiciones reductoras utilizando un anticuerpo policlonal anti-MBL (dominio CRD) de conejo (obsequio del Dr. Otani en la Asahikawa Medical University), y las proteínas purificadas y el minicolágeno soluble en agua fueron identificados por detección por quimioluminiscencia.

Más específicamente, 10 µL del regulador de muestras Laemmli (BIO-RAD) que contenía 5% de 2-mercaptoetanol (Wako) fue mezclado en 10 µL de cada una de proteínas purificadas y minicolágeno soluble en agua (diluido cada uno 500 veces con TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía cloruro de calcio 20 mM (Wako)) para reducción por calentamiento a 98°C durante cinco minutos (TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL, TaKaRa BIOMEDICALS). Se colocaron un regulador de electroforesis (tris/glicina/SDS, BIO-RAD) y Super Sep™ de 5% a 20% 17 pozos (Wako) en un recipiente de electroforesis (DPE-1020, DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD), y se aplicaron 10 µL de las soluciones de muestras tratadas con calor a Super Sep™ de 5% a 20% 17 pozos (Wako), y se llevó a cabo la electroforesis a 40 mA (My Run, COSMO BIO CO., LTD) durante 50 minutos. Luego, el gel fue retirado de las placas de vidrio y sumergido durante cinco minutos con agitación (ROTOSHAKE GENIE, Scientific Industries) en un regulador de transferencia (tris/glicina/SDS, BIO-RAD) que contenía metanol al 30% (Wako)). Se sumergió la membrana Immobilon-P Transfer (MILLIPORE) con agitación (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries) en 8 mL de metanol (Wako) durante 15 segundos, 8 mL de agua MilliQ (MILLIPORE) durante dos minutos, y 8 mL del regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía metanol al 30% (Wako)) durante cinco minutos. En un aparato de transferencia (TRANS-BLO, SD SEMIDRY TRANSFER CELL, BIO-RAD), se colocaron papeles de filtro sumergidos en regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía metanol al 30% (Wako)) (Extra Thick Blot Paper Criterion™ Size, BIO-RAD), la membrana de transferencia Immobilon-P (MILLIPORE), el gel y los papeles de filtro (Extra Thick Blot Paper Criterion™ Size, BIO-RAD) en orden desde el lado menos, se colocó una placa de recubrimiento, y se llevó a cabo la electroforesis a 80 mA (PowerPac HC™, BIO-RAD) durante dos horas para transferir las proteínas separadas a la membrana de transferencia Immobilon-P (MILLIPORE). Después de la transferencia, la membrana de transferencia Immobilon-P (MILLIPORE) fue sumergida en 8 mL de ImmunoBlock (marca comercial registrada, división de productos de Laboratorio de Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) y se bloqueó a 4°C durante 18 horas, luego se lavó tres veces por agitación durante cinco minutos en 8 mL de TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía Tween 20 al 0.05% (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako). Se hicieron reaccionar 8 mL de anticuerpo policlonal anti-MBL (dominio CRD) de conejo (obsequio del Dr. Otani en la Asahikawa Medical University) diluido 2,000 veces con TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía Tween 20 al 0.05% (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako) y las proteínas sobre la membrana se hicieron reaccionar durante una hora a temperatura ambiente con agitación (ROTOSHAKE GENIE, Scientific Industries). Después de que se removieron los anticuerpos no enlazados, la membrana fue lavada tres veces agitando durante cinco minutos en 8 mL de TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía Tween 20 al 0.05% (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako). Se agregaron 8 mL de IgG (H+L) fragmento F(ab')<sub>2</sub> anticonejo de asno AffiniPure conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch) diluido 20,000 veces en TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía Tween 20 al 0.05% (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako), y la reacción se dejó proceder a temperatura ambiente durante una hora con agitación (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries). Después de que los anticuerpos no enlazados fueron removidos, la membrana fue lavada tres veces por agitación durante tres minutos en 24 mL de TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía Tween 20 al 0.05% (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako). Se agregó 1 mL de sustrato HRP Immobilon™ Western Chemiluminescent (MILLIPORE) para quimioluminiscencia, y se tomó una fotografía de un minuto utilizando un sistema de cámara CCD enfriada Light-Capture ATTO (ATTO) en sus condiciones normales (véase figura 7).

**[Ejemplo 12]** Inmunoprecipitación Western bajo condiciones no reductoras

Puesto que el minicolágeno codifica el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) de MBL, el dominio CRD está incluido en el minicolágeno expresado. Por lo tanto, los anticuerpo anti-MBL (reconocimiento de dominio CRD) pueden enlazarse al mismo. Esto fue utilizado para llevar a cabo inmunoprecipitación Western bajo condiciones no reductoras utilizando un anticuerpo policlonal anti-MBL (dominio CRD) de conejo (obsequio del Dr. Otani en la Asahikawa Medical University), y las proteínas purificadas y el minicolágeno soluble en agua fueron identificados por detección con quimioluminiscencia.

Más específicamente, 10 mL de regulador de muestras Laemmli (BIO-RAD) que no contenía 5% of 2-mercaptoetanol fue mezclado en 1  $\mu$ L cada una de las proteínas purificadas y minicolágeno soluble en agua (cada uno diluido 500 veces con TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía cloruro de calcio 20 mM (Wako)) y tratado por calentamiento a 98°C durante cinco minutos (TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL, TaKaRa BIOMEDICALS). Un regulador de electroforesis (Tris/Glicina/SDS, BIO-RAD) y Super Sep™ 3% a 10% 17 pozos (Wako) fueron colocados en un recipiente de electroforesis (DPE-1020, DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD), y se aplicaron 10  $\mu$ L de soluciones de muestra tratadas con aclor a Super Sep™ 3% a 10% 17 pozos (Wako), y se llevó a cabo la electroforesis a 40 mA (My Run, COSMO BIO CO., LTD) durante 50 minutos. Después de esto, el gel fue retirado de las placas de vidrio, y sumergido durante cinco minutos con agitación (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries) en un regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)). Membrana de Transferencia Immobilon-P (MILLIPORE) fue sumergido con agitación (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries) en 8 mL de metanol (Wako) durante 15 segundos, 8 mL de agua MilliQ (MILLIPORE) durante dos minutos, y 8 mL de regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)) durante cinco minutos. En un aparato de transferencia (TRANS-BLO SD SEMIDRY TRANSFER CELL, BIO-RAD), regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía papeles de filtro sumergidos en 30% de metanol (Wako)) (Extra Thick Blot Paper Criterion™ Size, BIO-RAD), Membrana de Transferencia Immobilon-P (MILLIPORE), gel, y papeles de filtro (Extra Thick Blot Paper Criterion™ Size, BIO-RAD) fueron dispuestos en orden desde el lado menos, se colocó una cubierta, y se llevó a cabo la electroforesis a 80 mA (PowerPac HC™, BIO-RAD) durante dos horas para transferir las proteínas separadas sobre la Membrana de Transferencia Immobilon-P (MILLIPORE). Después de la transferencia, la Membrana de Transferencia Immobilon-P (MILLIPORE) fue sumergida en 8 mL de ImmunoBlock (marca registrada, división de Productos de Laboratorio de Daiinippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) y bloqueada a 4°C durante 18 horas, luego se lavó tres veces por agitación durante cinco minutos en 8 mL de TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía 0.05% Tween 20 (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako). 8 mL de un anticuerpo policlonal anti-MBL (dominio CDR) de conejo (obsequio del Dr. Otani at Asahikawa Medical University) diluido 2,000 veces con TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía 0.05% Tween 20 (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako) y las proteínas sobre la membrana se hicieron reaccionar durante una hora a temperatura ambiente con agitación (ROTOSHAKE GENIE, Scientific Industries). Después de que los anticuerpos no enlazados, la membrana fue lavada tres veces por agitación durante cinco minutos en 8 mL de TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía 0.05% Tween 20 (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako). Se agregaron 8 mL de un fragmento F(ab')<sub>2</sub> anticonejo de asno IgG(H+L) AffiniPure conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch) diluido 20,000 veces en TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía 0.05% Tween 20 (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako), y se dejó transcurrir la reacción durante una hora a temperatura ambiente con agitación (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries). Después de que los anticuerpos no enlazados fueron removidos, la membrana fue lavada tres veces por agitación durante diez minutos en 24 mL de TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía 0.05% Tween 20 (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako). 1 mL de Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (MILLIPORE) fue agregado para quimioluminiscencia, y se tomó una fotografía de un minuto usando el Light-Capture ATTO Cooled CCD Camera System (ATTO) en sus parámetros normales (véase la Fig. 8).

**[Ejemplo 13]** Digestión de pepsina de las proteínas purificadas a partir del sobrenadante del cultivo y atelocolágeno tipo I humano de origen natural

Las proteínas purificadas y el atelocolágeno tipo I humano de origen natural (colágeno, tipo I, soluble en ácido, de piel humana, SIGMA-ALDRICH) fueron digeridas con pepsina bajo condiciones de acidez, y se verificó la resistencia contra la escisión con pepsina a partir de imágenes de electroforesis en poliacrilamida SDS.

Más específicamente, 3  $\mu$ L de solución de ácido clorhídrico 0.3 M fueron agregados a 10  $\mu$ L de cada uno de las proteínas purificadas (0.5 mg/mL) o del atelocolágeno tipo I humano de origen natural (colágeno, tipo I, soluble en ácido, de piel humana, SIGMA-ALDRICH) (1 mg/mL) para ajustar el pH a 2, se agregaron respectivamente 5  $\mu$ L de pepsina 2 mg/mL (pepsina, de mucosa estomacal de porcino, 3370 unidades/mg de proteína; SIGMA-ALDRICH), y se llevó a cabo la digestión con pepsina a 20°C (TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL; TaKaRa BIOMEDICALS) durante dos horas. Aquí, las muestras que no tienen pepsina agregada a las proteínas purificadas y similares, y las muestras que tienen solo pepsina (pepsina, de mucosa estomacal porcina, 3370 unidades/mg de proteína; SIGMA-ALDRICH) pero sin adición de las proteínas purificadas y similares fueron preparadas como controles, se agregaron 5  $\mu$ L de una solución de ácido acético 10 mM en lugar de la solución de pepsina y 10  $\mu$ L de una solución de ácido acético 10 mM y fueron agregados en vez de las proteínas purificadas y similares, y la incubación se llevó a cabo a 20°C durante dos horas. Se agregó 1  $\mu$ L de solución de tris (2-Amino-2-hidroximetil-1,3-

propanodiol (tris aminometano) 1 M; Wako) a las muestras de proteínas purificadas y las muestras de pepsina solas (pepsina, de mucosa estomacal porcina, 3370 unidades/mg de proteína; SIGMA-ALDRICH), y 5  $\mu$ L de esta solución fueron agregados a atelocolágeno humano de origen natural (colágeno, tipo I, soluble en ácido, de piel humana, SIGMA-ALDRICH) para detener la reacción, y luego el colágeno fue refibrilizado irreversiblemente por incubación a 4°C durante 18 horas. Se agregó regulador de muestra Laemmli (BIO-RAD) que contenía 5% de 2-mercaptoetanol (Wako) en una cantidad de 19  $\mu$ L a las muestras de proteína purificada y a las muestras de pepsina sola, y 23  $\mu$ L a atelocolágeno tipo I humano de origen natural (colágeno, tipo I, soluble en ácido, de piel humana, SIGMA-ALDRICH) para reducción por calentamiento (TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL; TaKaRa BIOMEDICALS) a 98°C durante cinco minutos. Se colocó un regulador de electroforesis (tris/glicina/SDS, BIO-RAD) y Super Sep™ de 5% a 20% 17 pozos (Wako) en un recipiente de electroforesis (DPE-1020, DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD), se aplicaron 10  $\mu$ L de las soluciones de muestra tratadas con calor a Super Sep™ de 5% a 20% 17 pozos (Wako), y se llevó a cabo la electroforesis a 40 mA (My Run, COSMO BIO CO., LTD) durante 50 minutos. Luego, el gel fue lavado en 25 mL de DW (MILLIPORE) con agitación durante cinco minutos (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries), y esto fue repetido tres veces. El gel fue sometido a tinción durante una hora en 25 mL de Quick-CBB PLUS (Wako), y luego se destiñó en 25 mL de DW (MILLIPORE) durante una hora (véase figura 9). Como resultado, el atelocolágeno tipo I humano de origen natural (colágeno, tipo I, soluble en ácido, de piel humana, SIGMA-ALDRICH) no fue escindido por la digestión con pepsina. Se observó una banda a 50 kDa para el minicolágeno, y puesto que los dominios diferentes a colágeno fueron escindidos y eliminados por la digestión con pepsina, se observó una banda a 30 kDa para el dominio del colágeno solo. Esto mostró que de manera similar al atelocolágeno tipo I humano de origen natural (colágeno, tipo I, soluble en ácido, de piel humana SIGMA-ALDRICH), el minicolágeno es resistente a la escisión por pepsina (pepsina, de mucosa estomacal porcina, 3370 unidades/mg de proteína; SIGMA-ALDRICH) y es plegado correctamente en una estructura de hélice triple.

**[Ejemplo 14]** Ensayo de estabilidad térmica de las proteínas purificadas a partir del sobrenadante del cultivo

El colágeno estable correctamente plegado en una estructura de hélice triple es resistente contra la escisión por proteasas tales como tripsina y quimotripsina. En este ejemplo, la estabilidad térmica de las proteínas purificadas fue probada utilizando tratamiento enzimático con concentraciones altas de tripsina (tripsina, tipo IX-S, de páncreas porcino, 13100 unidades/mg de proteína sólida; SIGMA-ALDRICH) y quimotripsina ( $\alpha$ -quimotripsina, tipo I-S: de páncreas bovino, 58 unidades/mg de proteína; SIGMA) bajo condiciones en las cuales solamente el colágeno es resistente a la escisión.

Más específicamente, se agregó 1  $\mu$ L de tris (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol (tris aminometano); Wako) 1 M a 10  $\mu$ L de las proteínas purificadas (0.5 mg/mL) para ajustar el pH a 7. Las muestras fueron tratadas entonces (TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL; TaKaRa BIOMEDICALS) durante diez minutos a cada una de las temperaturas de 30°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, y 50°C, luego enfriadas inmediatamente a 20°C (TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL; TaKaRa BIOMEDICALS), se agregaron 1  $\mu$ L de cada uno de 1 mg/mL de tripsina (tripsina, tipo IX-S, de páncreas porcino, 13100 unidades/mg de proteína sólida; SIGMA-ALDRICH) y quimotripsina ( $\alpha$ -quimotripsina, tipo I-S: de páncreas bovino, 58 unidades/mg de proteína; SIGMA) y el tratamiento enzimático fue llevado a cabo a 20°C (TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL; TaKaRa BIOMEDICALS) durante dos minutos. Aquí, se prepararon solo las muestras que no tienen adición de enzima y muestras que tienen tripsina (tripsina, tipo IX-S, de páncreas porcino, 13100 unidades/mg de proteína sólida; SIGMA-ALDRICH) o quimotripsina ( $\alpha$ -quimotripsina, tipo I-S: de páncreas bovino, 58 unidades/mg de proteína; SIGMA), se agregaron 2  $\mu$ L de cloruro de sodio 0.4 M – regulador de tris clorhidrato 0.1 M (pH 7.4 a 4°C) en vez de la enzima y se agregaron 12  $\mu$ L de cloruro de sodio 0.4 M – regulador tris clorhidrato 0.1 M (pH 7.4 a 4°C) en vez de las proteínas purificadas y similares, y la incubación se llevó a cabo a 20°C (TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL; TaKaRa BIOMEDICALS) durante dos minutos. A cada solución de muestra, se agregaron 13  $\mu$ L de regulador de muestra Laemmli (BIO-RAD) que contiene 5% de 2-mercaptoetanol (Wako) para reducción por calentamiento (TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL; TaKaRa BIOMEDICALS) a 98°C durante cinco minutos. Se colocó un regulador de electroforesis (tris/glicina/SDS, BIO-RAD) y Super Sep™ al 10% a 20% 17 pozos (Wako) en un recipiente de electroforesis (DPE-1020, DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD), y se aplicaron 6.5  $\mu$ L de las soluciones de muestras tratadas con calor a Super Sep™ de 10% a 20% 17 pozos (Wako), y se llevó a cabo la electroforesis a 40 mA (My Run, COSMO BIO CO., LTD) durante 60 minutos. Luego, el gel fue lavado en 25 mL de DW (MILLIPORE) con agitación (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries) durante cinco minutos, y esto fue repetido tres veces. El gel fue sometido a tinción durante una hora a 25 mL de Quick-CBB PLUS (Wako), y luego se destiñó en 25 mL de DW (MILLIPORE) durante una hora (véase figura 10).

La figura 11 muestra el resultado de representar gráficamente una curva de fusión de la cuantificación de las bandas de dominio de colágeno en las temperaturas de calentamiento respectivas, con base en los resultados del ensayo de estabilidad térmica llevado a cabo en este ejemplo para las proteínas purificadas a partir del sobrenadante del cultivo utilizando tripsina y quimotripsina, y definiendo el valor obtenido en la cuantificación de la banda del dominio del colágeno a la temperatura de tratamiento con calor de 30°C como 100%. Como resultado, la temperatura de desnaturalización por calor (temperatura de tratamiento con calor a la cual el 50% es digerido por la enzima) del dominio de colágeno de la proteína purificada fue de 42.9°C (figura 11). Puesto que la temperatura de desnaturalización por calor del atelocolágeno tipo I humano de origen natural es 41.9°C (J. Biochem, 115, 853-857

(1994)), la proteína purificada tiene una termotolerancia que es equivalente o superior a la del atelocolágeno tipo I humano de origen natural, y se considera como que forma una estructura de hélice triple estable.

**[Ejemplo 15]** Purificación de minicolágeno utilizando precipitación

5 Se ajustaron células CHO que expresan minicolágeno (pNC7/MC-21) a  $2.0 \times 10^5$  células/mL con medio IS CHO-CDw/ con hidrolizado (IS JAPÓN) suplementado para tener concentraciones finales de Gluta MAX™-I 4 mM (GIBCO), cultivo de células probado de sulfato G418 0.4 mg/mL (CALBIOCHEM), y solución de suplemento 1 x HT (GIBCO), y cultivados por cultivo estacionario en un matraz T-75 (FALCON) a 37°C en la presencia de dióxido de carbono al 5% durante 14 días (celda 150 HERA, Heraeus). Se llevaron a cabo las siguientes etapas a 4°C a menos que se especifique otra cosa. La solución del cultivo fue recolectada y centrifugada a 1,750 x g durante diez minutos (EX-126, TOMY) para separar las células y el sobrenadante. A este sobrenadante (1.35 L), se agregó cloruro de sodio (Wako) para obtener 0.4 M y el pH fue ajustado (F-51, HORIBA) a 7.4 a 4°C utilizando hidróxido de sodio (Wako), y fue almacenada a 4°C. Este sobrenadante fue centrifugado a 10,000 x g durante 30 minutos (EX-126, TOMY) para remover los precipitados, y se recolectó el sobrenadante (1.35 L). Adicionalmente, se ajustaron células CHO que expresan minicolágeno (pNC7/MC-21) a  $2.0 \times 10^5$  células/mL con medio IS CHO-CD con hidrolizado (IS JAPÓN) suplementado para tener concentraciones finales de 4 mM Gluta MAX™-I (GIBCO), 0.4 mg/mL Cultivo Celular de Sulfato G418 Probado (CALBIOCHEM), y 1 x Solución de Suplemento HT (GIBCO), y cultivadas por cultivo estacionario en un matraz T-75 (FALCON) a 37°C en la presencia de dióxido de carbono al 5% durante 14 días (Celda 150 HERA, Heraeus). La solución de cultivo fue recolectada y centrifugada a 1,750 x g durante diez minutos (EX-126, TOMY) para separar las células y el sobrenadante (1.87 L). Este sobrenadante (1.87 L) y el sobrenadante antes mencionado (1.35 L) fueron combinados (3.22 L) y concentrados hasta un volumen de 320 mL usando filtración en flujo cruzado (VIVAFLOW200; 30,000 MWCO PES; VIVASIENCE), y se agregó cloruro de sodio (Wako) para obtener una concentración final de 4 M. El pH fue ajustado (F-51, HORIBA a 7.4 a 4°C usando hidróxido de sodio (Wako), y se incubó a 25°C durante cuatro días. Los precipitados formados en este proceso fueron recolectados por centrifugación a 9,400 x g durante 30 minutos (EX-126, TOMY). A los precipitados, se agregaron 1.5 mL de solución de ácido acético 50 mM (Wakoy la cantidad total fue dializada (Spectra/Pro™ Biotech , Membranas de Éster de Celulosa (CE); 10,000 MWCO; Spectrum Laboratories, Inc.) contra solución de ácido acético 50 mM (Wako) durante cinco días. Luego, la muestra dializada fue recolectada y sometida a centrifugación a 9,400 x g durante 30 minutos (EX-126, TOMY) para recolectar los precipitados. A los precipitados, se agregaron 7.4 mL de solución de ácido acético 50 mM, y la cantidad total fue dializada (Spectra/Pro™ Biotech , Membranas de Éster de Celulosa (CE); 10,000 MWCO; Spectrum Laboratories, Inc.) contra solución de ácido acético 50 mM durante cinco días para recolectar 3.3 mg del minicolágeno (de aquí en adelante, MC-sal) (véase Fig. 12).

**[Ejemplo 16]** Purificación de minicolágeno utilizando el enlazamiento con manano

35 Células CHO que expresan minicolágeno (pNC7/MC-21) fueron ajustadas a  $2.0 \times 10^5$  células/mL con medio IS CHO-CD con hidrolizado (IS Japón) suplementado para tener concentraciones finales de Gluta MAX™-I 4 nM (GIBCO), 0.4 mg/mL Cultivo Celular de Sulfato G418 Probado (CALBIOCHEM), y 1 x Solución de Suplemento HT (GIBCO), y cultivadas por cultivo estacionario en matraces T-75 (FALCON) a 37°C en la presencia de dióxido de carbono al 5% durante 14 días (Celda 150 HERA, Heraeus). Las siguientes etapas fueron llevadas a cabo a 4°C a menos que se especifique otra cosa. La solución de cultivo fue recolectada y centrifugada a 1,750 x g durante diez minutos (EX-126, TOMY) para separar las células y el sobrenadante. A este sobrenadante (1.35 L), se agregó cloruro de sodio para obtener 0.4 M y el pH fue ajustado (F-51, HORIBAA 7.4 a 4°C usando hidróxido de sodio (Wako), y fue almacenado a 4°C. Este sobrenadante fue centrifugado a 10,000 x g durante 30 minutos (EX-126, TOMY) para remover los precipitados, y el sobrenadante (1.35 L) fue recolectado. Posteriormente, células CHO que expresan minicolágeno (pNC7/MC-21) fueron ajustadas a  $2.0 \times 10^5$  células/mL con medio IS CHO-CD con hidrolizado (IS Japón) suplementado para tener concentraciones finales de 4 mM Gluta MAX™-I (GIBCO), 0.4 mg/mL Cultivo Celular de Sulfato G418 Probado (CALBIOCHEM), y 1 x Solución de Suplemento HT (GIBCO), y cultivadas por cultivo estacionario en un matraz T-75 (FALCON) a 37°C en la presencia de dióxido de carbono al 5% durante 14 días (Celda 150 HERA, Heraeus). La solución de cultivo fue recolectada y centrifugada a 1,750 x g durante diez minutos (EX-126, TOMY) para separar las células y el sobrenadante (1.87 L). Este sobrenadante (1.87 L) y el sobrenadante antes mencionado (1.35 L) fueron combinados (3.22 L) y concentrados hasta un volumen de 320 mL usando filtración en flujo cruzado (VIVAFLOW200; 30,000 MWCO PES; VIVASIENCE), y se agregó cloruro de sodio (Wako) para obtener una concentración final de 4 M. El pH fue ajustado (F-51, HORIBAA 7.4 a 4°C usando hidróxido de sodio (Wako), y se incubó a 25°C durante cuatro días. Los precipitados formados en este proceso fueron removidos por centrifugación a 9,400 x g durante 30 minutos (EX-126, TOMY). A este sobrenadante (320 mL), se agregó solución de cloruro de calcio 1M para obtener 20 mM, y se incubó a 4°C durante 18 horas y se centrifugó a 9,400 x g durante 30 minutos (EX-126, TOMY) para separar los precipitados y el sobrenadante. Este sobrenadante (320 mL) fue concentrado hasta un volumen de 56 mL usando filtración en flujo cruzado (VIVAFLOW200; 30,000 MWCO PES; VIVASIENCE), y luego dializado (Spectra/Pro™ Biotech, Membranas de Diálisis; 10,000 MWCO; Spectrum Laboratories, Inc.) contra TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía 5 mM EDTA (Dojindo) durante siete días. A la solución de muestra dializada, se agregó solución de cloruro de calcio 1M para obtener 20 mM, y se incubó a 4°C durante 18 horas y luego se centrifugó a 9,400 x g durante 30 minutos (EX-126, TOMY) para separar los precipitados y el sobrenadante. El minicolágeno remanente en este sobrenadante (86 mL) fue purificado usando una columna de manano agarosa usando el enlazamiento con manano. Una Econo-Column (Bio-RAD) fue llenada

con 5 mL de gel de manano agarosa (SIGMA), y el gel fue lavado y equilibrado con 15 mL de TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía 5 mM EDTA (Dojindo) y 45 mL de TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía cloruro de calcio 5 mM (Wako). El sobrenadante fue cargado a una rata de flujo de 1.0 mL/min, y luego lavado con 40 mL de TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía cloruro de calcio 5 mM (Wako). El minicolágeno fue eluido usando 15 mL de TBS (TBS en polvo, Takara) que contenía 5 mM EDTA (Dojindo), y el primer pico (9 mL) fue recolectado. El eluido fue dializado (Spectra/Pro™ Biotech, Membranas de Diálisis; 10,000 MWCO; Spectrum Laboratories, Inc.) contra cloruro de sodio 0.4 M, regulador 0.1 M Tris-clorhidrato (pH7.4 at 4°C) durante cinco días, y se recolectaron 3.9 mg de minicolágeno soluble en agua que tenía actividad de enlazamiento a manano (de aquí en adelante, MC-Man) (véase Fig. 13).

#### 10 **[Ejemplo 17]** Ensayo sobre la adhesión celular a placas recubiertas con colágeno

Las propiedades de adhesión de las células fueron examinadas haciendo que osteoblastos humanos (células MG-63, ATCC), los cuales son células adherentes, se adhirieran a microplacas de 96 pozos recubiertas con atelocolágeno tipo I de origen natural, atelocolágeno tipo I bovino de origen natural, o minicolágenos purificados (MC-sal, MC-Man).

15 Específicamente, atelocolágeno tipo I humano de origen natural (colágeno, tipo I, soluble en ácido, de piel humana; SIGMA-ALDRICH), atelocolágeno tipo I bovino de origen natural (de piel de ternera, cultivo celular probado; SIGMA), MC-sal, y MC-Man fueron preparados por dilución a 0.1 mg/mL en ácido acético 0.1 M (Wako). Estas soluciones de colágeno, solución de BSA desnaturalizada por calor al 3% (p/v) (Invitrogen), y PBS (Wako) fueron agregadas a placas de 96 pozos (placa F96 MAXISORP Nunclmmuno, Nunc) a 100 µL/pozo y los pozos fueron recubiertos a temperatura ambiente durante 13 horas (n = 3). Los pozos recubiertos fueron lavados tres veces con PBS (Wako), y solución de BSA desnaturalizado por calor al 1% (p/v) (Invitrogen) fue agregada a 300 mL/pozo para bloquear a 37°C durante una hora. Después del bloqueo, los pozos fueron lavados una vez con PBS (Wako), y se sembró una solución de osteoblastos humanos (células MG-63, ATCC) ajustada a  $2.5 \times 10^5$  células/mL en un medio RPMI-1640 (Invitrogen) a 100 µL/pozo para hacer que los osteoblastos humanos (células MG-63, ATCC) se adhirieran a 37°C durante una hora. Después de remover los osteoblastos humanos no adheridos (línea celular MG-63, ATCC) mediante un lavado sencillo utilizando una solución de BSA desnaturalizada por calor al 1% (p/v) (Invitrogen), se agregó medio RPMI-1640 (Invitrogen) a 100 µL/pozo y 20 µL de CellTiter 96™. Se agregó Aqueous One Solution Reagent (MTS, Promega). Después de la incubación a 37°C durante tres horas, se midió la absorbancia a la longitud de onda de 490 nm con la longitud de onda de 655 nm como control utilizando un lector de microplacas (Modelo 680, manufacturado por BioRad) (véase figura 14). Adicionalmente, se hizo que osteoblastos humanos (células MG-63, ATCC) se adhirieran durante una hora a 37°C, y las células que permanecieron después de la remoción de las células no adheridas por lavado (véase figura 15) así como las células que fueron incubadas subsecuentemente a 37°C durante tres horas (figura 16) fueron observadas bajo un microscopio con contraste de fases. La imagen fue observada utilizando un microscopio invertido (Nikon ECLIPSE TE2000-S, manufacturado por Nikon) equipado con una cabeza de cámara a color de alta definición (DS-Fi1, manufacturado por Nikon) y una unidad de control (DS-L2, manufacturado por Nikon).

Como resultado, las absorbancias en los pozos recubiertos con atelocolágeno tipo I humano de origen natural, atelocolágeno tipo I bovino de origen natural, MC-sal, y MC-Man fueron dos veces o más que la de los pozos (PBS) no recubiertos con colágeno, y se observó un alto nivel de adhesión de osteoblastos humanos debido al recubrimiento con colágeno. Adicionalmente, se hizo que los osteoblastos humanos se adhirieran durante una hora, y las células que permanecieron después de la remoción de las células no adheridas por lavado (véase figura 15) así como las células que fueron incubadas subsecuentemente a 37°C durante tres horas (véase figura 16) fueron observados en un microscopio con contraste de fases. Los osteoblastos humanos mostraron adhesión y elongación en los pozos recubiertos con atelocolágeno tipo I humano de origen natural, MC-sal, y MC-Man. Sin embargo, mientras que la adhesión de los osteoblastos humanos fue observada con atelocolágeno tipo I bovino de origen natural, la elongación fue difícilmente vista. A partir de lo anterior, se encontró que MC-sal y MC-Man tienen propiedades comparables a las del atelocolágeno humano de origen natural con respecto a la adhesión y elongación de osteoblastos humanos.

#### **[Ejemplo 18]** Construcción de minicolágeno en el cual la región terminal C a la región GPP es eliminada

50 Para especificar la región necesaria para la estructura de hélice triple del minicolágeno los presente inventores construyeron una proteína en la cual la porción de la región terminal C a la región GPP del minicolágeno es eliminada (de aquí en adelante, abreviada como MC-GPP). La figura 17 muestra cada una de las regiones del minicolágeno (minicolágeno tipo I) y MC-GPP. Utilizando métodos bien conocidos por los experimentados en la técnica, se construyó pDC6/MC-GPP (figura 18) sustituyendo la secuencia de nucleótidos Nos. 1267-1275 del vector pDC6 como se describe en SEQ ID NO: 14 con el ADNc que codifica MC-GPP tal como se describe en SEQ ID NO: 55 15.

**[Ejemplo 19]** Introducción de pDC6/MC-GPP en células CHO, y selección en un medio libre de HT utilizando un medio CD o un medio producido por la adición de un aditivo sin base animal a un medio CD

Se transfectaron 2.5 µg de pDC6/MC-GPP en 4,000,000 de células CHO (células CHO DG44) en matraces de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> utilizando el método de la Lipofectina (se utilizó Lipofectamina™ LTX, Invitrogen). El método de transfección siguió a las instrucciones del fabricante. Transcurridas 48 horas después de la transfección, se determinó el número de células, y luego las células fueron diluidas en medio IS CHO-CD con H (IS Japón) que contenía Gluta Max™-I 4 mM (Invitrogen). Las células fueron sembradas en cinco placas de microtitulación de 96 pozos a concentraciones de 4000 células/pozo (480 pozos), y cuando fueron cultivadas en la presencia de gas de dióxido de carbono al 5% a 37°C durante aproximadamente tres semanas, se observaron células supervivientes (líneas celulares que crecen en medio libres de HT). Se llevó a cabo la inmunoprecipitación Western bajo condiciones reductoras para verificar la expresión de la proteína de interés en las líneas celulares supervivientes. Específicamente, 10 µL de regulador de muestras Laemmli (BIO-RAD) que contenía 5% 2-mercaptoetanol (Wako) fueron mezclados con 10 µL de cada uno de los sobrenadantes de los cultivos de las líneas celulares que se encontraron como proliferantes, para reducción por calentamiento a 98°C durante cinco minutos (DTU-18, TAITEC). Un regulador de electroforesis (Tris/Glicina/SDS, BIO-RAD) y Super Sep™ Ace 10% a 20% 17 pozos (Wako) fueron colocados en un recipiente de electroforesis (DPE-1020, DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD), 20µL de las soluciones tratadas con calor fueron aplicados a Super Sep™ Ace 10% a 20% 17 pozos (Wako), y se llevó a cabo la electroforesis a 40 mA (My Run, COSMO BIO CO., LTD) durante 55 minutos. Después de esto, el gel fue retirado de las placas de vidrio, y sumergido durante cinco minutos con agitación (Wave-S1, TAITEC) en 10 mL de regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía metanol (Wako) a 30%). La Membrana de Transferencia Immobilon-P (MILLIPORE) fue sumergido con agitación (Wave-S 1, TAITEC) en 10 mL de metanol (Wako) durante 15 segundos, 10 mL de agua ultrapura (ELGA) durante dos minutos, y 10 mL de regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)) durante cinco minutos. En un aparato de transferencia (TRANS-BLO, SD SEMI-DRY TRANSFER CELL, BIO-RAD), regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía papeles de filtro sumergidos en 30% de metanol (Wako)) (Extra Thick Blot Paper Protean™ XL Size, BIO-RAD), Membrana de Transferencia Immobilon-P (MILLIPORE), gel, y papeles de filtro (Extra Thick Blot Paper Protean™ XL Size, BIO-RAD) fueron dispuestos en orden desde el lado menos, se colocó una cubierta, y se llevó a cabo la electroforesis a 80 mA (PowerPac HC™, BIO-RAD) durante 90 minutos para transferir las proteínas separadas sobre la ImmobilonP Transfer Membrane (MILLIPORE). Después de la transferencia, la Membrana de Transferencia Immobilon-P (MILLIPORE) fue sumergida en 10 mL de ImmunoBlock (División de Productos de Laboratorio de Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) y bloqueada a 4°C durante 18 horas, luego se lavó tres veces por agitación (Wave-S1, TAITEC) durante cinco minutos en 10 mL de PBS (Wako) que contenía 0.05% Tween 20 (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako). 10 mL de un anticuerpo 6-His monoclonal (COVANCE) diluido 1,000 veces con PBS (Wako) que contenía 0.05% Tween 20 (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako) y las proteínas sobre la membrana se hicieron reaccionar durante una hora a temperatura ambiente con agitación (Wave-S1, TAITEC). Después de que los anticuerpos no enlazados fueron removidos, la membrana fue lavada tres veces por agitación durante cinco minutos (WaveS1, TAITEC) en 10 mL de PBS (Wako) que contenía 0.05% Tween 20 (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako). Se agregaron 10 mL de una IgG(H+L)HRP antirratón de cabra (Jackson ImmunoResearch) diluido 5,000 veces en PBS (Wako) que contenía 0.05% Tween 20 (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako), y se dejó transcurrir la reacción durante una hora a temperatura ambiente con agitación (Wave-S1, TAITEC). Después de que los anticuerpos no enlazados fueron removidos, la membrana fue lavada tres veces por agitación (Wave-S1, TAITEC) durante diez minutos en 24 mL de PBS (Wako) que contenía 0.05% Tween 20 (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako). 2 mL de Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (MILLIPORE) fue agregado para quimioluminiscencia, y se tomó una fotografía de 10 segundos a un minuto usando Light-Capture ATTO Cooled CCD Camera System (ATTO) en sus parámetros normales. Las células para las cuales se detectó la expresión de MC-GPP fueron transferidas a placas de 24 pozos junto con Medio IS CHO-CD con hidrolizado (IS Japón) que contenía 4 mM Gluta MAX™-I (Invitrogen), y las células fueron cultivadas hasta que ocuparon 1/3 o más de cada pozo. Se llevó a cabo inmunoprecipitación Western bajo condiciones reductoras como se describió más arriba, y las células en las cuales se detectó la expresión de MC-GPP fueron transferidas a placas de 6 pozos junto con Medio IS CHO-CD con hidrolizado (IS Japón) que contenía 4 mM Gluta MAX™-I (Invitrogen), y las células fueron cultivadas hasta que ocuparon 1/3 o más de cada pozo. Las líneas celulares para las cuales se observó proliferación y se detectó expresión de MC-GPP por inmunoprecipitación Western bajo condiciones reductoras fueron transferidas a matraces T-75 (BD) junto con Medio IS CHO-CD con hidrolizado (IS Japón) que contenía 4 mM Gluta MAX™-I (Invitrogen), y las células fueron cultivadas hasta que alcanzaron 1.0 x 10<sup>6</sup> células/mL en cada pozo.

#### [Ejemplo 20] Purificación de MC-GPP

Se cultivaron células CHO que expresan MC-GPP (pDC6/MC-GPP-3) con medio IS CHO-CD con hidrolizado (IS JAPÓN) por cultivo estacionario en matraces T-75 (FALCON) a 37°C en la presencia de dióxido de carbono al 5% (celda HERA 150, Heraeus). Las soluciones de cultivo fueron recolectadas y centrifugadas a 1,750 x g durante diez minutos (EX-126, TOMY) para separar las células y el sobrenadante, y este sobrenadante fue cargado en una columna de Ni para purificar el MC-GPP. Específicamente, se llenó una columna vacía Poly (BIO-RAD) con 1 mL de gel de agarosa Ni-NTA (Invitrogen) y el gel fue lavado con 6 mL de agua ultrapura (BMS). Subsecuentemente, el gel fue lavado tres veces con 6 mL de regulador de enlazamiento nativo (dihidrógeno fosfato de sodio 0.25 M (Wako), cloruro de sodio 2.5 M (Wako), imidazol 0.01 M (Wako), pH 8.0), y 8 mL del sobrenadante de cultivo fueron cargados sobre la columna. La columna fue tapada y tuvo lugar el enlazamiento con mezcla a 4°C durante 60 minutos (Aikuru,

IWAKI). El gel fue lavado nueve veces con 6 mL del regulador de lavado nativo (dihidrógeno fosfato de sodio 0.25 M (Wako), cloruro de sodio 2.5 M (Wako), imidazol 0.02 M (Wako), pH 8.0), y la elución se llevó a cabo seis veces, 1 mL a la vez utilizando el regulador de elución nativo (dihidrógeno fosfato de sodio 0.23 M (Wako), cloruro de sodio 2.3 M (Wako), imidazol 0.25 M (Wako), pH 8.0). Los 2 mL iniciales del eluido fueron dializados contra solución de ácido acético 0.02 M a 4°C durante tres días, y luego se recolectó la solución de MC-GPP.

**[Ejemplo 21]** Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS de MC-GPP bajo condiciones reductoras

MC-GPP purificado fue analizado por electroforesis en gel de acrilamida SDS bajo condiciones reductoras. Específicamente, 10 µL de regulador de muestras Laemmli (BIO-RAD) que contenía 5% of 2-mercaptoetanol (Wako) fue agregado a 10 µL de MC-GPP purificado para reducción por calentamiento a 98°C durante cinco minutos (DTU-18, TAITEC). Un regulador de electroforesis (Tris/Glicina/SDS, BIO-RAD) y Super Sep™ Ace 10% a 20% 17 pozos (Wako) fueron colocados en un recipiente de electroforesis (DPE-1020, DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD), y 15µL de las soluciones tratadas con calor fueron aplicados a Super Sep™ Ace 10% a 20% 17 pozos (Wako), y se llevó a cabo la electroforesis a 40 mA (My Run, COSMO BIO CO., LTD) durante 55 minutos. Luego, se llevó a cabo la tinción con plata usando 2D-Silver Stain Reagent II (COSMO BIO CO., LTD). Primero, el gel fue fijado por agitación durante 20 minutos en 40 mL de solución de fijación I (50% de metanol (Wako), ácido acético al 10% (Wako), y 40% agua (BMS)). A continuación, el gel fue fijado por agitación durante 30 minutos en 40 mL de solución de fijación II (30% de metanol (Wako)-ácido acético al 10% (Wako), 5% agente de fijación (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.), y 55% de agua ultrapura (BMS)). Luego, se llevó a cabo el pretratamiento por agitación durante 20 minutos en 40 mL de solución de pretratamiento (50% de metanol (Wako), 5% de agente de tratamiento (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.), y 45% de agua ultrapura (BMS)). El gel fue lavado durante diez minutos con 40 mL de agua ultrapura (BMS), teñido durante 30 minutos usando 40 mL de solución de tinción de plata (solución de tinción al 5% A (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.), solución de tinción al 5% B (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.), y 90% de agua ultrapura (BMS)), y luego se lavó durante cinco minutos usando 40 mL de agua ultrapura (BMS). El lavado fue repetido tres veces. El gel fue desarrollado durante minutos usando 40 mL de solución de desarrollo (solución madre de desarrollo al 5% (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.) y 95% de agua ultrapura (BMS)), y 2 mL de solución de detención (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.) fueron agregados para detener el desarrollo. Finalmente, el gel fue lavado durante diez minutos usando 40 mL de agua ultrapura (BMS), y se tomó por barrido una imagen (véase Fig. 19) usando un escáner (GT-X900, EPSON).

**[Ejemplo 22]** Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS de MC-GPP bajo condiciones no reductoras

El MC-GPP purificado fue analizado por electroforesis en gel de acrilamida SDS bajo condiciones no reductoras. Específicamente, 10 µL de regulador de muestras Laemmli (BIO-RAD) fue agregado a 10 µL de MC-GPP purificado, y se sometió a tratamiento por calor a 98°C durante cinco minutos (DTU-18, TAITEC). Un regulador de electroforesis (Tris/Glicina/SDS, BIO-RAD) y Super Sep™ Ace 5% a 20% 17 pozos (Wako) fueron colocados en un recipiente de electroforesis (DPE-1020, DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD), y 15 µL de las soluciones tratadas con calor fueron aplicados a Super Sep™ Ace 5% a 20% 17 pozos (Wako), y se llevó a cabo la electroforesis a 40 mA (My Run, COSMO BIO CO., LTD) durante 55 minutos. Luego, se llevó a cabo la tinción con plata usando 2D-Silver Stain Reagent II (COSMO BIO CO., LTD). Primero, el gel fue fijado por agitación durante 20 minutos en 40 mL de solución de fijación I (50% de metanol (Wako), ácido acético al 10% (Wako), y 40% agua (BMS)). A continuación, el gel fue fijado por agitación durante 30 minutos en 40 mL de solución de fijación II (30% de metanol (Wako), ácido acético al 10% (Wako), 5% agente de fijación (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.), y 55% de agua ultrapura (BMS)). Luego, se llevó a cabo el pretratamiento por agitación durante 20 minutos en 40 mL de solución de pretratamiento (50% de metanol (Wako), 5% de agente de tratamiento (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.), y 45% de agua ultrapura (BMS)). El gel fue lavado durante diez minutos con 40 mL de agua ultrapura (BMS), teñido durante 30 minutos usando 40 mL de solución de tinción de plata (solución de tinción al 5% A (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.), solución de tinción al 5% B (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.), y 90% de agua ultrapura (BMS)), y luego se lavó durante cinco minutos usando 40 mL de agua ultrapura (BMS). El lavado fue repetido tres veces. El gel fue desarrollado durante minutos usando 40 mL de solución de desarrollo (solución madre de desarrollo al 5% (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.) y 95% de agua ultrapura (BMS)), y 2 mL de solución de detención (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.) fueron agregados para detener el desarrollo. Finalmente, el gel fue lavado durante diez minutos usando 40 mL de agua ultrapura (BMS), y se tomó por barrido una imagen (véase Fig. 20) usando un escáner (GT-X900, EPSON).

**[Ejemplo 23]** Electroforesis en gel de poliacrilamida nativa de MC-GPP

El MC-GPP purificado fue analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida nativa. Específicamente, se agregaron 10 µL de regulador de muestra nativo (BIO-RAD) a 10 µL de MC-GPP purificado. Se colocaron un regulador de electroforesis (tris/glicina/SDS, BIORAD) y Super Sep™ Ace de 5% a 20% 17 pozos (Wako) en un recipiente de electroforesis (DPE-1020, DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD), se aplicaron 15 µL de las soluciones de muestra preparadas a Super Sep™ Ace de 5% a 20% 17 pozos (Wako), y la electroforesis fue llevada a cabo a 40 mA (My Run, COSMO BIO CO., LTD) durante 55 minutos. Luego, se llevó a cabo la tinción con plata

utilizando 2D-Silver Stain Reagent II (COSMO BIO CO., LTD). Primeramente, el gel fue fijado por agitación durante 20 minutos en 40 mL de solución-I de fijación (50% de metanol (Wako), 10 % de ácido acético (Wako), y 40% de agua (BMS)). A continuación, el gel fue fijado por agitación durante 30 minutos en 40 mL de solución-II de fijación (30% de metanol (Wako), 10% de ácido acético (Wako), 5% de agente de fijación (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.), y 55% de agua ultrapura (BMS)). Se llevó a cabo un pretratamiento agitando durante 20 minutos en 40 mL de solución de pretratamiento (50% de metanol (Wako), 5% de agente de pretratamiento (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.), y 45% de agua ultrapura (BMS)). El gel fue lavado durante 10 minutos con 40 mL de agua ultrapura (BMS), teñido durante 30 minutos utilizando 40 mL de solución de tinción de plata (solución A de tinción al 5% (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.), solución B de tinción al 5% (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.), y 90% de agua ultrapura (BMS)), y luego se lavó durante cinco minutos utilizando 40 mL de agua ultrapura (BMS). El lavado fue repetido tres veces. El gel fue desarrollado durante 8 minutos utilizando 40 mL de solución de desarrollo (solución de reserva de desarrollo 5% (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.) y 95% de agua ultrapura (BMS)), y se agregaron 2 mL de solución de detención (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.) para detener el desarrollo. Finalmente, el gel fue lavado durante diez minutos utilizando 40 mL de agua ultrapura (BMS), y se sometió a barrido una imagen (véase figura 21) utilizando un escáner (GT-X900, EPSON).

#### [Ejemplo 24] Inmunoprecipitación Western de MC-GPP bajo condiciones reductoras

Puesto que el MC-GPP tiene una etiqueta His en el lado de su terminal C, los anticuerpos anti-His pueden enlazarse a él. La inmunoprecipitación Western fue llevada a cabo bajo condiciones reductoras utilizando esta propiedad, y se detectó e identificó MC-GPP purificado por quimioluminiscencia. Específicamente, 10  $\mu$ L de regulador de muestras Laemmli (BIO-RAD) que contenía 5% 2-mercaptoetanol (Wako) fue agregado a 10  $\mu$ L de MC-GPP purificado para reducción por calentamiento a 98°C durante cinco minutos (DTU-18, TAITEC). Un regulador de electroforesis (Tris/Glicina/SDS, BIO-RAD) y Super Sep™ Ace 5% a 20% 17 pozos (Wako) fueron colocados en un recipiente de electroforesis (DPE-1020, DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD), y 15  $\mu$ L de las soluciones tratadas con calor fueron aplicados a Super Sep™ Ace 5% a 20% 17 pozos (Wako), y se llevó a cabo la electroforesis a 40 mA (My Run, COSMO BIO CO., LTD) durante 55 minutos. Luego, el gel fue removido de las placas de vidrio, y sumergido durante cinco minutos con agitación (Wave-S1, TAITEC) en 10 mL de regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)). Membrana de Transferencia Immobilon-P (MILLIPORE) fue sumergido con agitación (Wave-S1, TAITEC) en 10 mL de metanol (Wako) durante 15 segundos, 10 mL de agua ultrapura (ELGA) durante dos minutos, y 10 mL de regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)) durante cinco minutos. En un aparato de transferencia (TRANSBLO, SD SEMI-DRY TRANSFER CELL, BIO-RAD), regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía papeles de filtro sumergidos en 30% de metanol (Wako)) (Extra Thick Blot Paper Protean™ XL Size, BIO-RAD), Membrana de Transferencia Immobilon-P (MILLIPORE), gel, y papeles de filtro (Extra Thick Blot Paper Protean™ XL Size, BIO-RAD) fueron dispuestos en orden desde el lado menos, se colocó una cubierta, y se llevó a cabo la electroforesis a 80 mA (PowerPac HC™, BIO-RAD) durante 90 minutos para transferir las proteínas separadas sobre la Membrana de Transferencia Immobilon-P (MILLIPORE). Después de la transferencia, la Membrana de Transferencia Immobilon-P (MILLIPORE) fue sumergida en 10 mL de ImmunoBlock (División de Productos de Laboratorio de Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) y bloqueada a 4°C durante 18 horas, luego se lavó tres veces por agitación (WaveS1, TAITEC) durante cinco minutos en 10 mL de PBS (Wako) que contenía 0.05% Tween 20 (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako). 10 mL de un anticuerpo 6-His monoclonal (COVANCE) diluido 1,000 veces con PBS (Wako) que contenía 0.05% Tween 20 (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako) y las proteínas sobre la membrana se hicieron reaccionar durante una hora a temperatura ambiente con agitación (Wave-S 1, TAITEC). Después de que los anticuerpos no enlazados fueron removidos, la membrana fue lavada tres veces por agitación (Wave-S1, TAITEC) durante cinco minutos en 10 mL de PBS (Wako) que contenía 0.05% Tween 20 (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako). Se agregaron 10 mL de una IgG(H+L)HRP antirratón de cabra (Jackson ImmunoResearch) diluido 5,000 veces en PBS (Wako) que contenía 0.05% Tween 20 (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako), y la reacción tuvo lugar a temperatura ambiente con agitación durante una hora (Wave-S1, TAITEC). Después de que los anticuerpos no enlazados fueron removidos, la membrana fue lavada tres veces por agitación (Wave-S1, TAITEC) durante diez minutos en 24 mL de PBS (Wako) que contenía 0.05% Tween 20 (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako). 2 mL de Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (MILLIPORE) fue agregado para quimioluminiscencia, y se tomó una fotografía de 30 segundos (véase Fig. 22) usando Light-Capture ATTO Cooled CCD Camera System (ATTO) en sus parámetros normales.

#### 55 [Ejemplo 25] Inmunoprecipitación Western de MC-GPP bajo condiciones no reductoras

Puesto que MC-GPP tiene una etiqueta sobre su lado del terminal C, los anticuerpos anti-His pueden enlazarse a él. La inmunoprecipitación Western se llevó a cabo bajo condiciones no reductoras utilizando esta propiedad, y se detectó e identificó el MC-GPP purificado por quimioluminiscencia. Específicamente, 10  $\mu$ L de regulador de muestras Laemmli (BIO-RAD) fue agregado a 10  $\mu$ L de MCGPP purificado para tratamiento por calor a 98°C durante cinco minutos (DTU-18, TAITEC). Un regulador de electroforesis (Tris/Glicina/SDS, BIORAD) y Super Sep™ Ace 5% a 20% 17 pozos (Wako) fueron colocados en un recipiente de electroforesis (DPE-1020, DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD), y 15  $\mu$ L de las soluciones tratadas con calor fueron aplicados a Super Sep™ Ace 5% a 20% 17 pozos

(Wako), y se llevó a cabo la electroforesis a 40 mA (My Run, COSMO BIO CO., LTD) durante 55 minutos. Luego, el gel fue removido de las placas de vidrio, y sumergido durante cinco minutos con agitación (Wave-S1, TAITEC) en un regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)). Membrana de Transferencia Immobilon-P (MILLIPORE) fue sumergido con agitación (Wave-S 1, TAITEC) en 10 mL de metanol (Wako) durante 15 segundos, 10 mL de agua ultrapura (ELGA) durante dos minutos, y 10 mL de regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)) durante cinco minutos. En un aparato de transferencia (TRANS-BLO, SD SEMI-DRY TRANSFER CELL, BIO-RAD), regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía papeles de filtro sumergidos en 30% de metanol (Wako)) (Extra Thick Blot Paper Protean™ XL Size, BIO-RAD), Membrana de Transferencia Immobilon-P (MILLIPORE), gel, y papeles de filtro (Extra Thick Blot Paper Protean™ XL Size, BIO-RAD) fueron dispuestos en orden desde el lado menos, se colocó una cubierta, y se llevó a cabo la electroforesis a 80 mA (PowerPac HC™, BIO-RAD) durante 90 minutos para transferir las proteínas separadas sobre la membrana de transferencia ImmobilonP (MILLIPORE). Después de la transferencia, la Membrana de Transferencia Immobilon-P (MILLIPORE) fue sumergida en 10 mL de ImmunoBlock (División de Productos de Laboratorio de Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) y bloqueada a 4°C durante 18 horas, luego se lavó tres veces por agitación (Wave-S1, TAITEC) durante cinco minutos en 10 mL de PBS (Wako) que contenía 0.05% Tween20 (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako). 10 mL de un anticuerpo 6-His monoclonal (COVANCE) diluido 1,000 veces con PBS (Wako) que contenía 0.05% Tween 20 (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako) y las proteínas sobre la membrana se hicieron reaccionar durante una hora a temperatura ambiente con agitación (Wave-S 1, TAITEC). Después de que los anticuerpos no enlazados fueron removidos, la membrana fue lavada tres veces por agitación (Wave-S1, TAITEC) durante cinco minutos en 10 mL de PBS (Wako) que contenía 0.05% Tween 20 (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako). Se agregaron 10 mL de una IgG(H+L)HRP antirratón de cabra (Jackson ImmunoResearch) diluido 5,000 veces en PBS (Wako) que contenía 0.05% Tween 20 (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako), y la reacción tuvo lugar a temperatura ambiente con agitación durante una hora (Wave-S1, TAITEC). Después de que los anticuerpos no enlazados fueron removidos, la membrana fue lavada tres veces por agitación (Wave-S 1, TAITEC) durante diez minutos en 24 mL de PBS (Wako) que contenía 0.05% Tween 20 (Polioxietileno (20) Sorbitano Monolaurato, Wako). 2 mL de Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (MILLIPORE) fue agregado para quimioluminiscencia, y se tomó una fotografía de 30 segundos (véase Fig. 23) usando Light-Capture ATTO Cooled CCD Camera System (ATTO) en sus parámetros normales.

### 30 **[Ejemplo 26]** Digestión con pepsina de MC-GPP y atelocolágeno humano de origen natural

El colágeno que forma una estructura de hélice triple es resistente contra la escisión por pepsina. Por lo tanto, MC-GPP purificado, atelocolágeno tipo I humano de origen natural (colágeno, tipo I, soluble en ácido, de piel humana, SIGMA-ALDRICH), y minicolágeno fibroso purificado (ejemplo 7) fueron digeridos con pepsina bajo condiciones ácidas, y se verificó la resistencia contra la escisión por pepsina a partir de imágenes de electroforesis en poliacrilamida SDS. Más específicamente, 3 µL de solución de ácido clorhídrico 0.3 M fueron agregados a 10 µL de cada uno de MC-GPP purificado (0.028 mg/mL), atelocolágeno tipo I humano de origen natural (colágeno, tipo I, soluble en ácido, de piel humana, SIGMA-ALDRICH) (0.1 mg/mL) o minicolágeno fibroso (Ejemplo 7) (0.1 mg/mL) para ajustar el pH a 2, se agregaron 3 µL de pepsina (pepsina, de mucosa estomacal porcina, 3370 unidades/mg de proteína; SIGMA-ALDRICH) en solución (la cantidad de pepsina es tres veces la de cada proteína cuando se convierte en moles), y se llevó a cabo la digestión con pepsina a 20°C (ciclizador térmico 2720, Applied Biosystems) durante dos horas. Aquí, las preparaciones de cada muestra sin pepsina agregada, las preparaciones de pepsina (pepsina, de mucosa estomacal porcina, 3370 unidades/mg de proteína; SIGMA-ALDRICH) sola (misma cantidad que la cantidad utilizada para dirigir cada muestra), y las preparaciones que no contenían muestra ni pepsina fueron preparadas como controles. Se agregó solución de ácido acético 10 mM en vez de la solución de pepsina o muestra, y la incubación se llevó a cabo a 20°C durante dos horas. Se agregó 1 µL de solución de tris (2-Amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol (Tris aminometano) 1 M; Wako) para detener la reacción, y el colágeno fue refibrilizado irreversiblemente por incubación a 4°C durante 18 horas. 17 µL de regulador de muestras Laemmli (BIO-RAD) que contenía 5% 2-mercaptoetanol (Wako) fueron agregados para reducción por calentamiento (DTU-18, TAITEC) a 98°C durante cinco minutos. Un regulador de electroforesis (Tris/Glicina/SDS, BIO-RAD) y Super Sep™ Ace 10% a 20% 17 pozos (Wako) fueron colocados en un recipiente de electroforesis (DPE-1020, DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD), y 18 µL de las soluciones tratadas con calor fueron aplicados a Super Sep™ Ace 10% a 20% 17 pozos (Wako), y se llevó a cabo la electroforesis a 40 mA (My Run, COSMO BIO CO., LTD) durante 55 minutos. Luego, se llevó a cabo la tinción con plata usando 2D-Silver Stain Reagent II (COSMO BIO CO., LTD). Primero el gel fue fijado por agitación durante 20 minutos en 40 mL de solución de fijación I (50% de metanol (Wako), ácido acético al 10% (Wako), y 40% de agua (BMS)). A continuación, el gel fue fijado por agitación durante 30 minutos en 40 mL de solución de fijación II (30% de metanol (Wako), ácido acético al 10% (Wako), 5% agente de fijación (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.), y 55% de agua ultrapura (BMS)). El Pretratamiento fue llevado a cabo por agitación durante 20 minutos en 40 mL de solución de pretratamiento (50% de metanol (Wako), 5% de agente de tratamiento (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.), y 45% de agua ultrapura (BMS)). El gel fue lavado durante diez minutos con 40 mL de agua ultrapura (BMS), teñido durante 30 minutos usando 40 mL de solución de tinción de plata (solución de tinción al 5% A (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.), solución de tinción al 5% B (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.), y 90% de agua ultrapura (BMS)), y luego se lavó durante cinco minutos usando 40 mL de agua ultrapura (BMS). El lavado fue repetido tres veces. El gel fue

- desarrollado durante minutos usando 40 mL de solución de desarrollo (solución madre de desarrollo al 5% (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.) y 95% de agua ultrapura (BMS)), y 2 mL de solución de detención (2D-Silver Stain Reagent II, COSMO BIO CO., LTD.) fueron agregados para detener el desarrollo. Finalmente, el gel fue lavado durante diez minutos usando 40 mL de agua ultrapura (BMS), y se tomó por barrido una imagen (Fig. 24) usando un escáner (GT-X900, EPSON). Las bandas en las líneas en las cuales fueron aplicados MC-GPP, MC-GPP digerido con pepsina, una cantidad equivalente de pepsina solamente a la usada para digerir el MC-GPP, minicolágeno fibroso purificado (Ejemplo 7), minicolágeno fibrosos digerido con pepsina (Ejemplo 7), y una cantidad equivalente de pepsina solamente a la usada para digerir el minicolágeno fibroso, fueron analizadas usando ImageJ (véase Fig. 25).
- 10 Como resultado, el atelocolágeno tipo I humano de origen natural no fue escindido por la digestión con pepsina. El minicolágeno fibroso purificado mostró una banda cerca a 50 kDa, pero regiones diferentes a la del dominio del colágeno fueron escindidas y eliminadas por la digestión con pepsina de tal manera que una banda para el dominio de colágeno fue observada alrededor de 30 kDa. También con el MC-GPP, se eliminaron bandas diferentes a las del dominio del colágeno de tal manera que se observó una banda para el dominio del colágeno cerca a 30 kDa. Lo anterior revela que el MC-GPP es resistente contra la escisión por pepsina y está correctamente plegado en una estructura de hélice triple, y sugiere que la presencia del dominio rico en cisteína de SP-D lleva a la formación de una estructura de hélice triple de la porción de colágeno.

Aplicabilidad industrial

- 20 Utilizando células de mamíferos como anfitrionas, la presente invención puede proveer análogos de colágeno humano avanzados que tienen una estructura de hélice triple similar a la de los de origen natural, lo cuales pueden ser más fácilmente manejados que los de origen natural, vectores de expresión que permiten la producción de los mismos, y células productoras de análogos de colágeno humano.
- Los métodos de producción de la presente invención pueden ser aplicados no solamente al colágeno, sino también a proteínas que tengan una estructura de hélice triple, tales como la colectina.
- 25 Puesto que los análogos de colágeno de la presente invención tienen pesos moleculares más bajos que los de los colágenos de origen natural, son fácilmente purificados y fácilmente manipulados. Se considera que estos novedosos análogos de colágeno que tienen una estructura de hélice triple tienen propiedades que son diferentes de las de los colágenos conocidos, y se esperan sus aplicaciones como biomateriales novedosos.

Listado de secuencias

- 30 <110> NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.
- <120> SUSTANCIA PROTEÍNICA QUE TIENE ESTRUCTURA DE HÉLICE TRIPLE Y MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE LA MISMA
- <130> S67792PCEP
- 35 <140> EP 09834882.4
- <141> 2009-12-22
- <150> JP 2008-325691
- <151> 2008-12-22
- <160> 15
- 40 <170> PatentIn version 3.4
- <210> 1
- <211> 385
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 45 <400> 1

ES 2 536 198 T3

Met Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Leu Val Leu Leu Thr Gln Pro Leu  
 1 5 10 15

Gly Tyr Leu Glu Ala Glu Met Lys Thr Tyr Ser His Arg Thr Met Pro  
 20 25 30

Ser Ala Cys Thr Leu Val Met Cys Ser Ser Val Glu Ser Gly Lys Ala  
 35 40 45

Gly Glu Arg Gly Val Pro Gly Pro Pro Gly Ala Val Gly Pro Ala Gly  
 50 55 60

Lys Asp Gly Glu Ala Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Pro  
 65 70 75 80

Ala Gly Glu Arg Gly Glu Gln Gly Pro Ala Gly Ser Pro Gly Phe Gln  
 85 90 95

Gly Leu Pro Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Lys Pro Gly  
 100 105 110

Glu Gln Gly Val Pro Gly Asp Leu Gly Ala Pro Gly Pro Ser Gly Ala  
 115 120 125

Arg Gly Glu Arg Gly Phe Pro Gly Glu Arg Gly Val Gln Gly Pro Pro  
 130 135 140

Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Ala Asn Gly Ala Pro Gly Asn Asp Gly



Ile

385

<210> 2

<211> 6078

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de vector sintetizada artificialmente

<400> 2

ES 2 536 198 T3

cgatgtacgg gccagatata cgcgttgaca ttgattattg actagttatt aatagtaatc 60  
 aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat aacttacggg 120  
 aatggcccg cctggctgac cgcccaacga ccccgccca ttgacgtcaa taatgacgta 180  
 tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg 240  
 gtaaacgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga 300  
 cgtcaatgac ggtaaagtc cgccctggca ttatgccag tacatgaact tatgggactt 360  
 tccacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatgggtga tgcggttttg 420  
 gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg ggatttccaa gtctccacc 480  
 cattgacgtc aatgggagtt tgttttgca ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgctg 540  
 taacaactcc gcccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacgggtgg aggtctatat 600  
 aagcagagct ctctggctaa ctagagaacc cactgttaac tggcttatcg aaattgtcga 660  
 ggagaacttc aggggtgagtt tggggaccct tgattgttct ttctttttcg ctattgtaa 720  
 attcatgtta tatggagggg gcaaagtttt cagggtgttg tttagaatgg gaagatgtcc 780  
 cttgtatcac catggaccct catgataatt ttgtttcttt cactttctac tctgttgaca 840  
 accattgtct cctcttattt tcttttcatt ttctgtaact ttttctgtaa actttagctt 900  
 gcatttgtaa cgaattttta aattcacttt tgtttatttg tcagattgta agtactttct 960  
 ctaatcactt ttttttcaag gcaatcaggg tatattatat tgtacttcag cacagtttta 1020  
 gagaacaatt gttataatta aatgataagg tagaatattt ctgcatataa attctggctg 1080  
 gcgtggaaat attcttattg gtagaaacaa ctacatctcg gtcacatcc tgcctttctc 1140  
 tttatggtta caatgatata cactgtttga gatgaggata aaatactctg agtccaaacc 1200  
 gggcccctct gctaaccatg ttcattgcctt cttctttttc ctacagctcc tgggcaacgt 1260  
 gctggcggcc gccttctaga gctcgaactg tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt 1320  
 gcccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg aaggtgccac tcccactgtc ctttctaat 1380  
 aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg gggggtggg 1440  
 tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggaggatc 1500  
 tccgcggtgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt ccccaggctc cccagcaggc 1560  
 agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca tagtcccgcc cctaactccg 1620  
 cccatcccc cctaactcc gccagttcc gccattctc cgccccatgg ctgactaatt 1680  
 ttttttattt atgcagaggc cgaggccgcc tcggcctctg agctattcca gaagtagtga 1740

ES 2 536 198 T3

ggaggctttt ttggaggcct aggcttttgc aaaaaagctg cagatgattg aacaagatgg 1800  
 attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca 1860  
 acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg ggcgcccggg 1920  
 tctttttgtc aagaccgacc tgtccgggtg cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg 1980  
 gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcactga 2040  
 agcgggaagg gactggtgct tattgggcca agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca 2100  
 ccttgctcct gccgagaaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgtc 2160  
 tgatccggct acctgcccat tcgaccacca agcgaacat cgcacgcagc gagcacgtac 2220  
 tcggatggaa gccggctctg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc 2280  
 gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcgatgcc gacggcgagg atctcgtcgt 2340  
 gacctatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt 2400  
 catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctacccg 2460  
 tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc tttacggtat 2520  
 cgcgcctccc gattegcagc gcacgcctt ctatgcctt cttgacgagt tcttctgaga 2580  
 tccgtgacat aattggacaa actacctaca gagatttaaa gctctaaggt aaatataaaa 2640  
 tttttaagtg tataatgtgt taaactactg attctaattg tttgtgtatt ttagattcca 2700  
 acctatggaa ctgatgaatg ggagcagtgg tggaatgcct ttaatgagga aaacctgttt 2760  
 tgctcagaag aaatgccatc tagtgatgat gaggctactg ctgactctca acattctact 2820  
 cctccaaaaa agaagagaaa ggtagaagac cccaaggact ttccttcaga attgctaagt 2880  
 tttttgagtc atgctgtggt tagtaataga actcttgctt gctttgctat ttacaccaca 2940  
 aaggaaaaag ctgcactgct atacaagaaa attatggaaa aatattctgt aacctttata 3000  
 agtaggcata acagttataa tcataacata ctgttttttc ttactccaca caggcataga 3060  
 gtgtctgcta ttaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagcttttt aatttgtaaa 3120  
 ggggttaata aggaatattt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac 3180  
 cacatttgta gaggttttac ttgctttaaa aaacctccca cacctcccc tgaacctgaa 3240  
 acataaaatg aatgcaattg ttgttgtaaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia 3300  
 ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttcaactgc attctagttg 3360  
 tggtttgctc aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg gcccatcgat gaattcaacg 3420  
 tacgtagctt ggcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgtta 3480  
 cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg 3540  
 ccgcaccga tcgccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg cgctgatgc 3600  
 ggtattttct ccttacgcat ctgtgcggtg tttcacaccg catatggtgc actctcagta 3660

ES 2 536 198 T3

caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agccccgaca cccgcccaaca cccgctgacg 3720  
 cgccctgacg ggcttgctcg ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg 3780  
 ggagctgcat gtgtcagagg ttttcaccgt catcaaccgaa acgcgcgagg acgaaagggc 3840  
 ctcgtgatac gcctatTTTT ataggTTaat gtcAtgataa taatggTTtc ttagacgtca 3900  
 ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt ctaaatacat 3960  
 tcaaataTgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa 4020  
 aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtgcocctta ttccctTTTT tgcggcattt 4080  
 tgccttctcg tttttgctca cccagaaaacg ctggTgaaag taaaagatgc tgaagatcag 4140  
 ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcgtaagat ccttgagagt 4200  
 tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactTTta aagtTctgct atgtggcgcg 4260  
 gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag 4320  
 aatgactTgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta 4380  
 agagaattat gcagtgctgc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg 4440  
 acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gctTTTTtgc acaacatggg ggatcatgta 4500  
 actgccttg atcgttgTga accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac 4560  
 accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt 4620  
 actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca 4680  
 cttctgcgct cgcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg agccggtgag 4740  
 cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta 4800  
 gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag 4860  
 ataggTgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt 4920  
 tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cttttttgat 4980  
 aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgTtcc actgagcgtc agaccctgta 5040  
 gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctgC gcgtaatctg ctgcttgcaa 5100  
 acaaaaaaac cacogctacc agcggTggtt tgtttgcgg atcaagagct accaactctt 5160  
 tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag 5220  
 ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta 5280  
 atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca 5340  
 agacgatagt taccggataa ggccgagcgg tcgggctgaa cggggggTtc gtgcacacag 5400  
 cccagctTgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gcattgagaa 5460  
 agcgcacgc ttccogaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaaagcgg cagggtcggg 5520  
 acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttTa tagtcctgtc 5580

ES 2 536 198 T3

gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggctggagc 5640  
ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttaecggttec tggccttttg ctggcctttt 5700  
gctcacatgt tctttcctgc gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt 5760  
gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag 5820  
gaagcgggaag agcgccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa 5880  
tgcagctggc acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat 5940  
gtgagttagc tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg 6000  
ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac 6060  
gaatttcgta cgaagctt 6078

<210> 3

<211> 1163

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 536 198 T3

caccatgctg ctcttctcc tctctgact ggtcctactc acacagcccc tgggtacct 60  
 ggaagcagaa atgaagacct actcccacag aacaatgccc agtgcttgca ccctgggcat 120  
 gtgtagctca gtggagtccg gaaaggctgg agagcgaggt gttcccggac cccctggcgc 180  
 tgtcggctct gctggcaaag atggagagge tggagctcag ggacccccctg gccctgctgg 240  
 tcccgtggc gagagaggtg aacaaggccc tgcctggctcc cccggattcc agggctctccc 300  
 tggctctgct ggtcctccag gtgaagcagg caaacctggg gaacaggggtg ttcttgagaga 360  
 ccttggcgc cctggcccct ctggagcaag aggcgagaga ggtttccctg gcgagcgtgg 420  
 tgtgcaaggt cccctggctc ctgctggacc ccgaggggccc aacgggtgctc ccggcaacga 480  
 tgggtgctaag ggtgatgctg gtgcccctgg agctcccggg agccagggcg cccctggcct 540  
 tcagggaatg cctggtgaac gtggtgcagc tggctctcca gggcctaagg gtgacagagg 600  
 tgatgctggt cccaaaggtg ctgatggctc tcctggcaaa gatggcgtcc gtggtctgac 660  
 cggccccatt ggtcccccg gccctcctgg acctcctggg ccccctggctc ctcccccgga 720  
 tgggtgatagt agcctggctg cctcagaaag aaaagctctg caaacagaaa tggcacgtat 780  
 caaaaagtgg ctcaccttct ctctgggcaa acaagttggg aacaagttct tcctgaccaa 840  
 tggtgaaata atgaccttg aaaaagtgaa ggccttgtgt gtcaagttcc aggctctgt 900  
 ggccaccccc aggaatgctg cagagaatgg agccattcag aatctcatca aggaggaagc 960  
 ctctctgggc atcaactgat agaagacaga agggcagttt gtggatctga caggaaatag 1020  
 actgacctac acaaactgga acgaggggtga acccaacaat gctggttctg atgaagattg 1080  
 tgtattgcta ctgaaaaatg gccagtggaa tgacgtcccc tgcctccacct cccatctggc 1140  
 cgtctgtgag ttccctatct gaa 1163

<210> 4

<211> 60

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

atgctgctct tctctctc tgactggtc ctactcacac agcccctggg ctacctggaa 60

<210> 5

<211> 75

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 536 198 T3

<400> 5  
gcagaaatga agacctactc ccacagaaca atgccagtg cttgcaccct ggtcatgtgt 60  
agctcagtgg agtcc 75  
<210> 6  
<211> 99  
5 <212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 6  
ccggatggtg atagtagcct ggctgcctca gaaagaaaag ctctgcaaac agaaatggca 60  
cgtatcaaaa agtggctcac cttctctctg ggcaaacaa 99  
<210> 7  
10 <211> 348  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 7  
gttgggaaca agttcttctc gaccaatggt gaaataatga cctttgaaaa agtgaaggcc 60  
ttgtgtgtca agttccaggc ctctgtggcc acccccagga atgctgcaga gaatggagcc 120  
attcagaatc tcatcaagga ggaagccttc ctgggcatca ctgatgagaa gacagaaggg 180  
cagtttgtgg atctgacagg aatagactg acctacacaa actggaacga gggatgaacc 240  
aacaatgctg gttctgatga agattgtgta ttgctactga aaaatggcca gtggaatgac 300  
gtcccctgct ccacctccca tctggccgctc tgtgagttcc ctatctga 348  
15 <210> 8  
<211> 576  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 8  
ggaaaggctg gagagcgagg tgttcccgga ccccctggcg ctgtcgggtcc tgctggcaaa 60  
gatggagagg ctggagctca gggaccccct ggccctgctg gtcccgctgg cgagagaggt 120  
gaacaaggcc ctgctggctc ccccggattc cagggctctcc ctggctctgc tggctctcca 180  
20 ggtgaagcag gcaaacctgg tgaacagggt gttcctggag accttgccgc ccctggcccc 240

# ES 2 536 198 T3

tctggagcaa gaggcgagag aggtttccct ggcgagcgtg gtgtgcaagg tccccctggt 300  
cctgctggac cccgaggggc caacgggtgct cccggcaacg atggtgctaa gggatgatget 360  
ggtgcccctg gagctcccgg tagccagggc gccctggcc ttcagggaat gcctggtgaa 420  
cgtgggtgcag ctgggtcttcc agggcctaag ggtgacagag gtgatgctgg tcccaaaggt 480  
gctgatggct ctccctggcaa agatggcgtc cgtgggtctga ccggcccccatt tggccccccc 540  
ggccctcctg gacctcctgg tccccctggt cctccc 576

<210> 9

<211> 5633

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de vector sintetizada artificialmente

<400> 9

ES 2 536 198 T3

cgcggtacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgcca	60
ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt	120
caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg	180
ccaagtccgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaattggc ccgcctggca ttatgcccag	240
tacatgacct tacgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt	300
accatggtga tgcggttttg gcagtacacc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg	360
ggatttccaa gtctccacc cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaaatcaa	420
cgggacttcc caaaatgtcg taataacccc gccccgttga cgcaaatggg cggtaggcgt	480
gtacgggtgg aggtctatat aagcagagct cgtttagtga accgtcagat cctcactctc	540
ttccgcatcg ctgtctgoga gggccagctg ttgggctcgc ggttgaggac aaactcttcg	600
cggctcttcc agtactcttg gatcgaaaac ccgtcggcct ccgaacggta ctccgccacc	660
gagggacctg agcgagtcog catcgaccgg atcggaaaac ctctcgagaa aggcgtctaa	720
ccagtcacag tcgcaaggta ggctgagcac cgtggcgggc ggcagcgggt ggcggtcggg	780
gttgtttctg gcgaggtgc tgctgatgat gtaattaaag taggcggtct tgagacggcg	840
gatggtcgag gtgaggtgtg gcaggettga gatccagctg ttggggtgag tactccctct	900
caaaagcggg catgacttct gcgctaagat tgtcagtttc caaaaacgag gaggatttga	960
tattcacctg gcccgatctg gccatacaact tgagtgacaa tgacatccac tttgccttcc	1020
tctccacagg tgtccactcc caggtccaag cggccgcctt ctagagcctc gactgtgcct	1080
tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc tccccctgct cttccttgac cctggaaggt	1140
gccactccca ctgtccttcc ctaataaaat gaggaaattg catcgcattg tctgagtagg	1200
tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca agggggagga ttgggaagac	1260

# ES 2 536 198 T3

```

aatagcaggc atgctgggga ggatctccgc ggtgtggaat gtgtgtcagt tagggtgtgg 1320
aaagtcccca ggctcccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc 1380
aaccatagtc cegcccctaa ctccgcccct cccgccccta actccgccc gttccgccc 1440
ttctccgccc catggctgac taatTTTTTT tatttatgca gaggccgagg cgcctcggc 1500
ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg cttttttgga ggcctaggct tttgcaaaaa 1560
agctgcagat ggtacgacca ttaaattgta ttgtagcagt atcacaaaat atgggtattg 1620
gtaaaaatgg tgatttacca tggccacat tacgaaatga atttaaatat tttcaacgaa 1680
tgactactac ttcacagta gaaggtaaac aaaatttagt aattatgggt cgaaaaactt 1740
ggttttcaat tcctgagaag aatcgacctt taaaggacag aattaatata gttctcagta 1800
gagaactcaa agaaccacca cgaggagctc attttcttgc caaaagtttg gatgatgcct 1860
taagacttat tgaacaaccg gaattggcaa gtaaagtaga catggtttgg atagtcggag 1920
gcagttctgt ttaccaggaa gccatgaatc aaccaggcca cctcagactc tttgtgacaa 1980
ggatcatgca ggaatttgaa agtgacacgt ttttcccaga aattgatttg gggaaatata 2040
aacttctccc agaataccca ggcgtcctct ctgaggcca ggaggaaaaa ggcatcaagt 2100
ataagtttga agtctacgag aagaaagact aaagatccgt gacataattg gacaaactac 2160
ctacagagat ttaaagctct aaggtaaata taaaatTTTT aagtgtataa tgtgttaaac 2220
tactgattct aattgtttgt gtatTTTtaga ttccaaccta tggaactgat gaatgggagc 2280
agtggtgga tgcctttaat gaggaaaacc tgTTTTgctc agaagaaatg ccatctagtg 2340
atgatgaggc tactgctgac tctcaacatt ctactcctcc aaaaaagaag agaaaggtag 2400
aagaccccaa ggactttcct tcagaattgc taagTTTTTT gagtcatgct gtgttttagta 2460
atagaactct tgcttgcttt gctatttaca ccacaaagga aaaagctgca ctgctataca 2520
agaaaattat gaaaaaatat tctgtaacct ttataagtag gcataacagt tataatcata 2580
acatactgtt ttttcttact ccacacaggc atagagtgtc tgctattaat aactatgctc 2640
aaaaattgtg taccttttagc tttttaattt gtaaaggggt taataaggaa tatttgatgt 2700
atagtgcctt gactagagat cataatcagc cataccacat ttgtagaggt tttacttgct 2760
ttaaaaaacc tcccacacct cccoctgaac ctgaaacata aaatgaatgc aattgttggt 2820
gttaacttgt ttattgcagc ttataatggg tacaataaaa gcaatagcat cacaaatttc 2880
acaaataaag ctttttttc actgcattct agttgtgggt tgtccaaact catcaatgta 2940
tcttatcatg tctgggccc tcatgaatt caacgtacgt agcttggcac tggcctcgt 3000
tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca 3060
tcccccttc gccagctggc gtaatagcga agaggccgc accgatcgcc cttcccaaca 3120
gttgccgagc ctgaatggcg aatggcgcct gatgcggtat tttctcctta cgcactctgt 3180

```

ES 2 536 198 T3

cggtatttca caccgcatat ggtgactct cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt 3240  
 aagccagccc cgacaccgc caacaccgc tgacgcgcc tgacgggctt gtctgctccc 3300  
 ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc agaggttttc 3360  
 accgtcatca ccgaaacgcg cgaggacgaa agggcctcgt gatacgccta tttttatagg 3420  
 ttaatgtcat gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc 3480  
 gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac 3540  
 aataaccctg ataatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt 3600  
 tccgtgtcgc cttattccc tttttgagg cattttgctt tcctgttttt gctcaccocag 3660  
 aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg 3720  
 aactggatct caacagcgt aagatccttg agagttttcg cccgaagaa cgttttccaa 3780  
 tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgatt gacgccgggc 3840  
 aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcaaatga cttggttgag tactcaccag 3900  
 tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa 3960  
 ccatgagtga taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc 4020  
 taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaacogg 4080  
 agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa 4140  
 caacgttgcg caaactatta actggcgaa tacttactct agcttccogg caacaattaa 4200  
 tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg 4260  
 gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggg atcattgcag 4320  
 cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg 4380  
 caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt 4440  
 ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttaaaa cttcattttt 4500  
 aatttaaaag gatctagggtg aagatccttt ttgataatct catgacaaa atccctaac 4560  
 gtgagttttc gttccactga gcgctcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag 4620  
 atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaaaaaaa aaaaccaccg ctaccagcgg 4680  
 tggtttggtt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggttaact ggcttcagca 4740  
 gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga 4800  
 actctgtagc accgcctaca tacctcgtc tgctaactct gttaccagtg gctgctgcca 4860  
 gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc 4920  
 agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca 4980  
 ccgaactgag atacctacag cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa 5040  
 .aggcggacag gtatccgta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc 5100

# ES 2 536 198 T3

cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcggggtt tcgccacctc tgacttgagc 5160  
gtcgaatTTTT gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg 5220  
cctttttacg gttcctggcc ttttgetggc cttttgetca catgttcttt cctgcgttat 5280  
cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cttttgagtg agctgatacc gctcgccgca 5340  
gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca 5400  
aacgcctct ccccgcgctg tggccgattc attaatgcag ctggcacgac aggtttcccg 5460  
actggaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagctcact cattaggcac 5520  
cccagcttt acactttatg cttccggctc gtatgttgtg tggaattgtg agcggataac 5580  
aatttcacac aggaaacagc tatgaccatg attacgaatt tcgtacgaag ctt 5633

<210> 10

<211> 4395

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 10

ES 2 536 198 T3

atgttcagct ttgtggacct cgggctcctg ctccctcttag cggccaccgc cctcctgacg	60
cacggccaag aggaaggcca agtcgagggc caagacgaag acatcccacc aatcacctgc	120
gtacagaacg gcctcaggta ccatgaccga gacgtgtgga aacccgagcc ctgccggatc	180
tgcgtctgcg acaacggcaa ggtgttgtgc gatgacgtga tctgtgacga gaccaagaac	240
tgccccggcg ccgaagtccc cgagggcgag tgctgtcccg tctgccccga cggctcagag	300
tcaccaccg accaagaaac caccggcgtc gagggacca agggagacac tggccccga	360
ggccaagg gacccgcagg cccccctggc cgagatggca tcctggaca gcctggactt	420
cccggacccc ccggaccccc cggacctccc ggacccccctg gcctcggagg aaactttgct	480
ccccagctgt cttatggcta tgatgagaaa tcaaccggag gaatttccgt gcctggcccc	540
atgggtccct ccggctcctcg tggctccct ggccccctg gtgcacctgg tccccaggc	600
ttccaaggtc cccctgggta gcctggcgag cctggagctt caggctccat gggctcccga	660
ggctccccag gtccccctgg aaagaatgga gatgatggg aagctggaaa acctggtcgt	720
cctggtgagc gtgggcctcc tgggcctcag ggtgcccag gattgcccgg aacagctggc	780
ctccctggaa tgaagggaca cagaggtttc agtggtttgg atggtgcaa gggagatgct	840
ggtcctgctg gtcctaaggg tgagcctggc agccctggtg aaaatggagc tcctggtcag	900
atgggcccc gtggcctgcc tggtgagaga ggtcgccctg gagccctgg cctgctggt	960
gctcgtggaa atgatggtgc tactggtgct gccgggcccc ctggctccac cggecccgt	1020
ggtcctcctg gcttccctgg tgctgttgg gctaagggtg aagctggtcc ccaagggcc	1080
cgaggctctg aaggccccca ggggtgtcgt ggtgagcctg gccccctgg cctgctggt	1140
gctgctggcc ctgctggaaa ccctggtgct gatggacagc ctggtgctaa aggtgccaat	1200

ES 2 536 198 T3

ggtgctcctg gtattgctgg tgctcctggc ttccctggtg cccgaggccc ctctggacce 1260  
 cagggccccc gcgccctcc tggccccag ggtaacagcg gagaacctgg tgctcctggc 1320  
 agcaaaggag aactggtgc taaggagag cctggccctg ttggtgttca aggacccct 1380  
 ggccctgctg gagaggaagg aaagcgagga gctcgaggtg aaccggacc cactggcctg 1440  
 cccggacccc ctggcgagcg tggtagacct ggtagccgtg gttccctgg cgagatggt 1500  
 gttgctggtc ccaaggtcc cgctggtgaa cgtggttctc ctggccctgc tggcccaaa 1560  
 ggatctcctg gtgaagctgg tcgtcccgtt gaagctggtc tgcctggtgc caagggtctg 1620  
 actggaagcc ctggcagccc tggctctgat ggcaaaactg gccccctgg tcccgcctg 1680  
 caagatggtc gccccgacc cccaggccca cctggtgccc gtggtcaggc tgggtgatg 1740  
 ggattccctg gacctaaagg tgctgctgga gagcccggca aggctggaga gcgaggtgt 1800  
 cccggacccc ctggcgctgt cggctctgct ggcaaatgat gagaggctgg agctcagga 1860  
 ccccctggcc ctgctggtcc cgctggcgag agaggtgaac aaggccctgc tggctcccc 1920  
 ggattccagg gtctccctgg tctgctggt cctccaggtg aagcaggcaa acctggtgaa 1980  
 cagggtgttc ctggagacct tggcgccct ggccctctg gagcaagagg cgagagaggt 2040  
 ttccctggcg agcgtggtgt gcaaggtccc cctggtcctg ctggtccccg aggggccaac 2100  
 ggtgctcccg gcaacgatgg tgctaagggt gatgctggtg cccctggagc tcccggtagc 2160  
 cagggcgccc ctggccttca gggaatgcct ggtgaacgtg gtgcagctgg tcttccaggg 2220  
 cctaagggtg acagaggtga tgctggtccc aaagtgctg atggctctcc tggcaaagat 2280  
 ggcgtccgtg gtctgaccgg cccattggt cctcctggcc ctgctggtgc cctggtgac 2340  
 aagggtgaaa gtggtcccag cggccctgct ggtcccactg gagctcgtgg tggccccgga 2400  
 gaccgtggtg agcctggtcc ccccgccct gctggctttg ctggcccccc tgggtctgac 2460  
 ggccaacctg gtgctaaagg cgaacctggt gatgctggtg ctaaaggcga tgctggtccc 2520  
 cctggccctg cggaccgcg tggacccct ggccccattg gtaatgttg tgctcctgga 2580  
 gccaaaggtg ctgcgagcag cgctggtccc cctggtgcta ctggttccc tgggtctgct 2640  
 ggccgagtcg gtctcctgg cccctctgga aatgctggac cccctggccc tctggtcct 2700  
 gctggcaaag aaggcgcaa aggtcccct ggtgagactg gccctgctgg acgtcctggt 2760  
 gaagttggtc cccctggtcc cctggccct gctggcgaga aaggatcccc tgggtctgat 2820  
 ggtcctgctg gtgctcctgg tactcccggg cctcaaggta ttgctggaca gcgtggtgtg 2880  
 gtcggcctgc ctggtcagag aggagagaga ggcttccctg gtcttctgg cccctctggt 2940  
 gaacctggca aacaaggtcc ctctggagca agtgggtgaa gtggtcccc tgggtccatg 3000  
 ggccccctg gattggtggt acccctggt gaatctggac gtgagggggc tctggtgcc 3060  
 gaaggttccc ctggacgaga cggttctcct ggcgccaagg gtgaccgtgg tgagaccggc 3120

ES 2 536 198 T3

cccgctggac cccctggtgc tcttgggtgct cctggtgccc ctggccccgt tggccctgct 3180  
 ggcaagagtg gtgatogtgg tgagactggt cctgctggtc ccgccggtcc tgtcggccct 3240  
 gttggcgccc gtggccccgc cggaccccaa ggccccctg gtgacaaggg tgagacaggc 3300  
 gaacagggcg acagaggcat aaagggcac cgtggcttct ctggcctcca gggteccccct 3360  
 ggccctcctg gctctcctgg tgaacaaggt cctctggag cctctggtcc tgetggtccc 3420  
 cgaggtcccc ctggctctgc tgggtctcct ggcaaagatg gactcaacgg tctccctggc 3480  
 cccattgggc cccctggtcc tcgcggtcgc actggtgatg ctggctctgt tggtecccc 3540  
 ggccctcctg gacctcctgg tccccctggt cctcccagcg ctggtttcga cttcagcttc 3600  
 ctgccccagc cacctcaaga gaaggctcac gatggtggcc gctactaccg ggctgatgat 3660  
 gccaatgtgg ttcgtgaccg tgacctcgag gtggacacca ccctcaagag cctgagccag 3720  
 cagatcgaga acatccggag cccagagggc agccgcaaga accccgcccg cacctgccgt 3780  
 gacctcaaga tgtgccactc tgactggaag agtggagagt actggattga ccccaaccaa 3840  
 gggtgcaacc tggatgccat caaagtcttc tgcaacatgg agactggtga gacctgcgtg 3900  
 taccctcctc agcccagtgt ggcccagaag aactggtaca tcagcaagaa cccaaggac 3960  
 aagaggcatg tctggttcgg cgagagcatg accgatggat tccagttcga gtatggcggc 4020  
 cagggctccg accctgccga tgtggccatc cagctgacct tctgcgctt gatgtccacc 4080  
 gaggcctccc agaacatcac ctaccactgc aagaacagcg tggcctacat ggaccagcag 4140  
 actggcaacc tcaagaaggc cctgctctc cagggctcca acgagatcga gatccgcgcc 4200  
 gagggcaaca gccgcttcac ctacagcgtc actgtcgatg gctgcacgag tcacaccgga 4260  
 gcctggggca agacagtgat tgaatacaaa accaccaaga cctcccgcct gcccatcatc 4320  
 gatgtggccc ccttggacgt tggtgcccca gaccaggaat tcggttcga cgttggccct 4380  
 gtctgcttcc tgtaa 4395

<210> 11

<211> 4101

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 11

ES 2 536 198 T3

atgetcagct ttgtggatac gggactttg ttgctgcttg cagtaacctt atgcctagca 60  
acatgccaat ctttacaaga ggaaactgta agaaagggcc cagccggaga tagaggacca 120  
cgtggagaaa ggggtccacc aggcccccca ggcagagatg gtgaagatgg tcccacaggc 180  
cctcctggtc cacctggtcc tctggcccc cctggtctcg gtgggaactt tgetgctcag 240  
tatgatggaa aaggagttgg acttggcctt ggaccaatgg gcttaatggg acctagaggc 300  
ccacctggtg cagctggagc cccaggcctt caaggtttcc aaggacctgc tggtgagcct 360  
ggtgaacctg gtcaaactgg tctgcaggt gctcgtggtc cagctggccc tctggcaag 420

ES 2 536 198 T3

gctggtgaag atggtcaccc tggaaaaccc ggacgacctg gtgagagagg agttgttga 480  
ccacaggtg ctctgggtt cctggaact cctggacttc ctggcttcaa aggcattagg 540  
ggacacaatg gtctggatgg actgaaggga cagcccgggtg ctctgggtgt gaagggtgaa 600  
cctggtgccc ctggtgaaaa tggaaactcca ggtcaaacag gagcccgtgg gcttcctggc 660  
gagagaggac gtggttgggtgc ccctggccca gctggtgccc gtggcagtga tggaaagtgtg 720  
ggtcccgtgg gtctctgctgg tcccattggg tctgctggcc ctccaggctt cccaggtgcc 780  
cctggcccca agggtgaaat tggagctgtt ggtaacgctg gtctctgctgg tcccggcgg 840  
ccccgtggtg aagtgggtct tccaggctc tccggccccg ttggacctcc tggtaatcct 900  
ggagcaaacg gccttactgg tgccaagggt gctgctggcc ttcccggcgt tgctggggct 960  
cccggcctcc ctggaacccg cgggtattcct ggccctgttg gtgctgcccgg tgctactggt 1020  
gccagaggac ttggttgggtga gcctggtcca gctggctcca aaggagagag cggtacaag 1080  
ggtgagcccg gctctgctgg gcccgaagg cctcctggtc ccagtgggtga agaaggaaag 1140  
agaggcccta atggggaagc tggatctgcc ggccctccag gacctcctgg gctgagaggt 1200  
agtctggtt ctctggcct tctggagct gatggcagag ctggcgtcat gggccctcct 1260  
ggtagtctgt gtgcaagtgg ccctgctgga gtccgaggac ctaatggaga tgctggtcgc 1320  
cctggggagc ctggtctcat gggaccaga ggtcttctg gttcccctgg aaatatcggc 1380  
cccgctgga aagaaggctc tgtcggcctc cctggcatcg acggcaggcc tggccaatt 1440  
ggccccgctg gagcaagagg agagcctggc aacattggat tccctggacc caaaggcccc 1500  
actggtgatc ctggcaaaaa cgggtataaa ggtcatgctg gtcttctggtg tgctcggggt 1560  
gtccaggtc ctgatgga aaatgggtgct cagggacctc ctggaccaca ggggttcaa 1620  
ggtggaag gtgaacagg tcccgtggt cctccaggct tccagggtct gcctggcccc 1680  
tcaggctccg ctggtgaagt tggcaacca ggagaaagg gcctccatgg tgagtgtggt 1740  
ctcctggtc ctgctggtcc aagaggggaa cgcggctccc caggtgagag tgggtgctgcc 1800  
ggtcctactg gtctattgg aagccgaggt ccttctggac cccagggcc tgatggaac 1860  
aagggatgaac ctggtgtggt tgggtgctgt ggcactgctg gtccatctgg tctagtgga 1920  
ctcccaggag agaggggtgc tgctggcata cctggaggca agggagaaaa gggatgaacct 1980  
ggtctcagag gtgaaattgg taacctggc agagatggtg ctctggtgct ccctggtgct 2040  
gtaggtgcc ctggtcctgc tggagccaca ggtgaccggg gogaagctgg ggctgctggt 2100  
cctgctggtc ctgctggtcc tgggggaagc cctggtgaac gtggtgaggt cggctcctgct 2160  
ggcccaatg gatctgctgg tctgctggt gctgctggtc aacctggtgc taaaggagaa 2220  
agaggagcca aagggcctaa gggatgaaaac ggtgttgttg gtcccacagg cccggttga 2280  
gctgctggcc cagctggtcc aaatggtccc cccggtcctg ctggaagctg tggatgga 2340

ES 2 536 198 T3

ggccccctg gtatgactgg tttccctggt gctgctggac ggaccggtcc cccaggacc 2400  
 tctggtattt ctggccctcc tggccccct ggtcctgctg ggaaagaagg gcttcgtggt 2460  
 cctcgtggtg accaaggtcc agttggccga actggagaag taggtgcagt tggccccct 2520  
 ggcttcgctg gtgagaaggg tccctctgga gaggctggta ctgctggacc tcctggcact 2580  
 ccaggtcctc agggctttct tgggtctcct ggtattctgg gtctccctgg ctcgagaggt 2640  
 gaacgtggtc taccaggtgt tgctggtgct gtgggtgaac ctggtcctct tggcattgcc 2700  
 ggccctcctg gggcccgctg tccctctggt gctgtgggta gtccctggagt caacggtgct 2760  
 cctggtgaag ctggtcgtga tggcaaccct gggaaacgat gtcccccagg tcgcatggt 2820  
 caaccggac acaagggaga gcgcggttac cctggcaata ttggtcccg tgggtctgca 2880  
 ggtgcacctg gtcctcatgg ccccggtgggt cctgctggca aacatggaaa ccgtggtgaa 2940  
 actggtccct ctggtcctgt tggctctgct ggtgctggtg gcccaagagg tcctagtggc 3000  
 ccacaaggca ttcgtggcga taaggagag ccoggtgaaa aggggccag aggtcttct 3060  
 ggcttaaagg gacacaatgg attgcaaggt ctgcctggta tcgctggtca ccatggtgat 3120  
 caaggtgctc ctggctcctg ggtcctgct ggtcctaggg gccctgctgg tccttctggc 3180  
 cctgctggaa aagatggtcg cactggacat cctggtacag ttggacctgc tggcattcga 3240  
 ggccctcagg gccaccaagg cctgctggc cccctggct cccctggccc tcctggacct 3300  
 ccaggtgtaa gcggtggtg ttatgacttt ggttacgatg gagacttcta cagggtgac 3360  
 cagcctcgtc cagcaccttc tctcagaccc 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 tccgggcca acctgaaaac atcccagcca agaactggta taggagctcc 3660  
 aaggacaaga aacacgtctg gctaggagaa actatcaatg ctggcagcca gtttgaatat 3720  
 aatgtagaag gagtgacttc caaggaaatg gctacceaac ttgccttcat gcgctgctg 3780  
 gccaaactatg cctctcagaa catcacctac cactgcaaga acagcattgc atacatggat 3840  
 gaggagactg gcaacctgaa aaaggctgct attctacagg gctctaatga tgttgaactt 3900  
 gttgctgagg gcaacagcag gttcacttac actgttcttg tagatggctg ctctaaaaag 3960  
 acaaatgaat ggggaaagac aatcattgaa taaaaaaa ataagccatc acgcctgcc 4020  
 ttccttgata ttgcacctt ggacatcggg ggtgctgacc aggaattctt tgtggacatt 4080  
 ggcccagtct gtttcaata a 4101

<210> 12

<211> 4257

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 12

ES 2 536 198 T3

atgattcgcc tgggtgctcc ccagtegetg gtgctgctga cgctgctcgt cgccgctgtc 60  
 cttcgggtgtc agggccagga tgtccggcaa ccaggaccaa agggacagaa aggagAACCT 120  
 ggagacatca aggatattgt aggacccaaa ggacctcctg ggccctcaggg acctgcaggg 180  
 gaacaaggac ccagagggga tcgtggtgac aaaggtgaaa aaggtgcccc tggacctcgt 240  
 ggagagatg gagaacctgg gaccctgga aatcctggcc cccctgggcc tcccggcccc 300  
 cctgggtcccc ctggtcttgg tggaaacttt gctgcccaga tggctggagg atttgatgaa 360  
 aaggctggtg gcgcccagtt gggagtaatg caaggaccaa tgggccccat gggacctcga 420  
 ggacctccag gcctgcagg tgctcctggg cctcaaggat ttcaaggcaa tctggtgaa 480  
 cctgggtgaa ctggtgtctc tgggtccatg ggtccccgtg gtctcctgg tccccctgga 540  
 aagcctggtg atgatggtga agctggaaaa cctggaaaag ctggtgaaag gggctcgcct 600  
 ggtcctcagg gtgctcgtgg tttcccagga acccaggcc ttctggtgt caaaggcac 660  
 agaggttatc caggcctgga cgggtgctaag ggagaggcgg gtgctcctgg tgtgaagggt 720  
 gagagtggtt ccccggtgga gaacggatct cggggcccaa tgggtcctcg tggcctgcct 780  
 ggtgaaagag gacggaactg cctgctggc gctgcgggtg cccgaggcaa cgatggtcag 840  
 ccaggccccg cagggcctcc gggctcctgtc ggtcctgctg gtggctcctg cttccctggt 900  
 gctcctggag ccaagggtga agccggcccc actggtgcc gtggctcctga aggtgctcaa 960  
 ggtcctcgcg gtgaacctgg tactcctggg tcccctgggc ctgctggtgc ctccggtaac 1020  
 cctggaacag atggaattcc tggagccaaa ggatctgctg gtgctcctgg cattgctggt 1080  
 gctcctggct tcctggggc acggggccct cctggccctc aaggtgcaac tggctcctg 1140  
 ggccccaaa gtcagacggg tgaacctggt attgctggt tcaaagggtg acaaggcccc 1200  
 aagggagaac ctggccctgc tggccccag ggagcccctg gaccgctgg tgaagaaggc 1260  
 aagagagggtg cccgtggaga gcctggtggc gttgggcca tcgggtcccc tggagaaaga 1320  
 ggtgctcccc gcaaccgctg tttcccaggt caagatggtc tggcaggctc caaggagcc 1380  
 cctggagagc gagggcccag tggctctgct ggccccagg gagccaacgg tgacctggc 1440  
 cgtcctggag aacctggcct tcctggagcc cggggtctca ctggccgccc tggatgatgt 1500  
 ggtcctcaag gcaaagtgg cccttctgga gccctggtg aagatggtc tcctggacct 1560  
 ccaggctctc agggggctcg tgggcagcct ggtgtcatg gtttccctg ccccaaagg 1620  
 gccaacggtg agcctggcaa agctggtgag aaggactgc ctggtgctcc tggctgagg 1680  
 ggtcttctg gcaaagatgg tgagacaggt gctgcaggac cccctggccc tgctggacct 1740  
 gctggtgaa gaggcgagca ggggtctcct gggccatctg ggttccagg acttctggc 1800  
 cctcctggtc cccaggtga aggtggaaaa ccaggtgacc aggtgttcc cggatgaagt 1860

ES 2 536 198 T3

ggagcccctg gcctcgtggg tcccaggggt gaacgaggtt tcccaggtga acgtggctct 1920  
 cccggtgccc agggcctcca gggccccctg ggctccccg gcactcctgg cactgatggt 1980  
 cccaaagtg catctggccc agcaggcccc cctggggctc agggccctcc aggtcttcag 2040  
 ggaatgcctg gcgagagggg agcagctggt atcgctgggc ccaaagtgga caggggtgac 2100  
 gttggtgaga aaggccctga gggagcccct gaaaggatg gtggacgagg cctgacaggt 2160  
 cccattggcc cccctggccc agctggtgct aacggcgaga agggagaagt tggacctcct 2220  
 ggtcctgcag gaagtgctgg tgctcgtggc gctccgggtg aacgtggaga gactgggccc 2280  
 cccggaccag cgggatttgc tgggcctcct ggtgctgatg gccagcctgg ggccaaggtt 2340  
 gagcaaggag aggccggcca gaaaggcgat gctggtgccc ctggtcctca gggcccctct 2400  
 ggagcacctg ggctcaggg tcctactgga gtgactggtc ctaaaggagc ccgaggtgcc 2460  
 caaggcccc cgggagccac tggattcctt ggagctgctg gccgcgttgg acccccaggc 2520  
 tccaatggca accctggacc cctggtccc cctggtcctt ctggaaaaga tggccccaaa 2580  
 ggtgctcgag gagacagcgg cccccctggc cgagctggtg aaccggcctt ccaaggtcct 2640  
 gctggacccc ctggcgagaa gggagagcct ggagatgacg gtcctctggt tgccgaaggt 2700  
 ccaccaggtc cccagggctt ggctggtcag agaggcatcg tcggtctgcc tgggcaacgt 2760  
 ggtgagagag gattccttgg cttgctggc ccgtcgggtg agcccggcaa gcaggggtgct 2820  
 cctggagcat ctggagacag aggtcctcct ggccccgtgg gtcctcctgg octgacgggt 2880  
 cctgcaggtg aacctggacg agagggaaagc cccggtgctg atggcccccc tggcagagat 2940  
 ggcgctgctg gagtcaaggg tgatcgtggt gagactggtg ctgtgggagc tcctggagcc 3000  
 cctgggcccc ctggctcccc tggccccgct ggtccaactg gcaagcaagg agacagagga 3060  
 gaagctggtg cacaaggccc catgggacct tcaggaccag ctggagcccg gggaatccag 3120  
 ggtcctcaag gccccagagg tgacaaagga gaggtgag agcctggcga gagaggcctg 3180  
 aaggacacc gtggcttcac tggctcgcag ggtctgccc gccctcctgg tccttctgga 3240  
 gaccaaggtg cttctggtcc tgctggtcct tctggcccta gaggtcctcc tggccccgtc 3300  
 ggtcctctg gcaaagatgg tgctaagga atccctggcc ccattgggccc tcctggtccc 3360  
 cgtggacgat caggcgaaac cggccctgct ggtcctcctg gaaatcctgg accccctggt 3420  
 cctccaggtc cccctggccc tggcatcgac atgtccgctt ttgetggctt aggccccgaga 3480  
 gagaagggcc ccgaccccct gcagtacatg cgggcccagc aggcagcccg tggcctgaga 3540  
 cagcatgacg ccgaggtgga tgccacactc aagtccctca acaaccagat tgagagcatc 3600  
 cgcagccccg agggctcccc caagaaccct gctcgcacct gcagagacct gaaactctgc 3660  
 caccctgagt ggaagagtgg agactactgg attgacccca accaaggtg caccttgac 3720  
 gccatgaagg ttttctgcaa catggagact ggcgagactt gcgtctacct caatccagca 3780

# ES 2 536 198 T3

aacgttccca agaagaactg gtggagcagc aagagcaagg agaagaaaca catctggttt 3840  
ggagaaacca tcaatggtgg cttccatttc agctatggag atgacaatct ggctcccaac 3900  
actgccaacg tccagatgac cttcctacgc ctgctgtcca cggaaggctc ccagaacatc 3960  
acctaccact gcaagaacag cattgcctat ctggacgaag cagctggcaa cctcaagaag 4020  
gccctgctca tccagggctc caatgacgtg gagatccggg cagagggcaa tagcaggttc 4080  
acgtacactg ccctgaagga tggctgcacg aaacataccg gtaagtgggg caagactggt 4140  
atcgagtacc ggtcacagaa gacctcacgc ctccccatca ttgacattgc acctatggac 4200  
ataggagggc ccgagcagga attcgggtgtg gacatagggc cggctctgctt cttgtaa 4257

<210> 13

<211> 4401

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 13

ES 2 536 198 T3

atgatgagct ttgtgcaaaa ggggagctgg ctacttctcg ctctgcttca tcccactatt 60  
 attttggcac aacaggaagc tgttgaagga ggatgttccc atcttgggtca gtcttatgcg 120  
 gatagagatg tctggaagcc agaaccatgc caaatatgtg tctgtgactc aggatccggt 180  
 ctctgcatg acataatatg tgacgatcaa gaattagact gcccacaacc agaaattcca 240  
 tttggagaat gttgtgcagt ttgccacag cctccaactg ctctactcg cctcctaact 300  
 ggtcaaggac ctcaaggccc caagggagat ccaggccctc ctggtattcc tgggagaaat 360  
 ggtgaccctg gtattccagg acaaccaggg tcccctggtt ctctggccc cctggaatc 420  
 tgtgaatcat gccctactgg tcctcagaac tattctcccc agtatgattc atatgatgtc 480  
 aagtctggag tagcagtagg aggactcgca ggctatcctg gaccagctgg cccccaggc 540  
 cctcccgtc ccctggtac atctggtcat cctggttccc ctggatctcc aggataccaa 600  
 ggaccccctg gtgaacctgg gcaagctggt ccttcaggcc ctccaggacc tctggtgct 660  
 ataggtccat ctggtcctgc tggaaaagat ggagaatcag gtagaccgag acgacctgga 720  
 gagcgaggat tgcttgacc tcaggtatc aaaggtccag ctgggatacc tggattccct 780  
 ggtatgaaag gacacagagg ctctgatgga cgaaatggag aaaaggggga aacaggtgct 840  
 cctggattaa aggggtgaaaa tggctctcca ggcgaaaatg gagctcctgg acccatgggt 900  
 ccaagagggg ctctggtga gcgaggacgg ccaggacttc ctggggctgc aggtgctcgg 960  
 ggtaatgacg gtgctcgagg cagtgatggt caaccaggcc ctctggtcc tctggaact 1020  
 gccggattcc ctggatcccc tggtgccaag ggtgaagttg gacctgcagg gtctcctggt 1080  
 tcaaagtgtg ccctggaca aagaggagaa cctggacctc agggacaagc tgggtgctcaa 1140  
 ggtcctcctg gccctcctgg gattaatggt agtctggtg gtaaaggoga aatgggtccc 1200  
 gctggcattc ctggagctcc tggactgatg ggagcccggg gtctccagg accagccggt 1260

ES 2 536 198 T3

gctaattggtg ctcttgact gcgaggtggt gcaggtgagc ctggtaagaa tggtgccaaa 1320  
ggagagcccg gaccacgtgg tgaacgcggt gaggtggca ttccaggtgt tccaggagct 1380  
aaaggcgaag atggcaagga tggatcacct ggagaacctg gtgcaaatgg gcttccagga 1440  
gctgcaggag aaaggggtgc ccctgggttc cgaggacctg ctggaccaa tggcatccca 1500  
ggagaaaagg gtctgtctgg agagcgtggt gctccaggcc ctgcagggcc cagaggagct 1560  
gctggagaac ctggcagaga tggcgtccct ggaggtccag gaatgagggg catgcccgga 1620  
agtccaggag gaccaggaag tgatgggaaa ccagggcctc ccggaagtca aggagaaagt 1680  
ggtcgaccag gtcctcctgg gccatctggt ccccgaggtc agcctggtgt catgggcttc 1740  
cccgcccta aagaaatga tgggtctcct ggtaagaatg gagaacgagg tggcctgga 1800  
ggacctggcc ctgaggtcc tcctggaaag aatggtgaaa ctggacctca gggacccca 1860  
gggcctactg ggcctggtgg tgacaaagga gacacaggac ccctggtcc acaaggatta 1920  
caaggcttgc ctggtacagg tggctctcca ggagaaaatg gaaaacctgg ggaaccaggt 1980  
ccaaagggtg atgccggtgc acctggagct ccaggaggca agggtgatgc tggtgcccct 2040  
ggtgaaactg gacctcctgg attggcaggg gcccaggac ttagaggtgg agctggtccc 2100  
cctggtcccg aaggaggaaa ggtgctgct ggtcctcctg ggccacctgg tgctgctggt 2160  
actcctggtc tgcaaggaat gcctggagaa agaggaggtc ttggaagtcc tggtcctaaag 2220  
ggtgacaagg gtgaaccagg cgtccaggt gctgatggtg tcccaggaa agacggccca 2280  
aggggtccta ctggtcctat tggctcctc ggcccagctg gccagcctgg agataagggt 2340  
gaagggtggtg cccccgact tccaggtata gctggacctc tggtagccc tggtgagaga 2400  
ggtgaaactg gccctccagg acctgctggt ttccctggtg ctctggaca gaatggtgaa 2460  
cctggtggtg aaggagaaa aggggtccg ggtgagaaa gtgaaggagg ccctcctgga 2520  
gttcaggac ccctggagg ttctggacct gctggtcctc ctggccccca aggtgtcaaa 2580  
ggtgaaactg gcagctcctgg tggacctggt gctgctggct tcctggtgc tctggtctt 2640  
cctggtcctc ctggtagtaa tggtaaccca ggacccccag gtcccagcgg ttctccaggc 2700  
aaggatgggc cccaggtcc tgccggtaac actggtgctc ctggcagccc tggagtgtct 2760  
ggacaaaag gtgatgctgg ccaaccagga gagaagggat cgctggtgc ccagggccca 2820  
ccaggagctc caggcccact tgggattgct gggatcactg gacacgggg tcttgagga 2880  
ccaccaggca tgccaggtcc taggggaagc cctggcccc agggtgtcaa gggtgaaagt 2940  
gggaaaccag gagctaacgg tctcagtgga gaactggtc ccctggacc ccaggtctt 3000  
cctggtctgg ctggtacagc tgggaaacct ggaagagatg gaaacctgg atcagatggt 3060  
cttcaggctc gagatggatc tcctggtggc aagggtgatc gtggtgaaaa tggctctcct 3120  
ggtgcccctg gcgctcctgg tcatccgggc ccacctggtc ctgtcgttcc agctggaaag 3180

ES 2 536 198 T3

agtgggtgaca gaggagaaag tggccctgct ggccctgctg gtgctcccgg tcctgctggt 3240  
 tcccgaggtg ctctggtcc tcaaggcca cgtggtgaca aaggtgaaac aggtgaacgt 3300  
 ggagctgctg gcatcaaagg acatcgagga ttccctggta atccaggtgc cccaggttct 3360  
 ccaggccctg ctggtcagca ggggtgcaatc ggcagtccag gacctgcagg ccccagagga 3420  
 cctgttgac ccagtggacc tcttgcaaaa gatggaacca gtggacatcc aggtcccatt 3480  
 ggaccaccag ggccctgagg taacagaggt gaaagaggat ctgagggctc cccaggccac 3540  
 ccagggcaac caggccctcc tggacctcct ggtgcccctg gtccttgctg tggtggtgtt 3600  
 ggagccgctg ccattgctgg gattggaggt gaaaaagctg gcggttttgc cccgtattat 3660  
 ggagatgaac caatggattt caaaatcaac accgatgaga ttatgacttc actcaagtct 3720  
 gttaatggac aaatagaaag cctcattagt cctgatggtt ctcgtaaaaa ccccgctaga 3780  
 aactgcagag acctgaaatt ctgccatcct gaactcaaga gtggagaata ctggggtgac 3840  
 cctaaccaag gatgcaaatt ggatgctatc aaggtattct gtaatatgga aactggggaa 3900  
 acatgcataa gtgccaatcc tttgaatggt ccacggaaac actggtggac agattctagt 3960  
 gctgagaaga aacacgtttg gtttgagag tccatggatg gtggttttca gtttagctac 4020  
 ggcaatcctg aacttctga agatgtcctt gatgtgcagc tggcattcct tcgacttctc 4080  
 tccagccgag ctcccagaa catcacatat cactgcaaaa atagcattgc atacatggat 4140  
 caggccagtg gaaatgtaa gaagccctg aagctgatgg ggtcaaatga aggtgaattc 4200  
 aaggctgaag gaaatagcaa attcacctac acagttctgg aggatggttg cacgaaacac 4260  
 actggggaat ggagcaaac agtctttgaa tatcgaacac gcaaggctgt gagactacct 4320  
 attgtagata ttgcacccta tgacattggt ggtcctgatc aagaatttg tgtggacgtt 4380  
 ggccctgttt gctttttata a 4401

<210> 14

<211> 5848

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada artificialmente

<400> 14

# ES 2 536 198 T3

cgatgtacgg gccagatata cgcggtgaca ttgattattg actagttatt aatagtaac	60
aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcggtacat aacttacggt	120
aaatggcccg cctggctgac cgcccacga cccccgcca ttgacgtcaa taatgacgta	180
tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg	240
gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga	300
pgtcaatgac ggtaaattggc ccgctggca ttatgccag tacatgacct tatgggactt	360

ES 2 536 198 T3

tectacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatggtga tgcggttttg 420  
gcagtacatc aatgggcgtg gatagcgggt tgactcacgg ggatttccaa gtctccaccc 480  
cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg 540  
taacaactcc gccccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacgggtggg aggtctatat 600  
aagcagagct ctctggctaa ctagagaacc cactgttaac tggcttatcg aaattgtcga 660  
ggagaacttc aggggtgagtt tggggaccct tgattgttct ttctttttcg ctattgtaaa 720  
attcatgtta tatggagggg gcaaagtttt caggggtgtg tttagaatgg gaagatgtcc 780  
cttgtatcac catggaccct catgataatt ttgtttcttt cactttctac tctgttgaca 840  
accattgtct cctcttattt tcttttcatt ttctgtaact ttttcgtaa actttagctt 900  
gcatttgtaa cgaattttta aattcacttt tgtttatttg tcagattgta agtactttct 960  
ctaactactt ttttttcaag gcaatcaggg tatattatat tgtacttcag cacagtttta 1020  
gagaacaatt gttataatta aatgataagg tagaatattt ctgcatataa attctggctg 1080  
gogtggaaat attcttattg gtagaaacaa ctacatcctg gtcacatcc tgcctttctc 1140  
tttatggta caatgatata cactgtttga gatgaggata aaatactctg agtccaaacc 1200  
gggcccctct gctaaccatg ttcatgcctt cttctttttc ctacagctcc tgggcaacgt 1260  
gctggcggcc gccttctaga gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt 1320  
gcccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg aagggtgccac tcccactgtc ctttctaata 1380  
aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg 1440  
tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggaggatc 1500  
tccgcggtgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt ccccaggctc cccagcaggc 1560  
agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca tagtcccgcc ctaactccg 1620  
cccatccgc ccctaactcc gccagttcc gccattctc cgcccatgg ctgactaatt 1680  
ttttttattt atgcagaggc cgaggccgcc tggcctctg agctattcca gaagtagtga 1740  
ggaggctttt ttggaggcct aggcttttgc aaaaaagctg cagatggtac gaccattaaa 1800  
ttgtattgta gcagtatcac aaaatatggg tattggtaaa aatggtgatt taccatggcc 1860  
accattacga aatgaattta aatattttca acgaatgact actacttcat cagtagaagg 1920  
taaacaaaat ttagtaatta tgggtcgaaa aacttggttt tcaattcctg agaagaatcg 1980  
acctttaaag gacagaatta atatagttct cagtagagaa ctcaaagaac caccacgagg 2040  
agctcatttt cttgccaaaa gtttgatga tgccttaaga ctattgaac aaccggaatt 2100  
ggcaagtaaa gtagacatgg tttggatagt cggaggcagt tctgtttacc aggaagccat 2160  
gaatcaacca ggccacctca gactctttgt gacaaggatc atgcaggaat ttgaaagtga 2220  
cacgtttttc ccagaaattg atttggggaa atataaactt ctcccagaat acccaggcgt 2280

ES 2 536 198 T3

cctctctgag gtccaggagg aaaaaggcat caagtataag tttgaagtct acgagaagaa 2340  
agactaaaga tccgtgacat aattggacaa actacctaca gagatttaa gctctaaggt 2400  
aaatataaaa tttttaagtg tataatgtgt taaactactg attctaattg tttgtgtatt 2460  
ttagattcca acctatggaa ctgatgaatg ggagcagtgg tggaatgcct ttaatgagga 2520  
aaacctgttt tgctcagaag aaatgccatc tagtgatgat gaggctactg ctgactctca 2580  
acattctact cctccaaaaa agaagagaaa ggtagaagac cccaaggact ttccttcaga 2640  
attgctaagt tttttgagtc atgctgtggt tagtaataga actcttgctt gctttgctat 2700  
ttacaccaca aaggaaaaag ctgcactgct atacaagaaa attatggaaa aatattctgt 2760  
aacctttata agtaggcata acagttataa tcataacata ctgttttttc ttactccaca 2820  
caggcataga gtgtctgcta ttaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagcttttt 2880  
aatttgtaaa ggggttaata aggaatattt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa 2940  
tcagccatac cacatthgta gaggttttac ttgctttaa aaacctcca cacctcccc 3000  
tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg ttgttgtaa cttgtttatt gcagcttata 3060  
atggttacia ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttactgc 3120  
attctagttg tggthtgcc aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg gcccatcgat 3180  
gaattcaacg tacgtagctt ggcactggcc gtcgthttac aacgtcgtga ctgggaaaac 3240  
cctggcgtha cccaacthaa tgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat 3300  
agcgaagagg cccgcaccga tgccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg 3360  
cgctgatgc ggtatthtct ccttacgcat ctgtgcgtha tttcacaccg catatggtgc 3420  
actctcagta caatctgctc tgatgcccga tagttaagcc agccccgaca cccgccaaca 3480  
cccgtgacg cgcctgacg ggcttgctc ctcgccgcat ccgcttacag acaagctgtg 3540  
accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg ttttcaccgt catcaccgaa acgcgcgagg 3600  
acgaaagggc ctctgatac gcctatthtt ataggttaat gtcatgataa taatgthttc 3660  
ttagacgtha ggtggcactt ttcgggghaa tgtgcggha accctatth gthttatthtt 3720  
ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa cctgataaa tgcttcaata 3780  
atattghaaa aggaagagtha tgagtattca acatthccgt gtcgccctta ttcctthttt 3840  
tgccgcatth tgcttctctg tthttgctca cccaghaacg ctggtghaaag taaaagatgc 3900  
tghaatcag ttgggtgcac gagtgggtha catcghaactg gatctcaaca gcgghaatg 3960  
ccttgagagt tthtcctccg aghaacgtht tccaatgatg agcactthta aagthtctgct 4020  
atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cggghaagag caactcggtc gccgcataca 4080  
ctattctcag aatgactthg ttgagthctc accagthca ghaaagcath ttacgghatg 4140  
catgacagtha agghaattht gcagthctgc cataaccath agthghaaca ctgcgghcaa 4200

ES 2 536 198 T3

cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg 4260  
 ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga 4320  
 cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg 4380  
 cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt 4440  
 tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg 4500  
 agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagcctc 4560  
 ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca 4620  
 gatcgtgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc 4680  
 atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat 4740  
 cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttctgtcc actgagcgtc 4800  
 agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc gcgtaatctg 4860  
 ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggtt tgtttgccgg atcaagagct 4920  
 accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct 4980  
 tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct 5040  
 cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg 5100  
 gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cggggggttc 5160  
 gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga 5220  
 gcattgagaa agcgcacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaaagcg 5280  
 cagggctcga acaggagagc gcacgagga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta 5340  
 tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtoga tttttgtgat gctcgtcagg 5400  
 ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg 5460  
 ctggcctttt gctcacatgt tctttctgc gttatccct gattctgtgg ataaccgtat 5520  
 taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc 5580  
 agtgagcgag gaagcggag agcgcaccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttgccc 5640  
 gattcattaa tgcagctggc acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgsaa 5700  
 cgcaattaat gtgagttagc tcaactatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc 5760  
 ggctcgtatg ttgtgtgaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga 5820  
 ccatgattac gaatttcgta cgaagctt 5848

ES 2 536 198 T3

<211> 698

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada artificialmente

<400> 15

```

ggccgccacc atgctgctct tcctcctctc tgcaactggtc ctgctcacac agcccctggg      60
ctacctggaa gcagaaatga agacctactc ccacagaaca atgcccagtg cttgcaccct      120
ggtcatgtgt agctcagtg agtccggaaa ggctggagag cgagggtgtc ccggaccccc      180
tggcgctgtc ggtcctgctg gcaaagatgg agaggctgga gctcagggac cccctggccc      240
tgctggtccc gctggcgaga gaggtgaaca aggccctgct ggctcccccg gattccaggg      300
tctccctggt cctgctggtc ctccaggtga agcaggcaaa cctggtgaac aggggtgttc      360
tggagacctt ggcgcccctg gccctctgag agcaagaggc gagagaggtt tccctggcga      420
gcgtggtgtg caaggcccc ctggtcctgc tgggtccccga ggggccaacg gtgctcccgg      480
caacgatggt gctaagggtg atgctggtgc ccctggagct cccggtagcc agggcgcccc      540
tggccttcag ggaatgcctg gtgaacgtgg tgcagctggt cttccagggc ctaagggtga      600
cagaggtgat gctggtccca aaggtgctga tggctctcct ggcaaagatg gcgtccgtgg      660
tctgaccggc cccattcacc accaccacca ccactagt      698
    
```

**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína recombinante que tiene una estructura de hélice triple, que comprende una proteína codificada por un polinucleótido que comprende (i) a (v) a continuación en orden desde el terminal amino:
- (i) un gen de dominio de péptido de señalización de colectina humana;
- 5 (ii) un gen de dominio rico en cisteína de colectina humana;
- (iii) un gen de dominio de colágeno de colágeno humano;
  - (iv) un gen de dominio de cuello de colectina humana; y
  - (v) un gen de dominio de reconocimiento de carbohidratos de colectina humana.
- 10 2. La proteína recombinante que tiene una estructura de hélice triple de la reivindicación 1, en donde el gen del dominio de péptido de señalización de la colectina humana es un gen de dominio de péptido de señalización de una proteína D surfactante humana (SP-D) y es un polinucleótido que consiste de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4.
- 15 3. La proteína recombinante que tiene una estructura de hélice triple de la reivindicación 1, en donde el gen del dominio rico en cisteína de colectina humana es un gen de dominio rico en cisteína de proteína D surfactante humana (SP-D) y es un polinucleótido que consiste de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5.
4. La proteína recombinante que tiene una estructura de hélice triple de la reivindicación 1, en donde el gen de dominio de cuello de la colectina humana es un gen de dominio de cuello de lectina de enlazamiento al manano humana (MBL) y es un polinucleótido que consiste de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6.
- 20 5. La proteína recombinante que tiene una estructura de hélice triple de la reivindicación 1, en donde el gen de dominio de reconocimiento de carbohidratos de la colectina humana es un gen de dominio reconocimiento de carbohidratos de la lectina de enlazamiento a manano humana (MBL) y es un polinucleótido que consiste de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7.
6. La proteína recombinante que tiene una estructura de hélice triple de la reivindicación 1, en donde el gen de dominio de colágeno humano
- 25 i) comprende al menos uno o más tipos de genes de dominio de colágeno de colágenos humanos de cadena  $\alpha$  o
- ii) es un gen de dominio de colágeno de un colágeno tipo I humano que consiste de un colágeno humano de cadena  $\alpha$ .
- 30 7. La proteína recombinante que tiene una estructura de hélice triple de la reivindicación 6, en donde el gen de dominio del colágeno de un colágeno humano de cadena  $\alpha$  es un polinucleótido que consiste de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8.
8. La proteína recombinante que tiene una estructura de hélice triple de la reivindicación 1, que comprende una proteína que consiste de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
9. La proteína recombinante que tiene una estructura de hélice triple de la reivindicación 1, en donde el polinucleótido es un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3.
- 35 10. Un método para producir una proteína que tiene una estructura de hélice triple, en donde el método comprende las etapas de:
- (a) introducir un vector en un polinucleótido que comprende de (i) a (v) a continuación en orden desde el terminal amino:
    - (i) un gen de dominio de péptido de señalización de colectina humana;
- 40 (ii) un gen de dominio rico en cisteína de colectina humana;
- (iii) un gen de dominio de colágeno de colágeno humano;
  - (iv) un gen de dominio de cuello de colectina humana; y
  - (v) un gen de dominio de reconocimiento de carbohidratos de colectina humana;

(b) transformar una célula anfitriona por introducción genética utilizando el vector; y

(c) cultivar o hacer crecer el transformante, y recolectar una proteína que tiene una estructura de hélice triple a partir de la célula o de su sobrenadante de cultivo.

- 5 11. El método de la reivindicación 10, en donde el gen de dominio de péptido de señalización de colectina humana es un gen de dominio de péptido de señalización de proteína D surfactante humana (SP-D) y es un polinucleótido consistente de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4.
12. El método de la reivindicación 10, en donde el gen de dominio rico en cisteína de colectina humana es un gen de dominio rico en cisteína de proteína D surfactante humana (SP-D) y es un polinucleótido que consiste de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5.
- 10 13. El método de la reivindicación 10, en donde el gen de dominio de cuello de la colectina humana es un gen de dominio de cuello de la lectina de enlazamiento a manano humana (MBL) y es un polinucleótido que consiste de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6.
14. El método de la reivindicación 10, en donde el gen de dominio de reconocimiento de carbohidratos de la colectina humana es un gen de dominio de reconocimiento de carbohidratos de la lectina de enlazamiento a manano humana (MBL) y es un polinucleótido que consiste de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7.
- 15 15. El método de la reivindicación 10, en donde el gen de dominio de colágeno de colágeno humano
- i) comprende al menos uno o más tipos de genes de dominio de colágeno de colágenos humanos de cadena  $\alpha$  o
- ii) es un gen de dominio de colágeno de colágeno tipo I humano que consiste de un colágeno humano de cadena  $\alpha$ .
- 20 16. El método de la reivindicación 15, en donde el gen de dominio de colágeno de un colágeno humano de cadena  $\alpha$  es un polinucleótido que consiste de nucleótidos de SEQ ID NO: 8.
17. El método de la reivindicación 10, en donde el vector usado en la etapa (a) es pNC1 de SEQ ID NO: 2 o pDC6/CF de SEQ ID NO: 9.

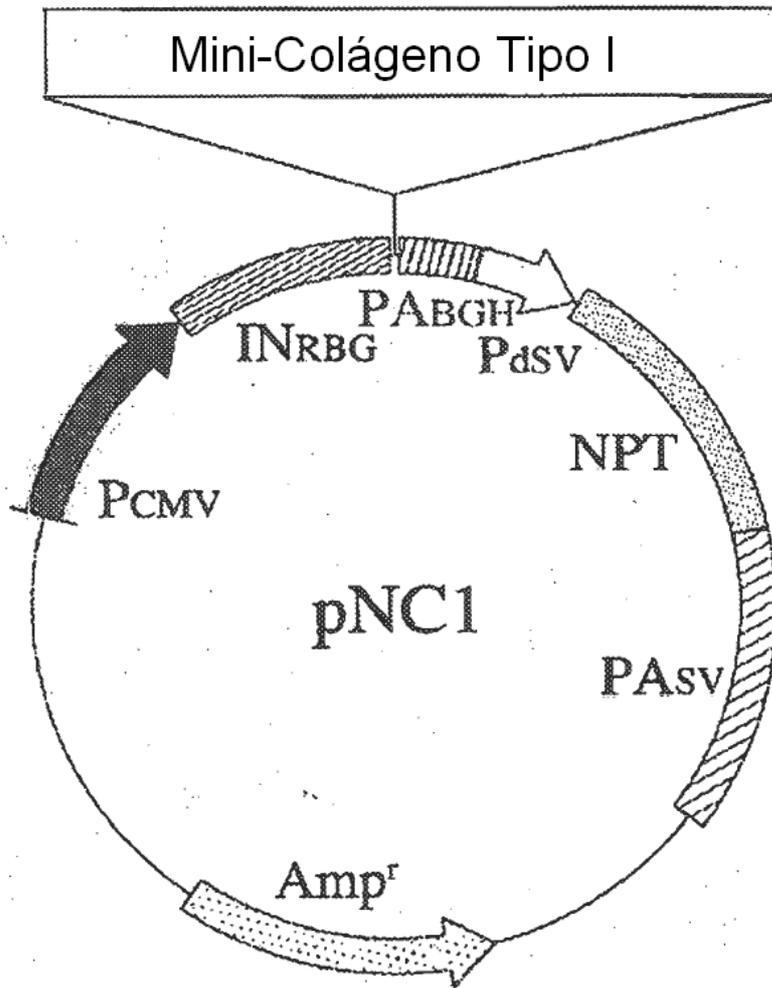


FIG. 1

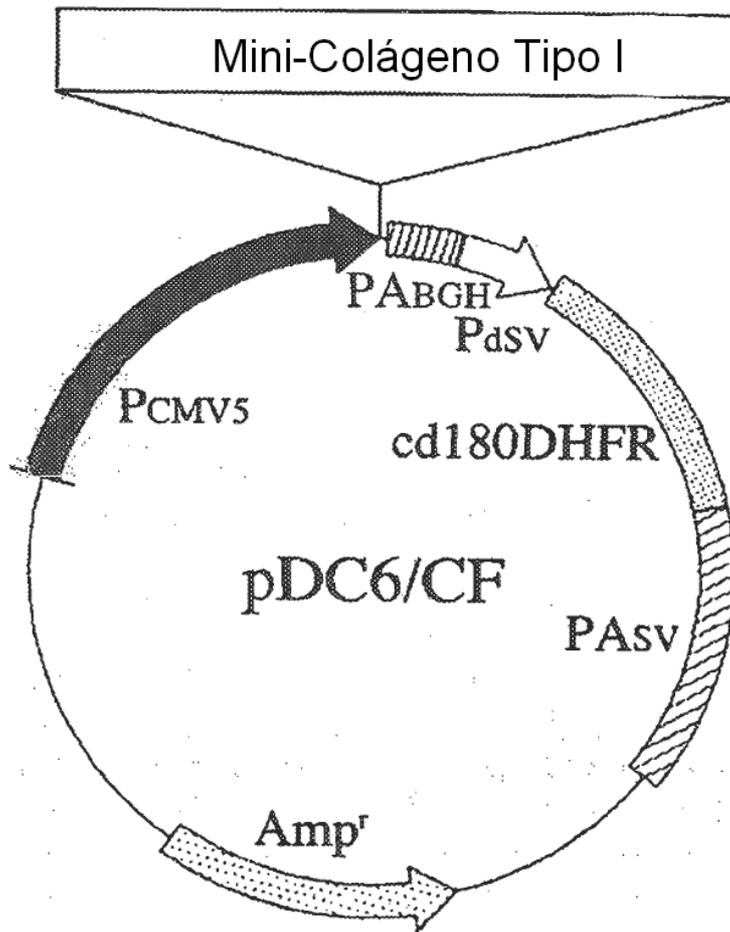


FIG. 2

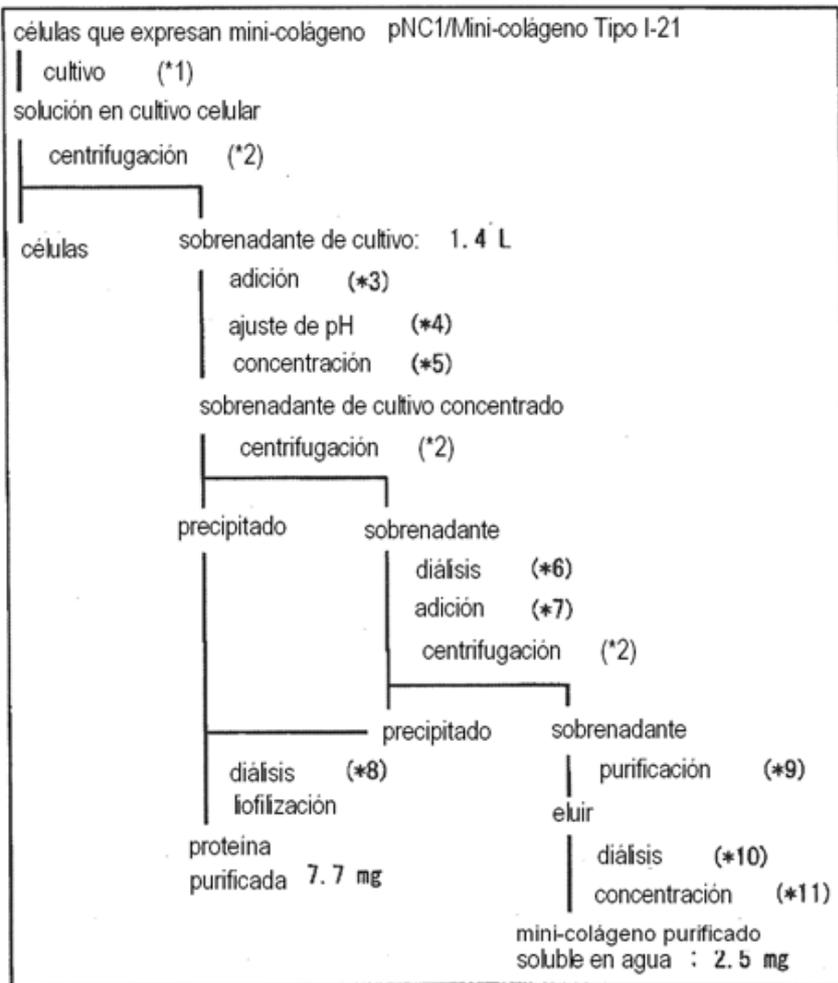


FIG. 3

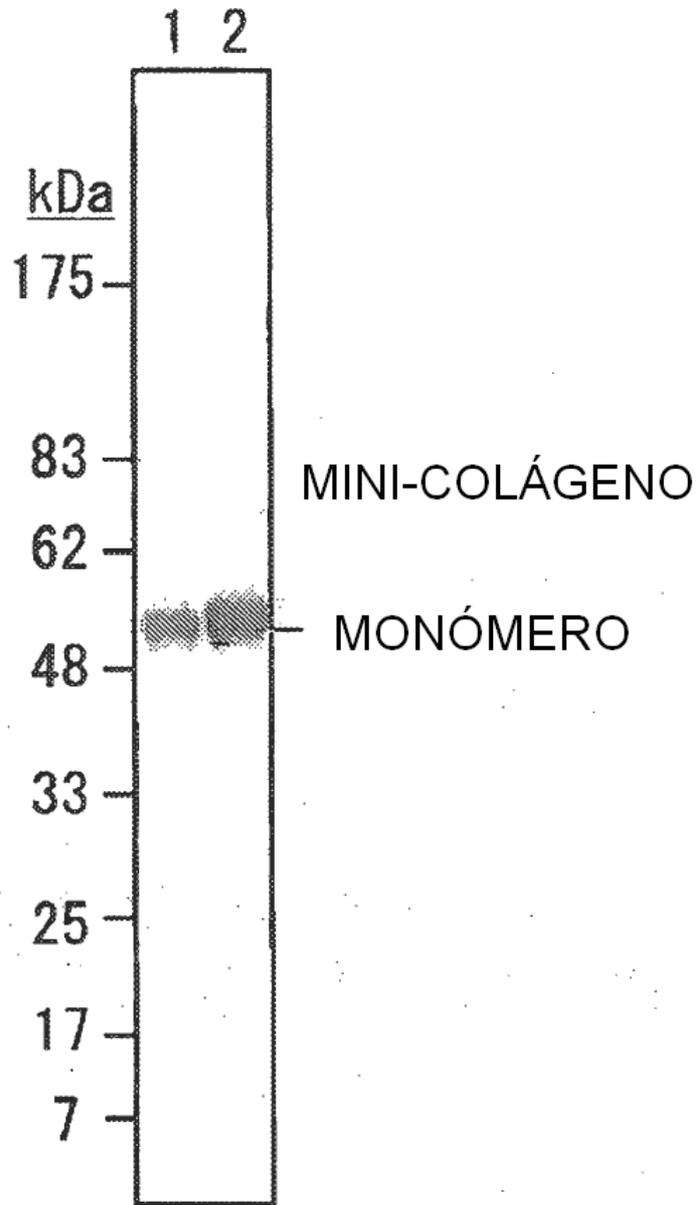


FIG. 4

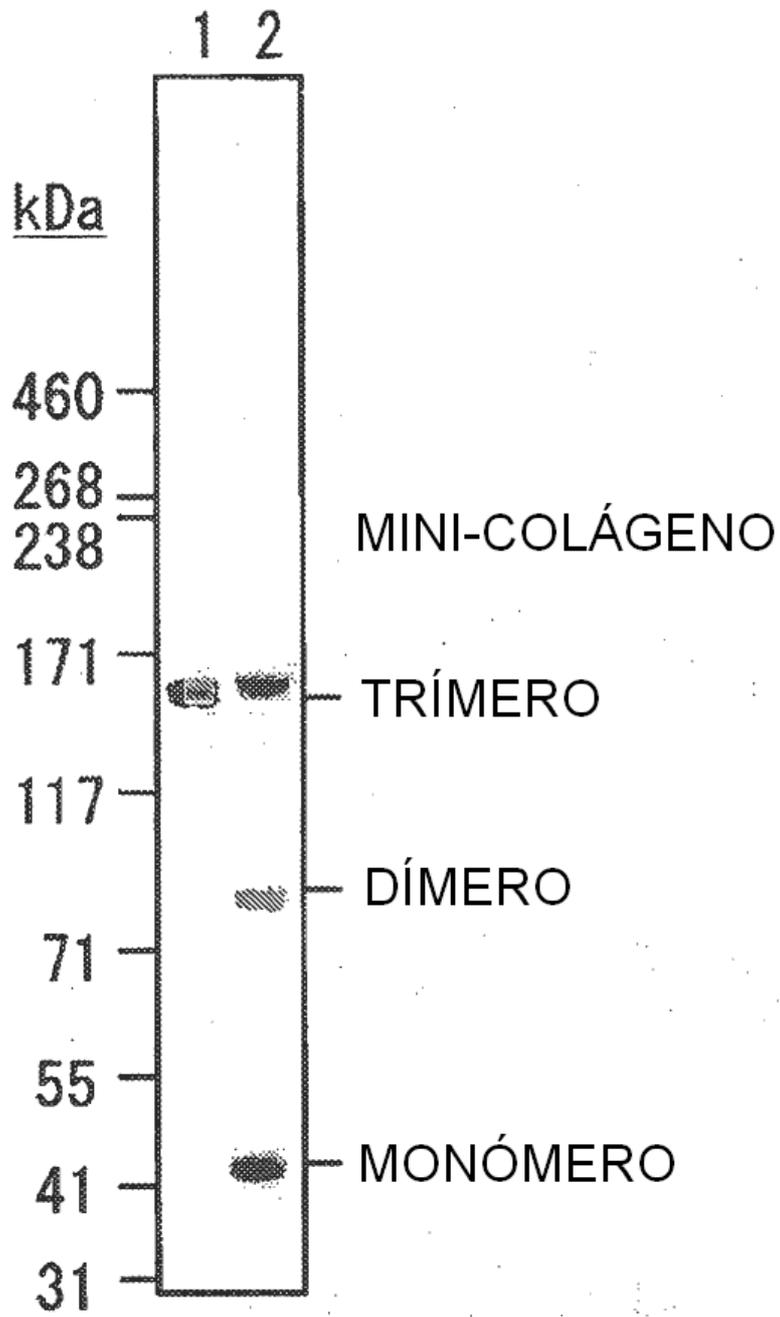


FIG. 5

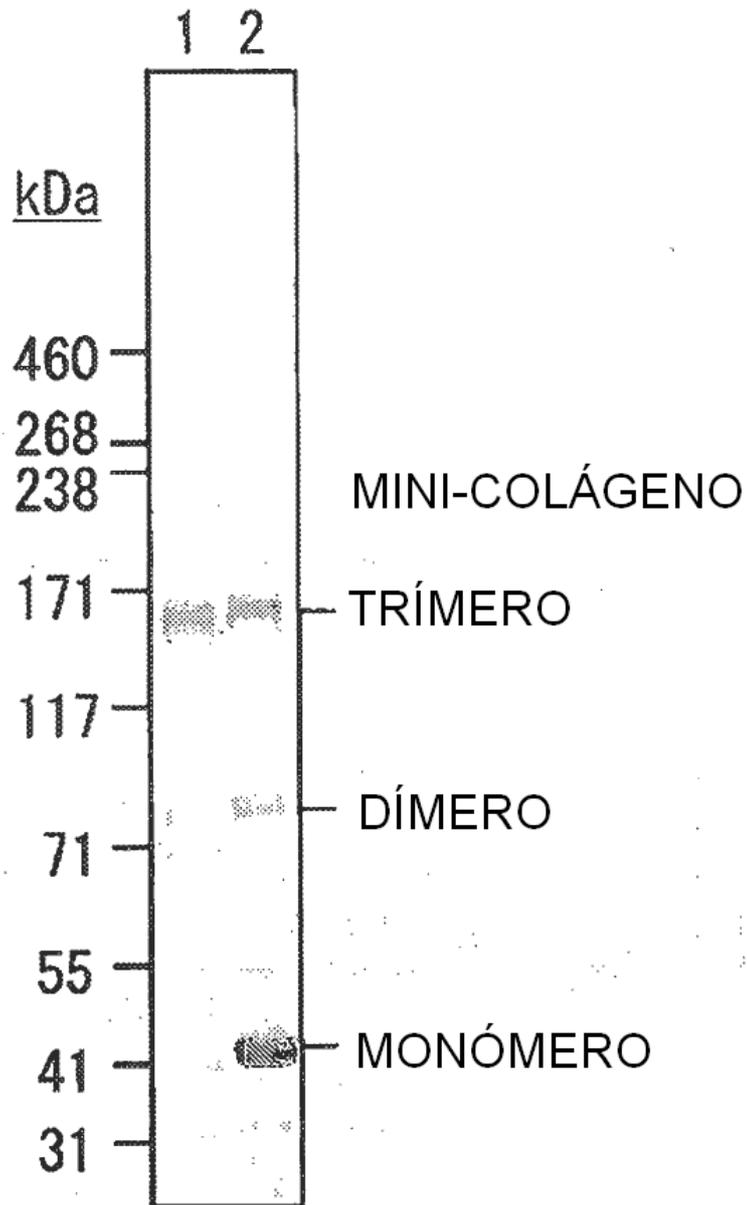


FIG. 6

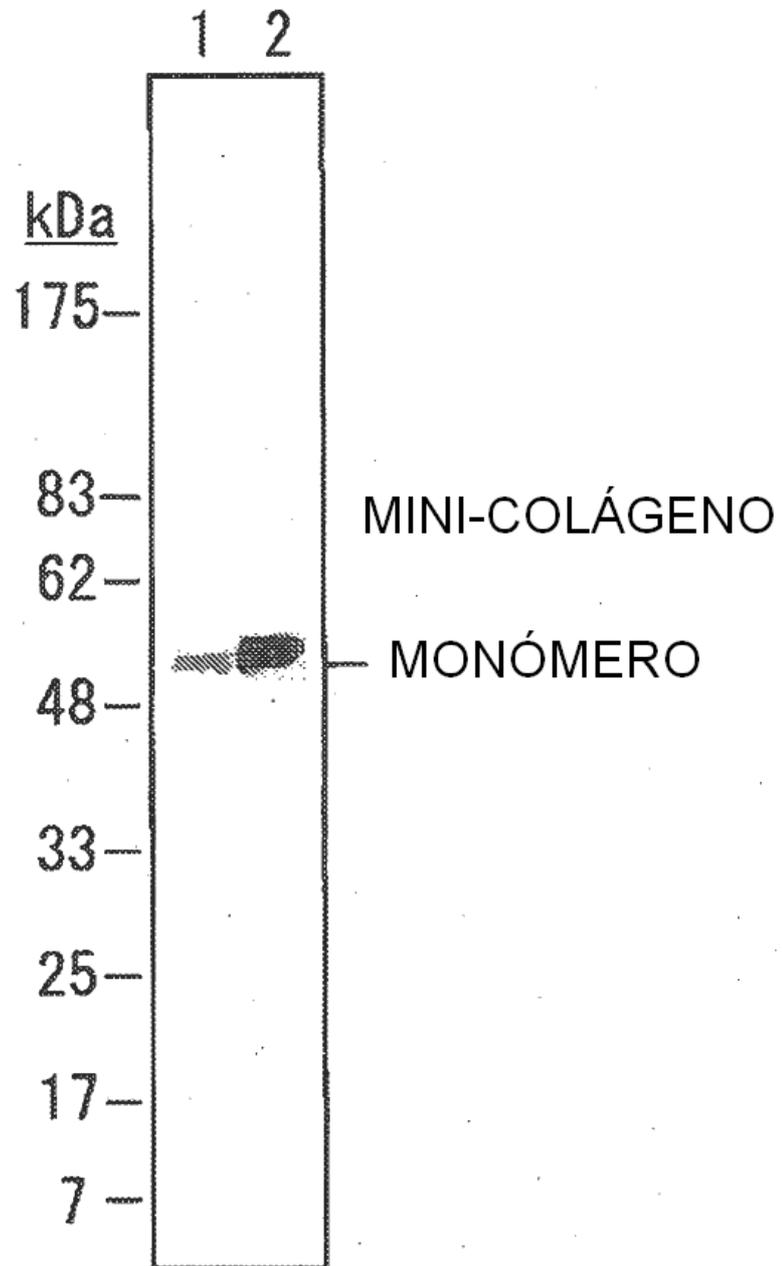


FIG. 7

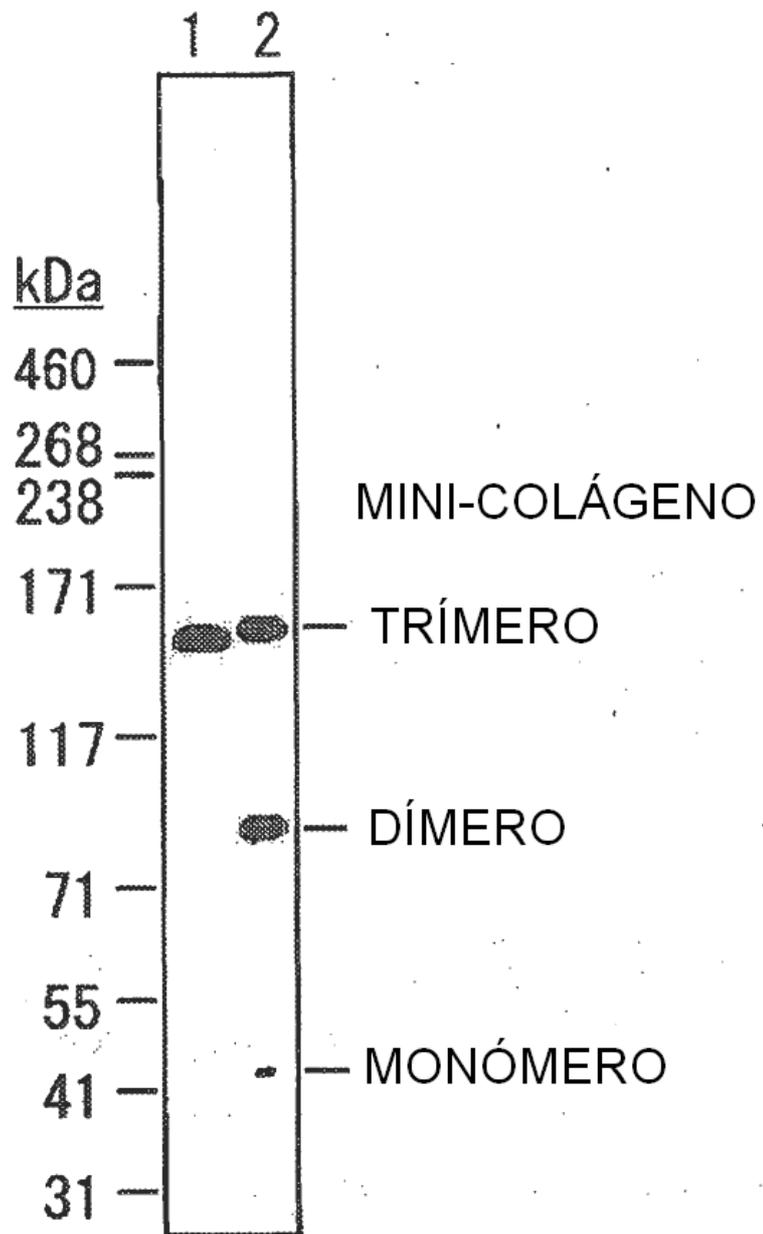


FIG. 8

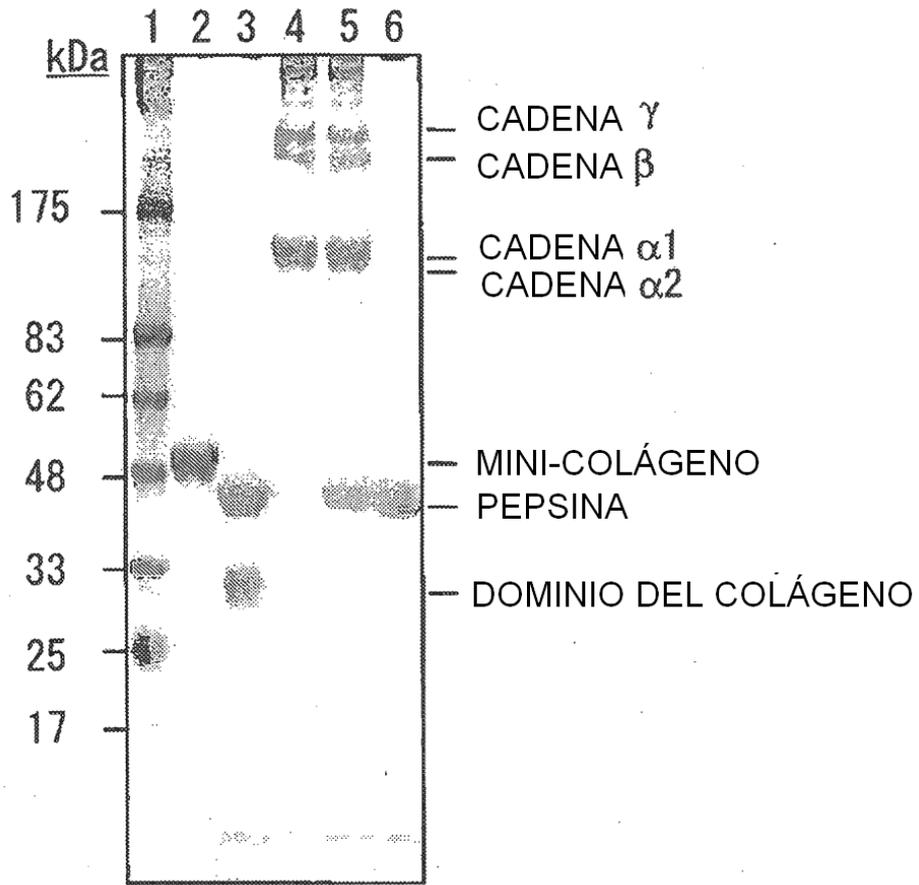


FIG. 9

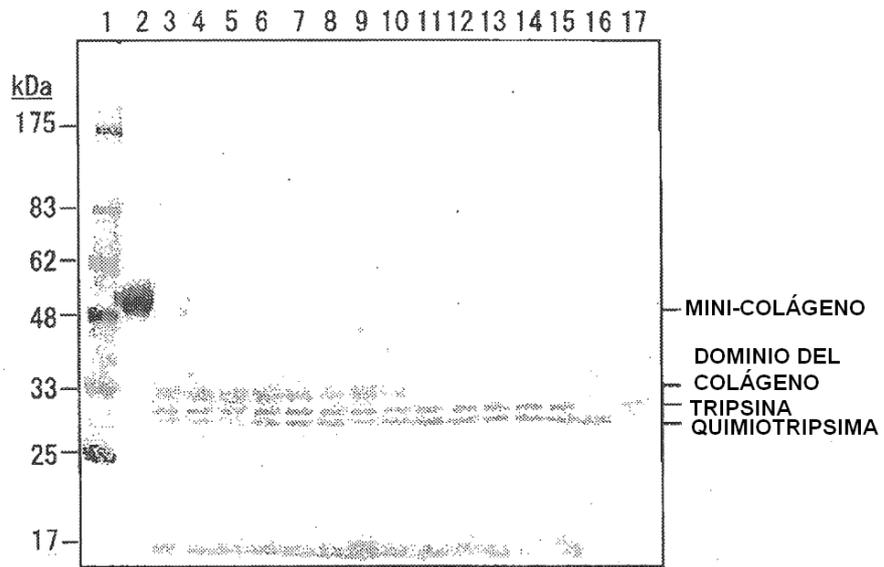


FIG. 10

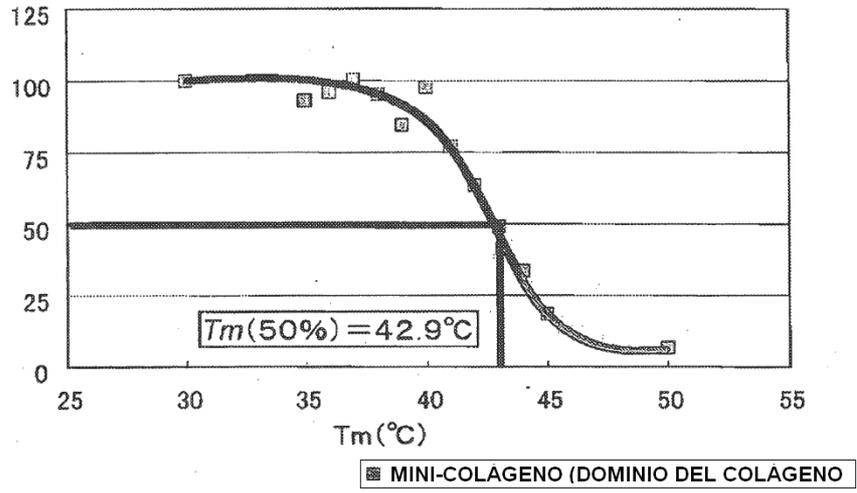


FIG. 11

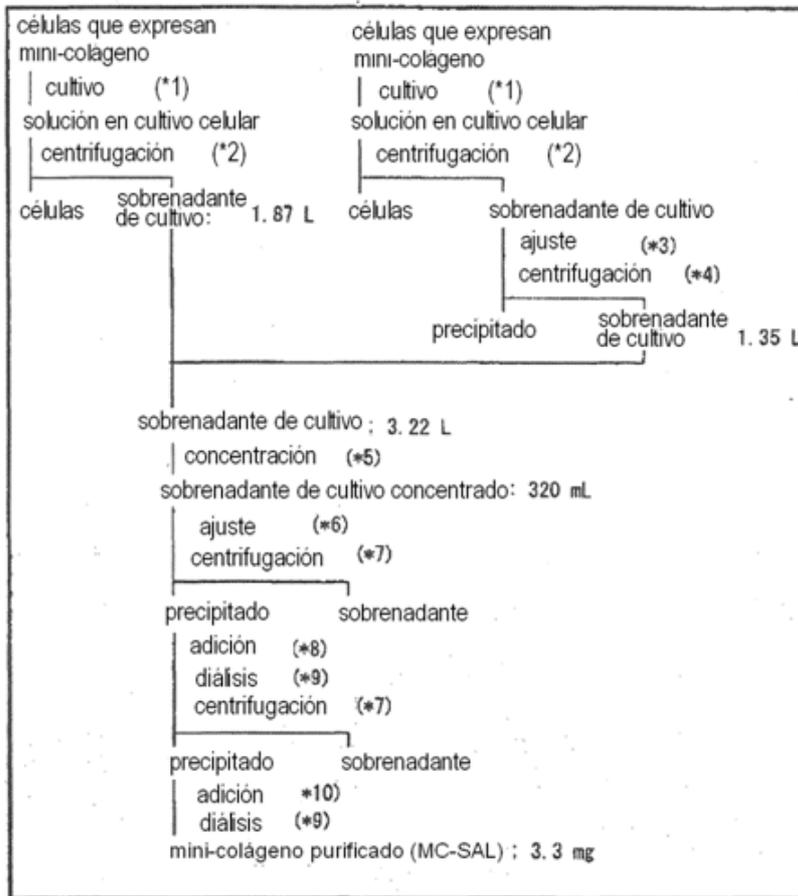


FIG. 12

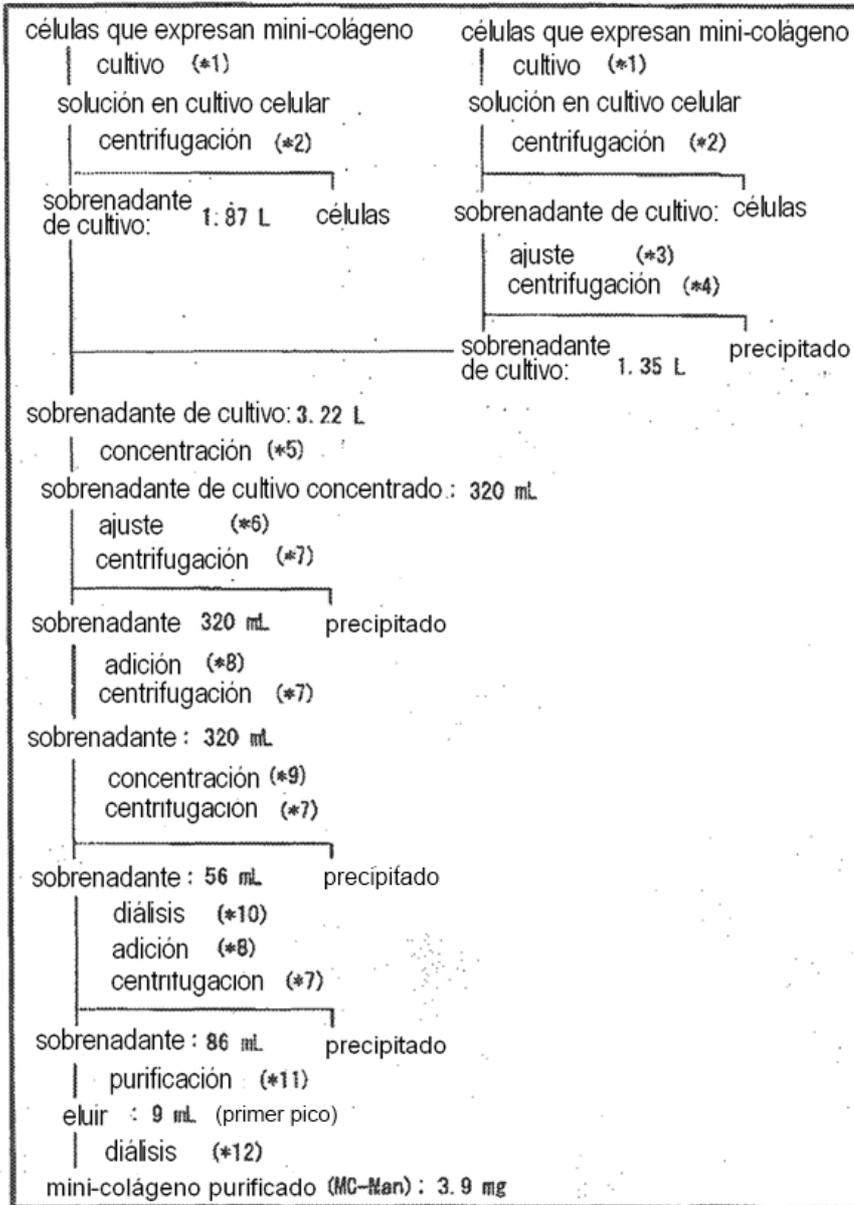


FIG. 13

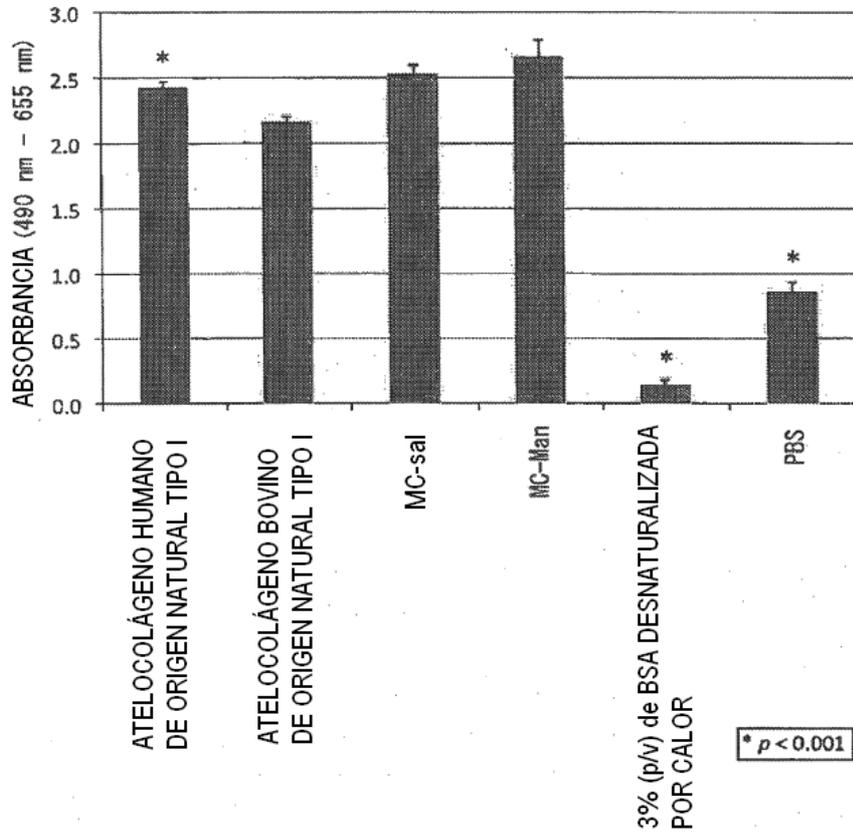


FIG. 14

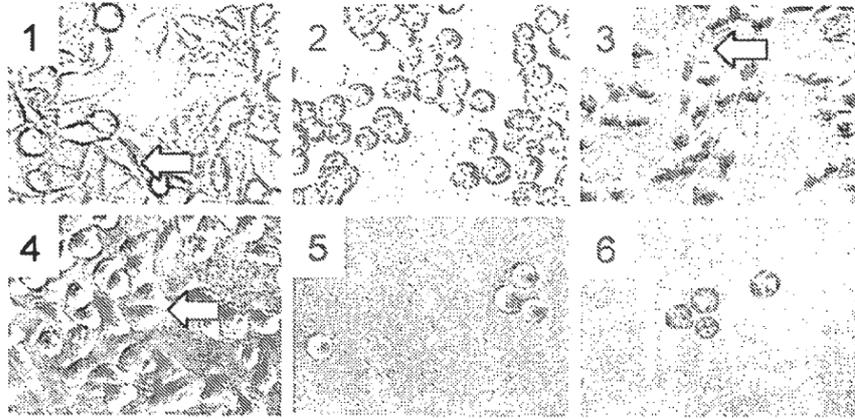


FIG. 15

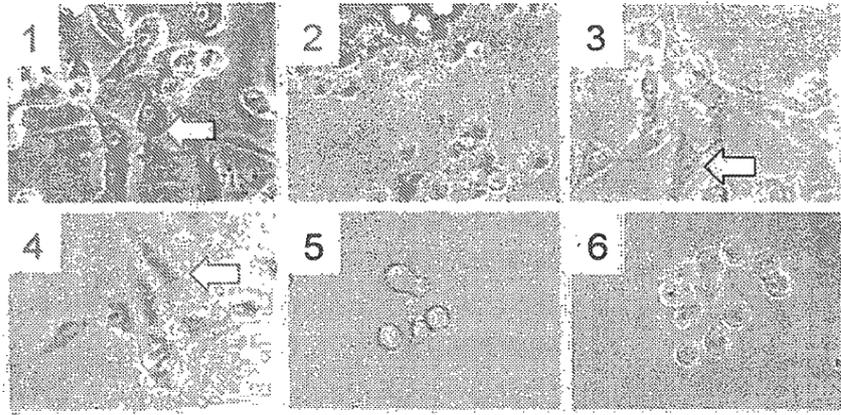


FIG. 16

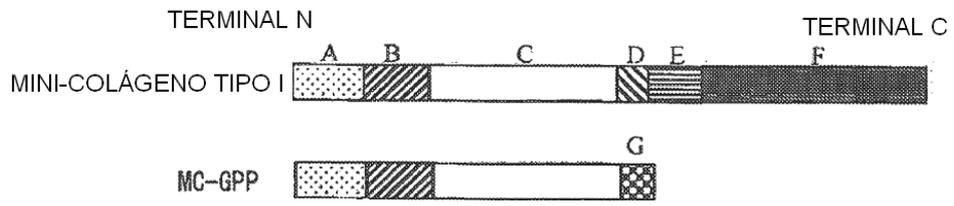


FIG. 17

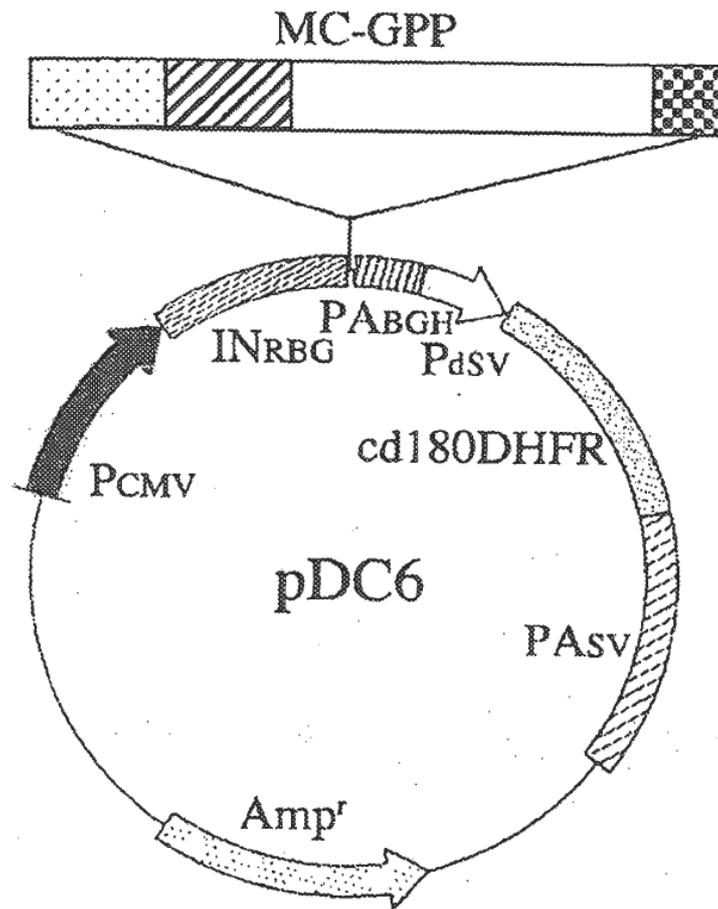


FIG. 18

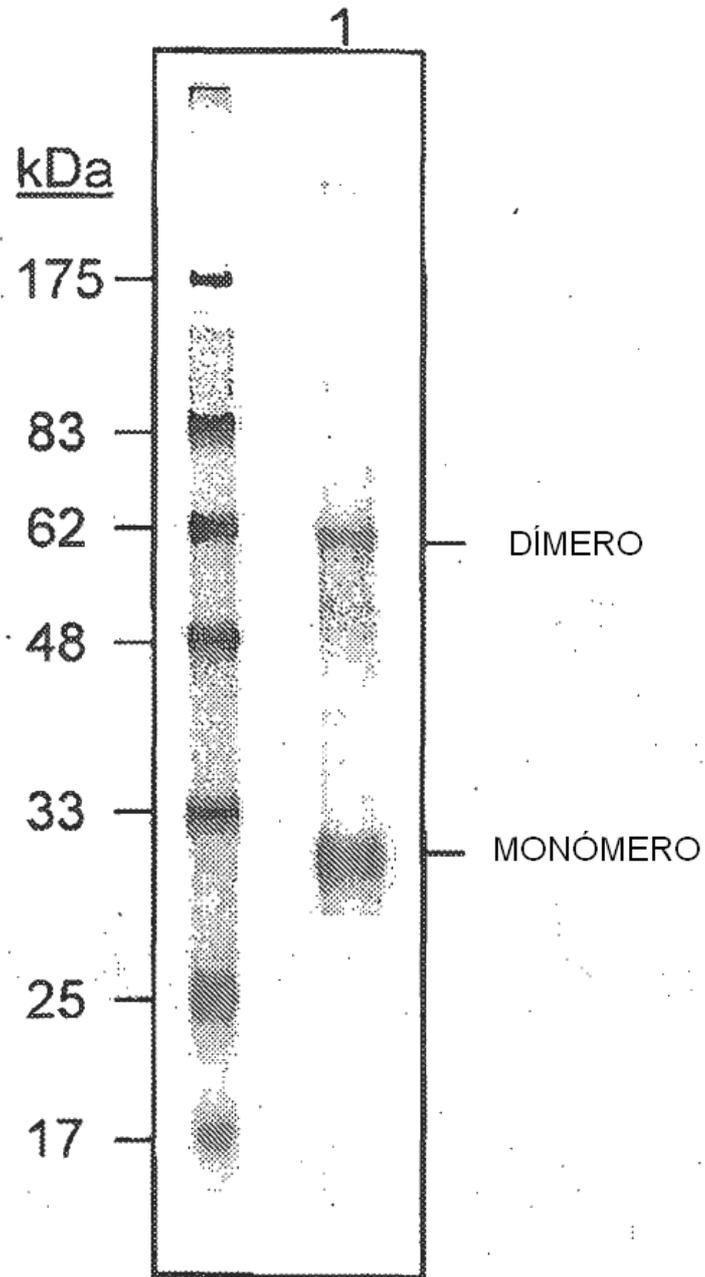


FIG. 19

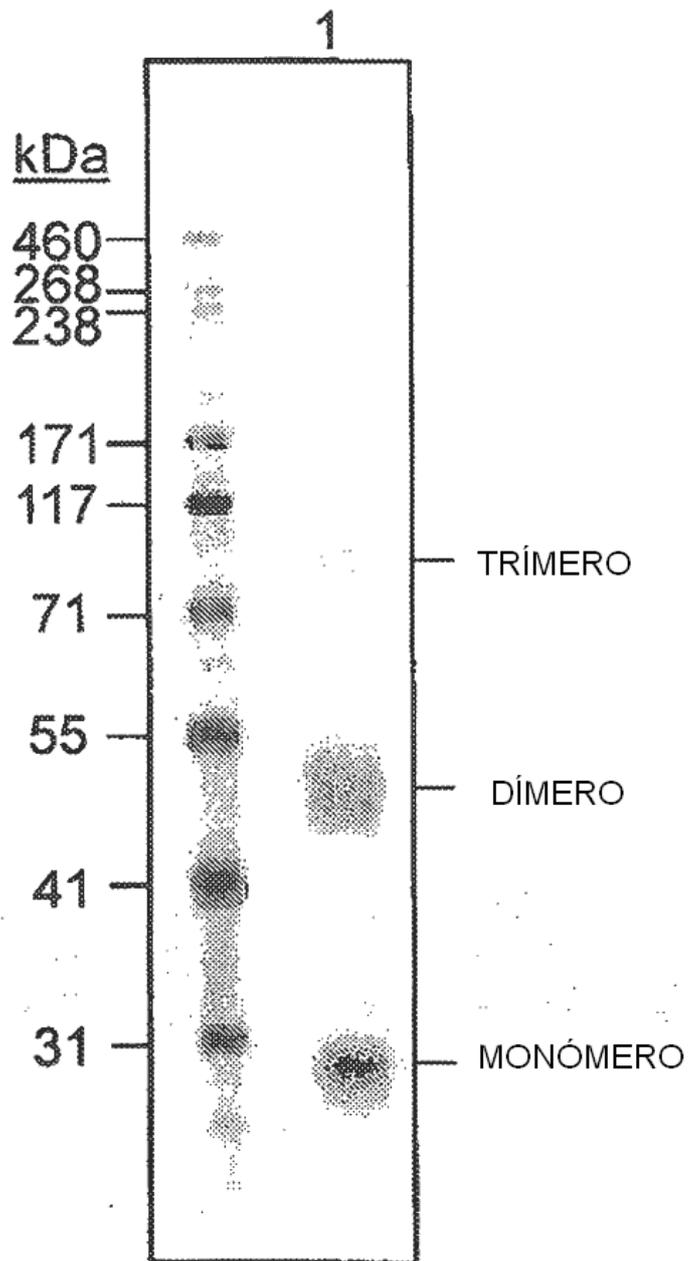


FIG. 20

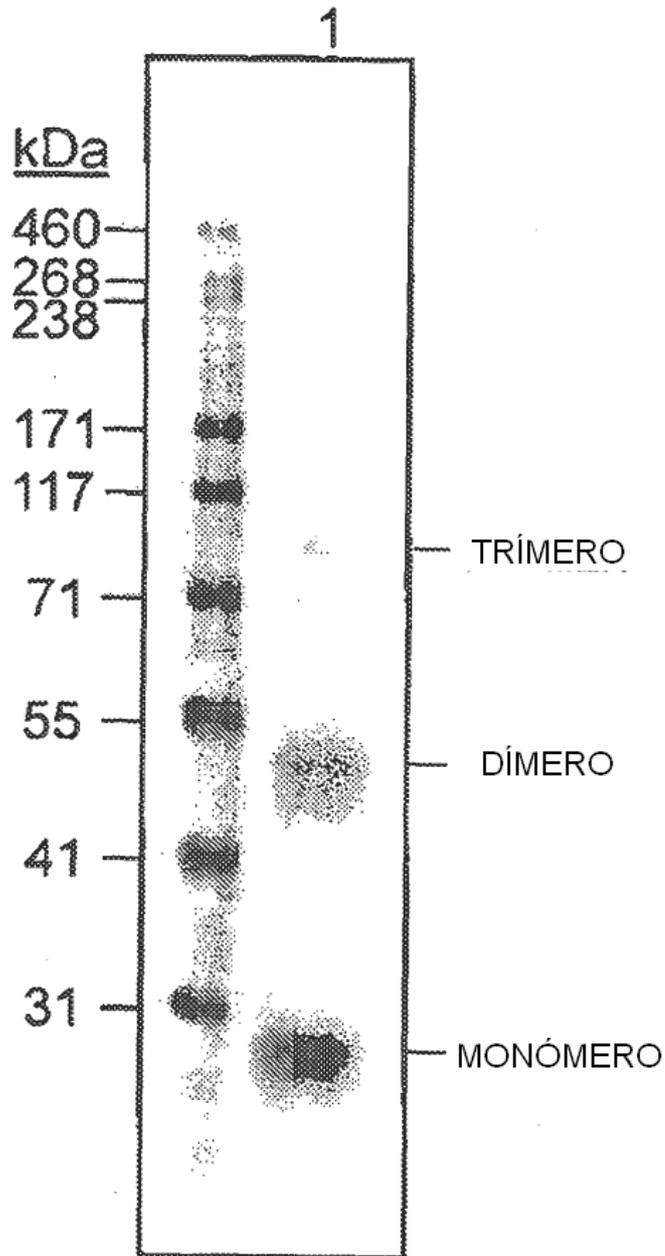


FIG. 21.

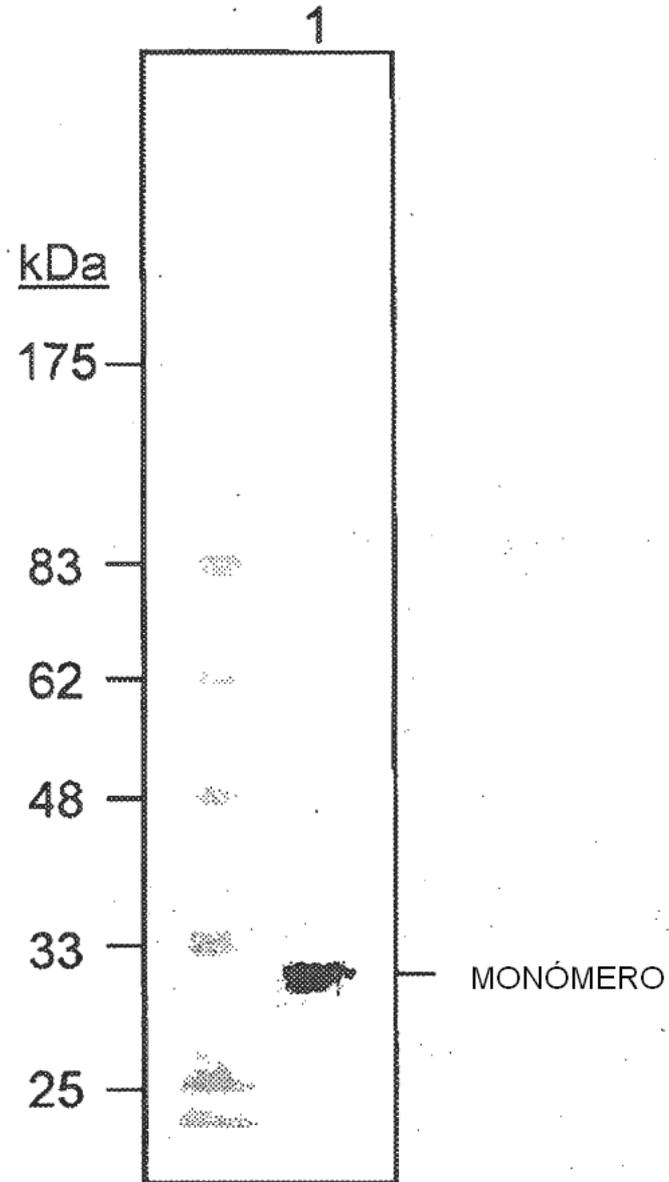


FIG. 22

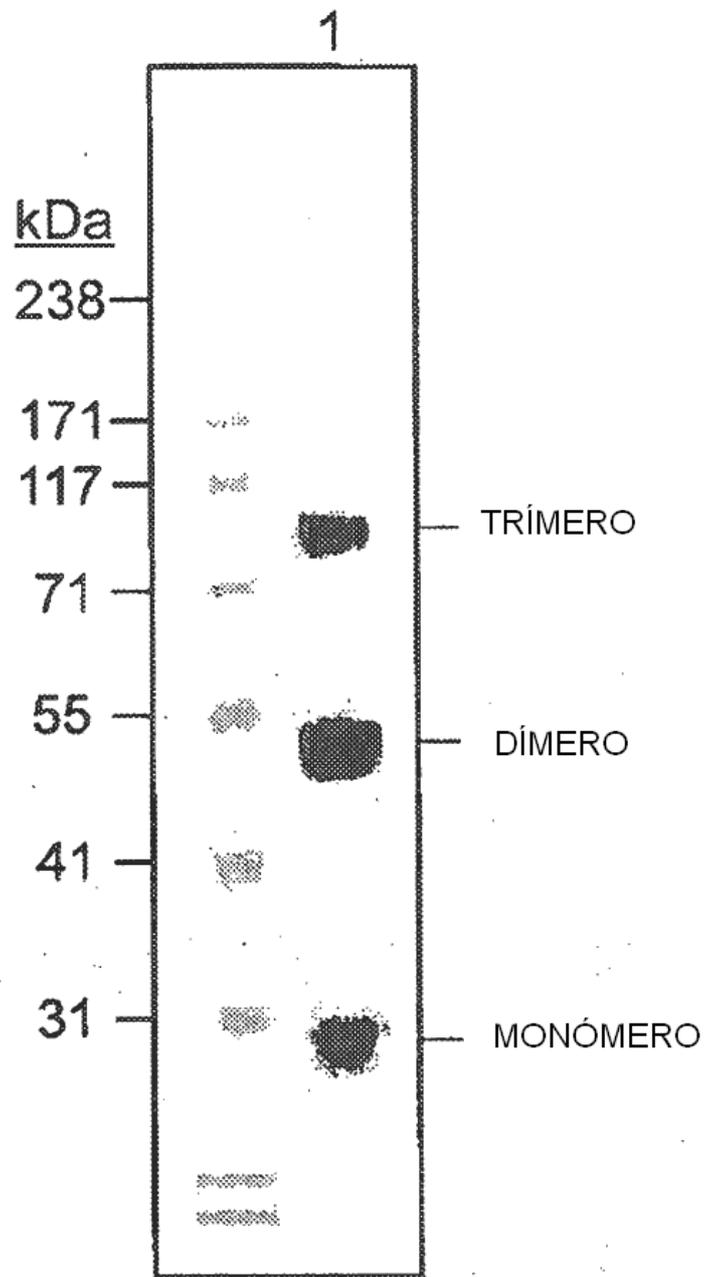


FIG. 23

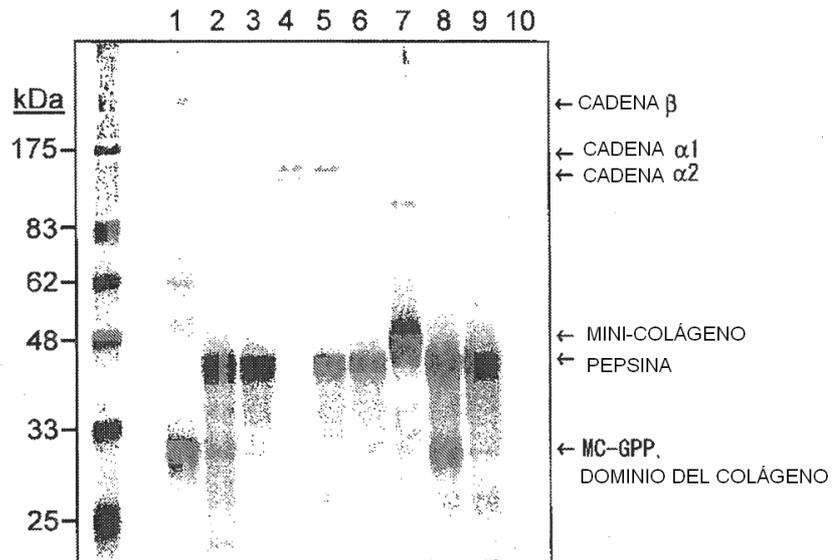


FIG. 24

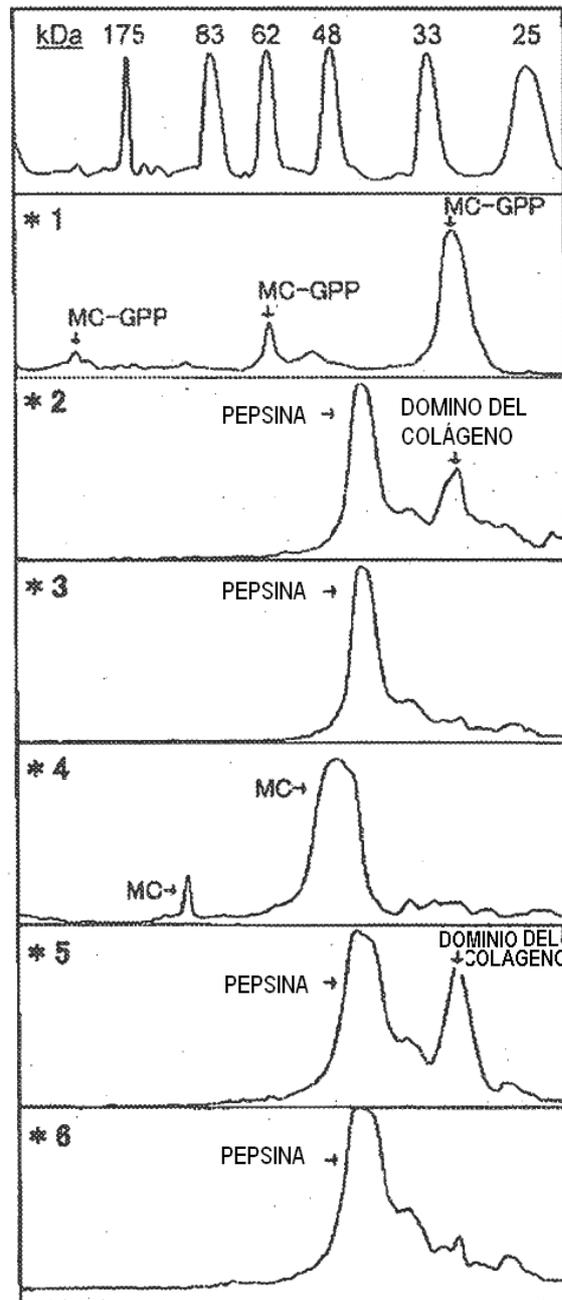


FIG. 25