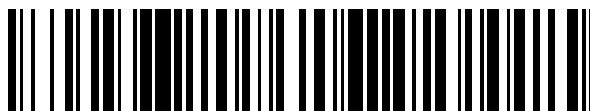


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 185**

51 Int. Cl.:

A61K 38/39 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61P 19/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2009** **E 09733363 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016** **EP 2288376**

54 Título: **Métodos de generación y de uso del procolágeno**

30 Prioridad:

18.04.2008 US 71267 P
04.08.2008 US 129976 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.04.2016

73 Titular/es:

COLLPLANT LTD. (100.0%)
3 Sapir Street
74140 Nes Ziona, IL

72 Inventor/es:

SHOSEYOV, ODED;
DGANY, OR y
SIEGEL, DANIEL L.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 565 185 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

Métodos de generación y de uso del procolágeno

5 La presente divulgación, en algunas formas de realización de la misma, se refiere a composiciones que comprenden procolágeno y a los usos de las mismas para promover la curación de heridas, el tratamiento de la fibrosis y la promoción de la angiogénesis.

10 La rápida respuesta del cuerpo de un mamífero para iniciar la respuesta de curación para impedir una hemorragia y una infección potencialmente mortal ha evolucionado para garantizar la supervivencia, a menudo a expensas de la regeneración eficaz del tejido lesionado. El proceso de curación de heridas implica diferentes etapas, siendo algunas secuenciales mientras que otras son simultáneas. Sin embargo, todas las etapas están cuidadosamente organizadas en el sitio del tejido dañado para regenerar un tejido con una funcionalidad normal. La secuencia de acontecimientos implica la coagulación, la inflamación, la deposición de tejido (migración y proliferación) y finalmente el remodelado del tejido.

15 En el momento de la lesión del tejido se libera sangre desde los vasos sanguíneos dañados que da lugar a la formación de una malla de fibra de fibrina con plaquetas atrapadas en ella. La malla funciona como un soporte para que las células reclutadas migren hacia ella y a lo largo de la misma. Las plaquetas activadas se desgranulan y liberan agentes quimiotácticos que incluyen citocinas y factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), dando como resultado un reclutamiento de fibroblastos y de queratinocitos. Varios días después de la lesión, los fibroblastos comienzan a sustituir el tejido lesionado mediante la deposición de nuevas matrices de colágeno. Las fibras de colágeno aumentan gradualmente en espesor y se alinean a lo largo de la línea de estrés de la herida. En la formación normal de cicatrices, las fibras de colágeno normalmente se alinean en paralelo a la epidermis. Este tejido de granulación recién formado se organiza y se contrae finalmente en una estructura más densa por parte de los miofibroblastos.

20 Habitualmente, las cicatrices se forman como resultado de la progresión normal de la respuesta de curación de heridas y están formadas por tejido conectivo depositado durante el proceso de curación. La mayoría de las cicatrices muestran un cierto grado de organización anormal (como se observa en las cicatrices de la piel) y cantidades de tejido conectivo (como se observa en las cicatrices del sistema nervioso central). Sin embargo, las alteraciones en la cascada de producción de tejido normal dan como resultado una curación de heridas inferior a la óptima con un excesivo depósito de tejido cicatrizado, dando como resultado la formación de un queloide y de una cicatriz hipertrófica, también denominada fibrosis. Las cicatrices hipertróficas se caracterizan por una excesiva deposición de colágeno, una alteración en el remodelado y la contracción del colágeno, y difieren de las cicatrices queloides en que están definidas dentro de los límites del sitio de la herida.

30 El factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) juega un importante papel en estos procesos de curación, y se ha notificado que media en la transición de los fibroblastos en miofibroblastos. Este subtipo de fibroblasto se caracteriza por una expresión de la actina de músculo liso α (α -SMA) y está implicado en la contracción de la herida. El TGF- $\beta 1$ induce la deposición de colágeno mediante una regulación por aumento tanto de la estabilidad como de la expresión del ARNm del procolágeno. Además, reduce las tasas de degradación del colágeno mediante la inhibición de la expresión de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) induciendo la expresión de los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP).

40 Aparte del equilibrio MMP / TIMP, la accesibilidad de una molécula de colágeno a dicha actividad enzimática también es un factor clave en la determinación de las tasas de degradación del colágeno. Esta accesibilidad viene determinada principalmente por el estado organizativo del colágeno (monómeros helicoidales frente a monómeros organizados en fibrillas) y por el grado de reticulación entre las hélices triples del colágeno.

50 Los colágenos de los tipos I y III son colágenos formadores de fibrillas, que constituyen el cuerpo de la matriz dérmica extracelular. El colágeno es sintetizado en forma de un precursor de procolágeno, en el que tres polipéptidos de colágeno se enrollan de entre sí, formando la hélice triple. Estas hélices son posteriormente unidas entre sí en la etapa final de la biosíntesis de las fibrillas de colágeno. El procolágeno de tipo I consiste en dos cadenas de colágeno alfa 1 y una única cadena alfa 2. El de tipo III está formado por tres cadenas alfa 1.

55 En todas las moléculas de colágeno fibrilares, las tres cadenas de polipéptido se construyen a partir de un triplete repetitivo de Gly-X-Y, en el que X e Y puede ser cualquier aminoácido, pero frecuentemente son los aminoácidos prolina e hidroxiprolina. Una característica importante de los colágenos formadores de fibrillas es que son sintetizados en forma de procolágenos precursores que contienen propéptidos globulares de extensión N y C-terminales.

60 Cada molécula de procolágeno se ensambla en el retículo endoplasmático rugoso a partir de sus tres cadenas polipeptídicas constituyentes. A medida que la cadena polipeptídica se transloca co-translacionalmente a través de la membrana del retículo endoplasmático, se produce la hidroxilación de los residuos de prolina y de lisina en la región de la repetición Gly-X-Y. Una vez que la cadena polipeptídica está totalmente translocada en la luz del

retículo endoplasmático, las tres cadenas pro-alfa se asocian a través de sus propéptidos C para formar una molécula trimérica que permite que la región de la repetición Gly-X-Y forme un punto de nucleación en su extremo C-terminal, garantizando la correcta alineación de las cadenas. Después, la región Gly-X-Y se pliega en una dirección desde C- hacia -N para formar una hélice triple.

Los propéptidos C, y en menor grado los propéptidos N, mantienen la solubilidad del procolágeno durante su paso hacia fuera de la célula [Bulleid et al., *Biochem Soc Trans.* 2000; 28 (4): 350 - 3]. Después o durante la secreción de las moléculas de procolágeno en la matriz extracelular, los propéptidos son normalmente escindidos por las proteinasas N y C del procolágeno, desencadenando así un autoensamblaje espontáneo de las moléculas de colágeno en fibrillas [Hulmes, 2002 *J Struct Biol.* 137 (1 - 2): 2 - 10].

La eliminación de los propéptidos por parte de las proteinasas N y C del procolágeno reduce drásticamente la solubilidad del procolágeno, y es necesario iniciar el autoensamblaje del colágeno en fibras a 37 °C. Para este proceso de ensamblaje son cruciales los péptidos cortos no triple-helicoidales denominados telopéptidos, que son los restos de los propéptidos N y C-terminales después de la digestión con las proteinasas N/C. Estos péptidos actúan para asegurar un correcto registro covalente de las moléculas colágeno en la estructura de la fibrilla a través de sus aldehídos reticulables mediante una reducción de la concentración crítica necesaria para el autoensamblaje (Bulleid et al., 2000, *supra*).

Hasta la fecha, el colágeno derivado de animales es la principal fuente de colágeno para aplicaciones médicas. El colágeno purificado a partir de animales es totalmente procesado que contiene telopéptidos reticulados que lo hacen muy insoluble. La solubilización del colágeno purificado a partir de animales normalmente se lleva a cabo mediante el uso de un método de extracción que implica la eliminación proteolítica de la región del telopéptido con enzimas proteolíticas tales como la tripsina, produciendo un atelocolágeno que puede solubilizarse (véanse las Patentes de EE.UU. nº 3.934.852; 3.121.049; 3.131.130; 3.314.861; 3.530.037; 3.949.073; 4.233.360 y 4.488.911 para consultar los métodos generales de preparación de colágeno soluble purificado). El atelocolágeno experimenta una fibrillogénesis en condiciones fisiológicas, para formar fibras. Dichas fibras son unas estructuras relativamente estables, resistentes a la proteólisis por parte de las MMP. Sin embargo, estas fibras carecen de los dominios moleculares que se encuentran en el procolágeno, esenciales para los procesos naturales de curación de heridas y para la formación natural de las estructuras de colágeno.

Como se ha mencionado, las alteraciones en la cascada normal de producción de tejido durante el proceso de curación de heridas pueden dar lugar a una excesiva deposición de tejido cicatricial, dando como resultado una fibrosis.

La Patente de EE.UU. nº 6.448.278 y las referencias de la misma describen inhibidores específicos de la C-proteinasa de procolágeno (PCP) para el tratamiento de diversas afecciones médicas relacionadas con una producción no regulada del colágeno, incluyendo una fibrosis o cicatrización patológica.

Zhang Y et al., 1999, 13 (1): 51 - 4 enseñan la estimulación directa de la expresión del gen del procolágeno I (alfa 1) mediante la administración del factor de curación de heridas derivado de plaquetas (PDWHF).

Saggers, et al., [Wounds 13 (2): 66 - 71, 2001] informaron de que un colágeno soluble en ácido aislado a partir de los tendones de la cola de rata inhibe la expresión del ARNm del procolágeno de los tipos I y III en los fibroblastos dérmicos humanos que crecen en placas recubiertas con colágeno. El esteroide anabólico oxandrolona, antagonizaba dicha inhibición del sustrato del colágeno de la expresión del ARNm del procolágeno. Estos hallazgos sugieren que la oxandrolona puede potenciar directamente la curación de heridas mediante un aumento en la expresión del ARNm del procolágeno en los fibroblastos asociados a una matriz de colágeno de una forma análoga a la curación de una herida.

Las Solicitudes de Patente de EE.UU. nº 20030199441 y 20050282737 enseñan medicamentos para el tratamiento o la prevención de enfermedades fibróticas. Describen la aplicación de un (poli) péptido con actividad antifibrótica, que comprende al menos un propéptido de procolágeno (III) N-terminal y un propéptido de un procolágeno (III) C-terminal, o un fragmento del (poli) péptido.

El documento WO 9708311 desvela moléculas que comprenden al menos una primera fracción que tiene la actividad de un propéptido C del procolágeno y una segunda fracción seleccionada de entre una cualquiera del grupo de una cadena colágeno de alfa foránea y materiales no colágenos, estando la primera fracción unida a la segunda fracción. También se divulgan moléculas de colágeno, fibrillas y fibras que comprenden una combinación no natural de cadenas de colágeno alfa, el ADN que codifica para las mismas, los hospedadores de expresión transformados o transfectados con las mismas, los animales transgénicos y los métodos para la producción de un colágeno no natural.

El documento US 2003199441 concierne a un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades fibróticas que contiene una sustancia antifibrótica que es un (poli) péptido que tiene actividad antifibrótica y que comprende al menos uno de un propéptido de un procolágeno (III) N-terminal y un propéptido de un procolágeno (III)

C-terminal, o un fragmento del (poli) péptido definido que tiene actividad antifibrótica o un derivado del (poli) péptido que tiene actividad antifibrótica. La sustancia antifibrótica se combina con un portador o un diluyente farmacéuticamente tolerable.

El documento US 2007031478 se refiere a una cadena pro-alfa modificada que comprende un dominio formador de hélice triple unido a al menos un dominio N-terminal, conteniendo el dominio N-terminal un polipéptido de al menos parte de una glucoproteína de laminina o de un inhibidor de la proteasa de leucocitos de secreción. La cadena pro-alfa puede formar parte de una molécula de procolágeno que conserva el dominio N-terminal. Las moléculas de procolágeno pueden estar incorporadas en polímeros, matrices y geles de colágeno, y usarse para aplicaciones tales como la curación de heridas.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a procolágeno humano para su uso en la promoción de la curación de heridas, en el que dicho procolágeno comprende:

- (i) dos cadenas de colágeno de tipo I $\alpha 1$ que tienen cada una, una secuencia como se expone en la SEQ ID N°: 1; y
- (ii) una cadena de colágeno de tipo I $\alpha 2$ que tiene una secuencia según se establece en el acceso SEQ ID N°: 2.

La presente invención también se refiere a un artículo de fabricación que comprende un material de envasado que contiene como principios activos procolágeno humano y un agente para la promoción de la curación de heridas, en el que dicho procolágeno comprende:

- (i) dos cadenas de colágeno de tipo I $\alpha 1$ que tienen cada una, una secuencia como se expone en la SEQ ID N°: 1; y
- (ii) una cadena de colágeno de tipo I $\alpha 2$ que tiene una secuencia como se expone en la SEQ ID N°: 2.

Preferiblemente, el material de envasado comprende al menos dos recipientes individuales que contienen por separado dicho procolágeno humano y dicho agente para la promoción de la curación de heridas. Preferiblemente la presente invención comprende adicionalmente instrucciones para su uso en la promoción de la curación de heridas.

Preferiblemente, el procolágeno se produce en células vegetales.

Preferiblemente dicho procolágeno es degradable por una colagenasa.

Preferiblemente, la herida está relacionada con una afección fibrótica seleccionada de entre el grupo que consiste en esclerodermia sistémica o localizada, fibrosis hepática, cirrosis alcohólica, cirrosis biliar, hepatitis, enfermedad venoclusiva, fibrosis intersticial idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar aguda, síndrome de distrés respiratorio agudo, fibrosis perimuscular, fibrosis pericentral, dermatofibroma, fibrosis renal, nefropatía diabética, glomerulonefritis, queloides, cicatrices hipertróficas, adherencias en las articulaciones, artrosis, mielofibrosis, cicatrices corneales, fibrosis quística, fibrosis muscular, distrofia muscular de Duchenne, estenosis esofágica, cicatrices retroabdominales, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, alteraciones ateroscleróticas, hipertensión pulmonar, angiopatía de arterias y venas, aneurismas de grandes vasos o que son inducidos o iniciados por la revisión de cicatrices, cirugías plásticas, glaucoma, fibrosis de cataratas, cicatrices corneales, enfermedad del injerto contra el hospedador, cirugía de tendones, atrapamiento nervioso, contractura de Dupuytren, adherencias OB / GIN, adherencias pélvicas, fibrosis peridural, enfermedades de la glándula tiroides o paratiroides, enfermedad metastásica ósea, mieloma múltiple y reestenosis.

Preferiblemente dicha herida está causada por diabetes.

Preferiblemente dicha herida se elige de entre el grupo que consiste en una úlcera, una quemadura y una herida quirúrgica.

Preferiblemente dicho procolágeno comprende procolágeno monomérico.

Breve descripción de los dibujos

La patente o el archivo de la solicitud contienen al menos un dibujo realizado en color. Las copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujo(s) a color serán proporcionadas por la Oficina bajo demanda y con el pago de las correspondientes tasas.

Algunas formas de realización de la divulgación se describen en el presente documento únicamente a modo de ejemplo con referencia a los dibujos anexos. Haciendo ahora una referencia específica a los dibujos con detalle, se destaca que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y con el fin de ilustrar el análisis de las formas de realización de la divulgación. A este respecto, la descripción tomada junto con los dibujos hace evidente a los expertos en la materia cómo pueden llevarse a la práctica las formas de realización de la divulgación.

En los dibujos:

Las FIG. 1 A - D son representaciones esquemáticas de las construcciones de ADN usados para generar las plantas de tabaco de algunas formas de realización de la presente invención.

Las FIG. 2 A - B son imágenes de un SDS PAGE teñido con azul de Coomassie (Figura 2 A) y de un análisis mediante inmunotransferencia Western (Figura 2 B) que muestran la purificación por etapas del procolágeno a partir de plantas de tabaco transgénicas CP A3-29 (lote #CP C-18). Los carriles representan las muestras proteicas separadas a partir de las líneas vegetales naturales (WT) o CP A3-29 después de una homogeneización - (Carril A); después de una centrifugación y una saturación con AMS al 15 % (Carril B); después de una centrifugación y una saturación con AMS al 25 % (Carril C); y después de la resuspensión del sedimento de AMS al 25 % (Carril D). "M" representa los carriles en los que se cargaron marcadores de peso molecular.

Las FIG. 3 A - B son imágenes de los análisis por inmunotransferencia Western de las fracciones de intercambio aniónico #9 - 20 separadas en un SDS-PAGE al 8 %. El carril marcado como "sedimento concentrado" se corresponde con las proteínas del sedimento concentrado diez veces con sulfato de amonio al 25 %. El carril marcado como "Total" se corresponde con la muestra de proteínas antes de la separación en la columna.

La FIG. 4 es un cromatograma de filtración en gel de las fracciones de intercambio aniónico agrupadas que comprenden procolágeno. La absorbancia se midió a 226 nm.

Las FIG. 5 A - B son imágenes de la tinción con plata de las fracciones de filtración en gel separadas en un SDS-PAGE al 8 %. Las muestras se analizaron en paralelo con un marcador proteico de peso molecular (M) y una muestra previa no filtrada (total). Flecha superior: procolágeno α_1 . Flecha inferior: procolágeno α_2 .

Las FIG. 6 A - B son imágenes de los análisis por inmunotransferencia Western de las fracciones de filtración en gel separadas en un SDS-PAGE al 8 % y analizadas en paralelo con un marcador proteico de peso molecular (M) y una muestra previa no filtrada (total).

Las FIG. 7 A - B son los escáneres de geles al 12 % teñidos con *instant blue* después de la separación de las proteínas en las fracciones 3 y 4 después de una etapa de concentración de diez veces, analizadas en paralelo con un marcador proteico de peso molecular (carril izquierdo). La Figura 7 B es una ampliación de la sección superior de la Figura 7 A.

La FIG. 8 es un escáner de la separación mediante un SDS-PAGE teñido con *instant blue* de la muestra de la fracción que contiene procolágeno del intercambio aniónico precipitado con AMS después de una diálisis con precipitación en etanol y una centrifugación (carril 2). El carril 3 incluye la misma muestra después de una filtración a través de un filtro de 0,2 μ m. Los carriles 4 - 7 se cargaron con muestras como en el carril 3, después de una incubación de 24 h (carril 4) o de 72 h (carril 5) a 4 °C, después de dos ciclos de congelación y descongelación (carril 6), o después de una liofilización y una resuspensión en DDW (carril 7).

Descripción de las formas de realización de la invención

La presente divulgación, en algunas formas de realización de la misma, se refiere a composiciones y a métodos para su uso en la curación de heridas y en el tratamiento de la fibrosis.

Debe apreciarse que la invención no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles establecidos en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos. La invención es susceptible de otras formas de realización o de llevarse a la práctica o llevarse a cabo de diversas formas.

Aunque la formación de las fibrillas de colágeno es esencial para la morfogénesis y para la curación de las heridas y de las fracturas óseas en el adulto, una excesiva formación de una MEC de colágeno fibroso provoca una elevada morbilidad en la población en general. Estas afecciones incluyen queloides (excesiva cicatrización de la piel), adherencias quirúrgicas y fibrosis profundas de órganos, incluyendo los pulmones, el hígado y los riñones. Las fibrosis profundas son particularmente ominosas, ya que la sustitución del tejido del parénquima por tejido cicatricial formado esencialmente por una MEC de colágeno fibroso destruye la función del órgano.

Al llevar a la práctica la presente invención, los presentes inventores descubrieron, en agudo contraste con el colágeno fibrilar, que el procolágeno, así como el atelocolágeno soluble en ácido o el colágeno que contiene telopéptido aislado mediante técnicas recombinantes o a partir de tejidos animales, puede ser ventajosamente usado para la prevención de la curación de heridas y para la prevención de la formación de cicatrices.

El procolágeno, en comparación con el colágeno, es una sustancia no fibrosa muy soluble debido a la presencia de las extensiones C y N-terminales, denominadas en el presente documento propéptidos. La provisión temprana de procolágeno en el proceso de curación de heridas, antes del reclutamiento masivo de fibroblastos, proporciona un sustrato soluble fácilmente disponible para la colagenasa que ya está presente en el sitio de la herida resultante de la producción de fragmentos de colágeno quimiotácticos, que a su vez reclutan fibroblastos que mejoran el proceso de curación.

Adicionalmente, el procolágeno añadido al sitio de la herida debería ser fácilmente reconocido por los elementos naturales de curación de heridas tales como la proteinasa del propéptido C y la proteinasa del propéptido N, produciendo un colágeno que contiene telopéptido. El colágeno que contiene telopéptido puede ser fácilmente incorporado en los tejidos mediante los mecanismos naturales de formación de tejidos, que requieren la presencia

de la región del telopéptido para generar correctamente depósitos organizados de colágeno. El colágeno que contiene telopéptido producido por los elementos naturales en el tejido lesionado puede formar tejidos con una orientación de la fibra que se parece más a los tejidos intactos, y prevenir o reducir por tanto la formación de tejido cicatricial. Además, los propéptidos N y C liberados pueden servir para regular la síntesis *de novo* del procolágeno, evitando así la fibrosis y la formación de cicatrices.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para la promoción de la curación de heridas. El método comprende la administración a un sujeto en necesidad de la misma de una cantidad terapéuticamente eficaz de un procolágeno, promoviendo así la curación de heridas en el sujeto.

El término "herida" según se usa en el presente documento se refiere ampliamente a las lesiones de la piel, del tejido subcutáneo, del hueso y de órganos profundos o de tejido conectivo, iniciada de una cualquiera de una diversidad de formas (por ejemplo, úlceras de presión por una estancia prolongada en cama, heridas inducidas por traumatismos, heridas relacionadas con cirugías, y similares) y con unas características variables.

Según se usa en el presente documento, "curación de heridas" o "regeneración tisular" se refiere a la reconstitución de un tejido funcional (por ejemplo, de tejido cutáneo, de tejido óseo o de membranas mucosas), con un mínimo o una ausencia completa de tejido fibroso susceptible de comprometer la funcionalidad del tejido.

Algunos ejemplos de heridas que son el objeto de las presentes enseñanzas incluyen, pero no se limitan a, contusiones, arañazos, heridas por quemaduras, heridas por quemaduras solares, heridas incisivas, heridas excisionales, heridas quirúrgicas, fascitis necrotizante, úlceras, heridas por estasis venosa, úlceras diabéticas, úlceras por decúbito, úlceras aftosas, cicatrices, alopecia areata, dermatitis, dermatitis alérgica por contacto, dermatitis atópica, dermatitis berloque, dermatitis de pañal, dermatitis dishidrótica, psoriasis, eccema, eritema, verrugas, verrugas anales, angioma, hemangioma capilar, pie de atleta, molas atípicas, carcinoma de células basales, púrpura de Bateman, penfigoide vesicular, candida, condrodermatitis helicis, nevus de Clark, calenturas, condilomas, quistes, enfermedad de Darier, dermatofibroma, lupus eritematoso discoide, eccema numular, eccema atópico, eccema dishidrótico, eccema de la mano, eritema nodoso multiforme, afección de Fordyce, foliculitis queloidales nuchae, foliculitis, granuloma anular, enfermedad de Grover, miliaria, herpes simple, herpes zoster (zóster), hidradenitis supurativa, urticaria, hiperhidrosis, ictiosis, impétigo, queratosis pilaris, queloides, queratoacantoma, liquen plano, liquen plano de tipo queratosis, liquen simple crónico, liquen esclerótico, papulosis linfomatoide, lupus cutáneo, enfermedad de Lyme, liquen estriado, quistes mixoides, micosis fungoide, molusco contagioso, molas, hongos en las uñas, necrobiosis lipídica diabética, dermatitis numular, onicosquiasis, onicomiosis, pitiriasis liquenoide, pitiriasis rosea, pitiriasis rubra pilaris, verrugas plantares, hiedra venenosa, roble venenoso, ponfólice, pseudofoliculitis de la barba, prurito anal y pitiriasis alba.

Las heridas se clasifican normalmente en entre uno y cuatro grados dependiendo de la profundidad de la herida: (i) de Grado I: heridas limitadas al epitelio; (ii) de Grado II: heridas que se extienden a la dermis; (iii) de Grado III: heridas que se extienden al tejido subcutáneo; y (iv) de Grado IV, también conocidas como heridas de espesor total: heridas en las que están expuestos los huesos (por ejemplo, un punto de presión óseo tal como el trocánter mayor o el sacro).

El término "herida de espesor parcial" usado en el presente documento se refiere a las heridas que engloban los Grados I - III; algunos ejemplos de heridas de espesor parcial incluyen heridas por quemaduras, úlceras de presión, úlceras por estasis venosa y úlceras diabéticas.

Se entiende que el término "herida de espesor total" usado en el presente documento incluye las heridas tanto de Grado III como de Grado IV.

El término "herida crónica" usado en el presente documento se refiere a una herida que se ha detenido y que no ha curado en treinta días.

Como se ha mencionado, el procolágeno de la presente divulgación puede ser útil para el tratamiento de heridas en huesos. Sin embargo, se apreciará que el procolágeno también puede ser útil para el tratamiento de otros trastornos óseos que incluyen, pero no se limitan a, osteoporosis (incluyendo osteoporosis postmenopáusica, osteoporosis senil masculina y femenina y osteoporosis inducida por corticosteroides), artrosis, enfermedad de Paget, osteomalacia, reposo en cama prolongado, desuso crónico de una extremidad, anorexia, microgravidad, insuficiencia gonadal exógena y endógena, fractura ósea, no unión, defecto, implantación de prótesis, y similares.

Como se ha explicado con detalle en la sección de antecedentes, la formación de tejido fibrótico es una parte integral de la curación de heridas. Sin embargo, en algunos casos, durante el proceso de curación, o en los pacientes con afecciones o enfermedades fibróticas, la producción de colágeno puede estar cualitativamente alterada o mal localizada en el espacio extracelular. En dichas enfermedades, el tejido fibrótico se vuelve rígido, firme y no elástico.

Por lo tanto, de acuerdo con formas de realización adicionales de este aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para el tratamiento de la fibrosis.

Según se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye anular, inhibir sustancialmente, ralentizar o revertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

Según se usa en el presente documento, la frase "afecciones médicas relacionadas con la fibrosis" se refiere a afecciones médicas que son el resultado de una fibrosis o en las que se produjo una fibrosis durante la progresión de la enfermedad o del síndrome.

Las enfermedades fibróticas son inducidas o iniciadas por revisiones de cicatrices, cirugías plásticas, glaucoma, fibrosis por cataratas, cicatrices corneales, enfermedad del injerto contra el hospedador, cirugía de tendones, atrapamiento nervioso, contractura de Dupuytren, adherencias OB / GIN, adherencias pélvicas, infertilidad, fibrosis peridural, enfermedades de la glándula tiroides o paratiroides, enfermedad metastásica ósea, mieloma múltiple o reestenosis.

Algunos ejemplos específicos de afecciones médicas relacionadas con la fibrosis incluyen, pero no se limitan a, esclerodermia sistémica o localizada, fibrosis hepática de diversas etiologías, cirrosis alcohólica, por ejemplo, cirrosis alcohólica hepática, cirrosis biliar, hepatitis de origen vírico o de otro origen, enfermedad venoclusiva, fibrosis intersticial idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar aguda, síndrome de distrés respiratorio agudo, fibrosis perimuscular, fibrosis pericentral, dermatofibroma, fibrosis renal, nefropatía diabética, glomerulonefritis, queloides, cicatrices hipertróficas, adherencias en las articulaciones, artrosis, mielofibrosis, cicatrices corneales, fibrosis quística, fibrosis muscular, distrofia muscular de Duchenne, estenosis esofágica, cicatrices retroabdominales, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, alteraciones ateroscleróticas, hipertensión pulmonar, angiopatía de las arterias y las venas, aneurismas de vasos grandes.

El procolágeno de la presente invención también puede ser útil para la promoción de la angiogénesis (por ejemplo, en el sitio de una herida, durante el remodelado tisular, después de una apoplejía isquémica, insuficiencia cardíaca isquémica y lesiones gastrointestinales).

El término "angiogénesis", según se usa en el presente documento, se refiere a la formación *de novo* de vasos tales como los que surgen a partir de la vasculogénesis, así como aquellos que surgen de la ramificación y el rebrote de los vasos, los capilares y las vénulas existentes.

El término "procolágeno", según se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de colágeno (por ejemplo, humano) que comprende un propéptido N-terminal, un propéptido C-terminal o ambos. Algunos ejemplos de secuencias de aminoácidos del procolágeno humano son establecidos por las SEQ ID N°: 1, 2, 7, 8 y 12 y 13.

El procolágeno puede comprender polipéptidos de cualquiera de los colágenos formadores de fibrillas (de los tipos I, II, III, V, y XI), los colágenos formadores de redes (de los tipos IV, VIII, y X), los colágenos asociados con superficies de fibrillas (de los tipos IX, XII, y XIV), los colágenos que aparecen en forma de proteínas transmembranales (de los tipos XIII y XVII) o los colágenos que forman filamentos microesferoidales periódicos de 11 nm (de tipo VI). De acuerdo con algunas formas de realización de este aspecto de la presente divulgación, el procolágeno comprende una cadena alfa 1 y/o 2 de colágeno de tipo I {por ejemplo, $[\alpha_1(I)]_2 \alpha_2(I)$; $[a_1(I)]_3$ } o de homotrímeros de colágeno (III) $[\alpha_1(III)]_3$.

De acuerdo con algunas formas de realización de este aspecto de la presente divulgación, el procolágeno se proporciona en forma de un monómero (debido a impedimentos estéricos que forman los propéptidos, y como tales son una propiedad intrínseca de la molécula de procolágeno).

Aunque el uso de fragmentos de procolágeno catalizados por collagenasa es ventajoso como una fuente para la señalización, puede ser preferida la aplicación de formas modificadas genéticamente de procolágeno cuando se intentan reclutar fibroblastos en un tejido en particular o para establecer una arquitectura funcional en un tejido. Más específicamente, para dichos fines pueden preferirse los colágenos resistentes a la collagenasa y similares [Wu et al., Proc Natl. Acad Sci, Vol. 87, págs. 5888 - 5892, 1990].

El procolágeno humano recombinante puede ser expresado en cualquier célula, que incluye, pero no se limita a, células procariotas (por ejemplo, bacterias), células vegetales y otras células eucariotas tales como de levaduras y de hongos, siempre que el procolágeno no esté sometido a la actividad de las proteinasas N y/o C.

La síntesis recombinante de procolágeno en levadura se ha descrito en la Patente de EE.UU. n° 5.593.859.

La síntesis recombinante de procolágeno en plantas se ha descrito en la Patente de EE.UU. n° 6.617.431.

Las plantas en las que puede producirse (es decir, expresarse) el procolágeno humano pueden ser cualquier planta inferior (por ejemplo, musgos y algas) o superior (vasculares), y pueden incluir tejidos o células aisladas y extractos de los mismos (por ejemplo, de una suspensión celular). Las plantas preferidas son aquellas que son capaces de acumular grandes cantidades de cadenas de colágeno, de colágeno y/o de las enzimas de procesamiento, según se describe a continuación en el presente documento. Dichas plantas también pueden seleccionarse de acuerdo con su resistencia a condiciones de estrés y a la facilidad con la que pueden extraerse los componentes expresados o el colágeno ensamblado. Algunos ejemplos de plantas en las que puede expresarse el procolágeno humano incluyen, pero no se limitan a, tabaco, maíz, alfalfa, arroz, patata, soja, tomate, trigo, cebada, colza, zanahoria, lechuga y algodón.

La producción de procolágeno humano recombinante se lleva a cabo normalmente mediante una transformación estable o temporal con una secuencia de polinucleótidos exógena que codifica para el procolágeno humano.

Algunos ejemplos de secuencias de polinucleótidos que codifican para el procolágeno humano son establecidos por las SEQ ID N°: 3 y 4.

La estabilidad de la estructura de hélice triple del colágeno requiere la hidroxilación de las prolinas por parte de la enzima prolil-4-hidroxilasa (P4H) para formar residuos de hidroxiprolina en la cadena de colágeno. Aunque las plantas son capaces de sintetizar proteínas que contienen hidroxiprolina, la hidroxilasa de prolil responsable de la síntesis de la hidroxiprolina en las células vegetales muestra una especificidad por la secuencia del sustrato relativamente baja en comparación con la P4H de mamífero, y por lo tanto, la producción de colágeno con hidroxiprolina únicamente en la posición Y de los tripletes de Gly-X-Y requiere la expresión conjunta de los genes de la P4H y del colágeno de seres humanos o de mamíferos.

Por lo tanto, de acuerdo con una forma de realización, el procolágeno es expresado en un compartimento subcelular de una planta que está desprovista de actividad endógena de P4H, de forma que se evite una incorrecta hidroxilación del mismo. Según se usa en el presente documento, la frase "compartimento subcelular desprovisto de actividad endógena de P4H" se refiere a cualquier región compartimentalizada de la célula que no incluye la P4H vegetal o una enzima que tenga una actividad similar a la de la P4H vegetal. De acuerdo con una forma de realización, el compartimento es una vacuola.

La acumulación del procolágeno expresado en un compartimento subcelular desprovisto de actividad endógena de P4H puede efectuarse a través de una cualquiera de diversas metodologías.

Por ejemplo, el procolágeno expresado puede incluir una secuencia de señalización para el direccionamiento de la proteína expresada a un compartimento subcelular tal como el apoplasto o un orgánulo (por ejemplo, un cloroplasto). Algunos ejemplos de secuencias de señalización adecuadas incluyen el péptido transitorio de cloroplastos (incluido en la entrada de Swiss-Prot P07689, aminoácidos 1 - 57, SEQ ID N°: 10) y el péptido transitorio mitocondrial (incluido en la entrada Swiss-Prot P46643, aminoácidos 1 - 28, SEQ ID N°: 11).

Alternativamente, la secuencia del procolágeno puede ser modificada de tal forma que se altere la localización celular del procolágeno cuando es expresado en plantas.

Algunas formas de realización de la presente divulgación contemplan por lo tanto células modificadas genéticamente que expresan conjuntamente tanto el procolágeno humano como una P4H, capaces de hidroxilar correctamente la(s) cadena(s) alfa del procolágeno [es decir, de hidroxilar únicamente la posición de la prolina (Y) de los tripletes de Gly-X-Y]. La P4H es una enzima formada por dos subunidades, alfa y beta, según se establece en los n° del Genbank P07237 y P13674. Ambas son necesarias para formar una enzima activa, mientras que la subunidad beta también posee una función de chaperona y de isomerasa de disulfuro de proteína.

La P4H expresada por las células modificadas genéticamente de la presente divulgación es preferiblemente una P4H humana que está codificada por, por ejemplo, las SEQ ID N°: 5 y 6. Además, también pueden usarse los mutantes de la P4H que muestran una especificidad de sustrato mejorada, o los homólogos de la P4H. Un homólogo adecuado de la P4H está ejemplificado por la oxidoreductasa de Arabidopsis identificada por el acceso del NCBI NP_179363.

Dado que la P4H es necesaria para acumular conjuntamente la cadena de procolágeno expresada, la secuencia codificante de la misma se modifica preferiblemente consecuentemente (por ejemplo, mediante la adición o la delección de secuencias de señalización, tales como para un direccionamiento vacuolar).

En las células de mamífero, el colágeno también es modificado por la hidroxilasa de lisilo, la galactosiltransferasa y la glucosiltransferasa. Estas enzimas modifican secuencialmente residuos de lisilo en posiciones específicas a residuos de hidroxilisilo, de galactosilhidroxilisilo y de glucosilgalactosil hidroxilisilo. Una única enzima, la hidroxilasa de lisilo 3 (LH3), según se establece en el Genbank N° 060568, puede catalizar las tres etapas consecutivas de la formación del carbohidrato unido a la hidroxilisina [Wang et al. Matrix Biol. 21 de noviembre de 2002; (7): 559 - 66].

Por lo tanto, las células modificadas genéticamente de la presente divulgación también pueden expresar la LH3 de mamífero. Para dichos fines puede usarse una secuencia que codifica para la LH3, tal como la que se establece en la SEQ ID N°: 9.

El (los) procolágeno(s) y las enzimas modificadoras descritas anteriormente pueden ser expresados a partir de un constructo de un ácido nucleico integrado de forma estable o expresado temporalmente que incluye secuencias de polinucleótidos codifican para las cadenas alfa de procolágeno y/o las enzimas modificadoras (por ejemplo, la P4H y la LH3) colocadas bajo el control transcripcional de promotores funcionales. Dicho constructo de ácido nucleico (también denominado en el presente documento constructo de expresión) puede ser configurado para su expresión por todo el organismo, por ejemplo, en una planta, en tejidos definidos o en células definidas, o en unas etapas de desarrollo definidas del organismo. Dicho constructo también puede incluir marcadores de selección (por ejemplo, de resistencia a antibióticos), elementos potenciadores y un origen de replicación para la replicación bacteriana.

Se apreciará que las construcciones que incluyen dos insertos expresables (por ejemplo, dos tipos de cadena alfa del procolágeno, o una cadena alfa y la P4H) incluyen preferiblemente un promotor individual para cada inserto, o como alternativa, dichos construcciones pueden expresar una única quimera transcrita que incluya ambas secuencias insertadas a partir de un único promotor. En dicho caso, el transcrito quimérico puede incluir una secuencia de un IRES entre las dos secuencias insertadas, de tal forma que, el inserto secuencia abajo, puede traducirse a partir de las mismas.

Las construcciones de la presente divulgación pueden utilizar numerosos promotores y potenciadores de expresión funcionales, que pueden ser específicos del tejido, específicos del desarrollo, constitutivos o inducibles, algunos ejemplos se proporcionan a continuación.

Según se usa en el presente documento en la memoria descriptiva, la frase "promotor vegetal" o "promotor" incluye un promotor que puede dirigir la expresión génica en células (incluyendo orgánulos que contienen ADN) de plantas, de hongos y de levaduras. Dicho promotor puede derivar de una planta, de una bacteria, de un virus, de un hongo o de un animal. Dicho promotor puede ser constitutivo, es decir, capaz de dirigir altos niveles de expresión génica en una pluralidad de tejidos, específico del tejido, es decir, capaz de dirigir la expresión génica en un tejido o tejidos en particular, inducible, es decir, capaz de dirigir la expresión génica bajo un estímulo, o quimérico, es decir, formado por porciones de al menos dos promotores diferentes.

Por lo tanto, el promotor vegetal empleado puede ser un promotor constitutivo, un promotor específico de tejido, un promotor inducible o un promotor quimérico.

Algunos ejemplos de promotores constitutivos incluyen, pero no se limitan a, los promotores CaMV35S y CaMV19S, el promotor FMV34S, el promotor del badnavirus bacilliform de la caña de azúcar, el promotor CsVMV, el promotor de la actina de Arabidopsis ACT2/ACT8, el promotor de la ubiquitina de Arabidopsis UBI1, el promotor de la tionina de la hoja de cebada BTH6 y el promotor de la actina del arroz.

Algunos ejemplos de promotores específicos de tejido incluyen, pero no se limitan a, el promotor de la proteína de almacenamiento de faseolina de la judía, el promotor DLEC, el promotor PHSD, el promotor de la proteína de almacenamiento de zeína, el promotor gamma de conglutina de soja, el promotor del gen AT2S1, el promotor de la actina ACT11 de Arabidopsis, el promotor napA de Brassica napus y el promotor del gen de la patatina de la patata.

El promotor inducible es un promotor inducido por un estímulo específico, tal como en unas condiciones de estrés que comprenden, por ejemplo, luz, temperatura, productos químicos, sequía, elevada salinidad, choque osmótico, condiciones oxidantes o estrés relacionado con patógenos, y que incluyen, pero no se limitan a, el promotor inducible por luz derivado del gen rbcS de guisante, el promotor del gen rbcS de la alfalfa, los promotores DRE, MYC y MYB activos durante la sequía; los promotores INT, INPS, prxEa, Ha hsp17.7G4 y RD21 activos con una elevada salinidad y estrés osmótico, y los promotores hsr203J y str246C activos en el estrés patógeno.

El promotor utilizado en la presente divulgación debería ser preferiblemente un fuerte promotor constitutivo, de forma que la sobreexpresión de los insertos del constructo se lleve a cabo después de la transformación.

Se apreciará que cualquiera de los tipos de construcciones usados en la presente divulgación puede ser transformados conjuntamente en las mismas células mediante el uso de los mismos marcadores de selección, o diferentes, para cada tipo de constructo. Alternativamente, puede introducirse el primer tipo de constructo en un primer organismo, por ejemplo, una planta, mientras que el segundo tipo de constructo puede introducirse en una segunda planta isogénica, tras lo cual las plantas transgénicas resultantes pueden cruzarse, y seleccionarse la progenie para los transformantes dobles. Pueden emplearse autocruces adicionales de dicha progenie para generar líneas homocigóticas para ambas construcciones.

Para la transformación de células de levaduras pueden usarse diversos vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles. Para una revisión, véase Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, 1988, ed. Ausubel et al., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, cap. 13; Grant et al., 1987, "Expression and Secretion Vectors

for Yeast," en *Methods in Enzymol.* 153: 516 - 544; Glover, 1986, *DNA Cloning*, Vol. II, IRL Press, Wash., D.C., Cap. 3; y Bitter, 1987, "Heterologous Gene Expression in Yeast," en *Methods in Enzymol.* 152: 673 - 684. Puede usarse un promotor constitutivo de levadura tal como ADH o Leu2, o un promotor inducible tal como GAL ("Cloning in Yeast," cap. 3, R. Rothstein en: *DNA Cloning*, Vol. 11, A Practical Approach, Ed. D. M. Glover, 1986, IRL Press, Wash. D.C.). Alternativamente, pueden usarse vectores que promuevan la integración de las secuencias de ADN foráneas en el cromosoma de la levadura.

Existen diversos métodos para la introducción de construcciones de ácidos nucleicos tanto en plantas monocotiledóneas como en dicotiledóneas (Potrykus, I., *Annu. Rev. Plant. Physiol., Plant. Mol. Biol.* (1991) 42: 205 - 225; Shimamoto et al., *Nature* (1989) 338: 274 - 276). Dichos métodos se basan en la integración estable del constructo de ácido nucleico o de una porción del mismo en el genoma de la planta, o en una expresión temporal del constructo de ácido nucleico en el caso de que estas secuencias no sean heredadas por la progenie de la planta.

Además, existen diversos métodos mediante los cuales puede introducirse directamente un constructo de un ácido nucleico en el ADN de un orgánulo que contiene ADN, tal como un cloroplasto.

Existen dos métodos principales para efectuar una integración genómica estable de secuencias exógenas, tales como las incluidas en las construcciones de ácidos nucleicos de la presente divulgación, en los genomas de plantas:

- (i) transferencia génica mediada por *Agrobacterium*: Klee et al. (1987) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38: 467 - 486; Klee y Rogers en *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 6, *Molecular Biology of Plant Nuclear Genes*, eds. Schell, J., y Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) págs. 2 - 25; Gatenby, en *Plant Biotechnology*, eds. Kung, S. y Arntzen, C. J., Butterworth Publishers, Boston, Mass. (1989) págs. 93 - 112.
- (ii) captación directa de ADN: Paszkowski et al., en *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 6, *Molecular Biology of Plant Nuclear Genes* eds. Schell, J., y Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) págs. 52 - 68; incluyendo los métodos para la captación directa de ADN en protoplastos, Toriyama, K. et al. (1988) *Bio/Technology* 6: 1072 - 1074. La captación de ADN inducida por un breve choque eléctrico en las células vegetales: Zhang et al. *Plant Cell Rep.* (1988) 7: 379 - 384. Fromm et al. *Nature* (1986) 319: 791 - 793. La inyección de ADN en células o tejidos vegetales mediante un bombardeo con partículas, Klein et al. *Bio/Technology* (1988) 6: 559 - 563; McCabe et al. *Bio/Technology* (1988) 6: 923 - 926; Sanford, *Physiol. Plant.* (1990) 79: 206 - 209; mediante el uso de sistemas de micropipeta: Neuhaus et al., *Theor. Appl. Genet.* (1987) 75: 30 - 36; Neuhaus y Spangenberg, *Physiol. Plant.* (1990) 79: 213 - 217; o mediante la incubación directa del ADN con polen en germinación, DeWet et al. en *Experimental Manipulation of Ovule Tissue*, eds. Chapman, G. P. y Mantell, S. H. y Daniels, W. Longman, Londres, (1985) págs. 197 - 209; y Ohta, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* (1986) 83: 715 - 719.

El sistema de *Agrobacterium* incluye el uso de vectores de plásmidos que contienen segmentos definidos de ADN que se integran en el ADN genómico de la planta. Los métodos de inoculación del tejido vegetal varían dependiendo de la especie vegetal y del sistema de suministro de *Agrobacterium*. Una metodología ampliamente usada es el procedimiento de disco de hoja, que puede llevarse a cabo con cualquier explante de tejido que proporcione una buena fuente para el inicio de una diferenciación vegetal completa (Horsch et al. en *Plant Molecular Biology Manual* A5, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988) págs. 1 - 9). Una metodología complementaria emplea el sistema de suministro de *Agrobacterium* junto con una infiltración a vacío. El sistema de *Agrobacterium* es especialmente viable en la creación de plantas dicotiledóneas transgénicas.

Existen diversos métodos de transferencia directa de ADN en células vegetales. En la electroporación, los protoplastos son brevemente expuestos a un fuerte campo eléctrico. En la microinyección, el ADN es inyectado mecánicamente directamente en las células mediante el uso de micropipetas muy pequeñas. En el bombardeo con micropartículas, el ADN es adsorbido sobre microproyectiles tales como cristales de sulfato de magnesio, partículas de tungsteno o partículas de oro, y los microproyectiles son acelerados físicamente en las células o en los tejidos vegetales.

Después de la transformación, se lleva a cabo la propagación de la planta. El método más habitual de propagación de la planta es mediante siembra. Sin embargo, la regeneración mediante la propagación por siembra tiene, el defecto de que debido a la heterozigotidad existe una ausencia de uniformidad en el cultivo, dado que las semillas son producidas por plantas de acuerdo con variantes genéticas gobernadas por las reglas de Mendel. Básicamente, cada semilla es genéticamente diferente, y cada una crecerá con sus propios rasgos específicos. Por lo tanto, se prefiere que la planta transformada sea producida de tal forma que la planta regenerada tenga unos rasgos y unas características idénticas a las de la planta transgénica parental. Por lo tanto, se prefiere que la planta transformada sea regenerada mediante micropropagación, lo que proporciona una reproducción rápida y coherente de las plantas transformadas.

Los métodos de expresión temporal que pueden ser utilizados para la expresión temporal del ácido nucleico aislado incluido en el constructo de ácido nucleico de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, microinyección y bombardeo, como se ha descrito anteriormente, pero en unas condiciones que favorecen una expresión temporal, y una expresión mediada por virus en la que se utiliza un vector de virus recombinante empaquetado o no

empaquetado que incluye el constructo de ácido nucleico para infectar tejidos o células de la planta, de forma que un virus recombinante en propagación establecido en la misma exprese la secuencia de ácidos nucleicos no vírica.

Los virus que han demostrado ser útiles para la transformación de hospedadores vegetales incluyen el CaMV, el TMV y el BV. La transformación de plantas mediante el uso de virus vegetales se describe en la Patente de EE.UU. nº 4.855.237 (BGV), en el documento EP-A 67,553 (TMV), en la Solicitud Japonesa Publicada Nº 63 - 14693 (TMV), en el documento EPA 194.809 (BV), en el documento EPA 278.667 (BV); y en Gluzman, Y. et al., Communications in Molecular Biology: Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, páginas 172 - 189 (1988). Las partículas de pseudovirus para su uso en la expresión de ADN foráneo en muchos hospedadores, incluyendo plantas, se describen en el documento WO 87/06261.

La construcción de virus de ARN vegetales para la introducción y la expresión de secuencias de ácidos nucleicos exógenas no víricas en plantas está demostrada por las referencias anteriores, así como por Dawson, W. O. et al., Virology (1989) 172: 285 - 292; por Takamatsu et al. EMBO J. (1987) 6: 307 - 311; French et al. Science (1986) 231: 1294 - 1297; y por Takamatsu et al. FEBS Letters (1990) 269: 73 - 76.

Cuando el virus es un virus de ADN, las construcciones pueden ser el propio virus. Alternativamente, se puede clonar en primer lugar el virus en un plásmido bacteriano para facilitar la construcción del vector vírico deseado con el ADN foráneo. El virus puede escindirse después del plásmido. Si el virus es un virus de ADN, puede unirse un origen de replicación bacteriano al ADN vírico, que a continuación es replicado por la bacteria. La transcripción y la traducción de este ADN producirán la proteína de recubrimiento que encapsula el ADN vírico. Si el virus es un virus de ARN, el virus generalmente se clona en forma de un ADNc y se inserta en un plásmido. Después se usa el plásmido para crear todas las construcciones. El virus de ARN se produce después mediante la transcripción de la secuencia vírica del plásmido y la traducción de los genes víricos, para producir la(s) proteína(s) de recubrimiento que encapsula(n) el ARN vírico.

La construcción de virus de ARN vegetales para la introducción y la expresión en plantas de secuencias de ácidos nucleicos exógenas no víricas tales como las incluidas en el constructo de la presente divulgación, está demostrada por las referencias anteriores, así como en la Patente de EE.UU. nº 5.316.931.

Se conoce una técnica para la introducción de secuencias de ácidos nucleicos exógenas en el genoma de los cloroplastos. Esta técnica implica los siguientes procedimientos. En primer lugar se introduce el ácido nucleico exógeno mediante un bombardeo con partículas en las células, con el fin de introducir al menos una molécula de ácido nucleico exógena en los cloroplastos. El ácido nucleico exógeno se selecciona de tal forma que sea integrable en el genoma de cloroplasto a través de una recombinación homóloga, que es fácilmente llevada a cabo por las propias enzimas del cloroplasto. A tal fin, el ácido nucleico exógeno incluye, además del gen de interés, al menos una extensión de ácidos nucleicos que deriva del genoma de cloroplasto. Además, el ácido nucleico exógeno incluye un marcador seleccionable que sirve, mediante procedimientos de selección secuencial, para comprobar que todas o sustancialmente todas las copias de los genomas del cloroplasto después de dicha selección incluyen el ácido nucleico exógeno. Los detalles adicionales relativos a esta técnica se encuentran en las Patentes de EE.UU. nº 4.945.050; y 5.693.507. Por lo tanto, así se puede producir un polipéptido mediante el sistema de expresión de proteínas de cloroplasto, y quedar integrado en la membrana interna de cloroplasto.

Independientemente de la técnica usada para la transformación, una vez que se ha identificado la progenie que expresa el procolágeno, dichas plantas se cultivan adicionalmente en unas condiciones que maximizan la expresión del mismo. La progenie resultante de las plantas transformadas puede ser seleccionada mediante la verificación de la presencia del ARNm y/o de los polipéptidos exógenos mediante el uso de sondas de ácido nucleico o de proteína (por ejemplo, anticuerpos). Esta última metodología permite la localización de los componentes polipeptídicos expresados (por ejemplo, mediante el sondeo de extractos vegetales fraccionados) y por lo tanto se verifica también el potencial de un correcto procesado y ensamblaje.

Después del cultivo de dichas plantas normalmente se recoge el procolágeno. Los tejidos / células vegetales se recogen preferiblemente en la madurez, y las moléculas de procolágeno se aíslan mediante el uso de cualquier método bioquímico conocido en la materia.

Por lo tanto, las formas de realización de la presente divulgación proporcionan adicionalmente un método para la purificación del procolágeno.

El método comprende proporcionar una preparación de procolágeno y purificar el procolágeno.

El procolágeno puede ser regenerado mediante el uso de cualquier método conocido en la materia (por ejemplo, los descritos anteriormente).

El procolágeno puede ser purificado total o parcialmente mediante el uso de cualquier técnica de purificación de proteínas conocida en la materia. Estos métodos se basan normalmente en la purificación según el tamaño, la carga o la afinidad de unión.

De acuerdo con una forma de realización, el procolágeno está comprendido en una composición que contiene procolágeno, en la que al menos el 0,1 %, al menos el 0,25 %, al menos el 0,5 %, al menos el 1 %, al menos el 2.5 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 99 % o el 100 % es procolágeno. Otros componentes comprendidos en la composición de procolágeno pueden incluir, pero no se limitan a, colágeno, ácido hialurónico, alginato, carboximetil celulosa, hidroximetil celulosa, hidroxietil celulosa, celulosa oxidada, vibrisas de celulosa y almidón.

Según se usa en el presente documento, "purificar" se refiere al aislamiento de la proteína a partir de su entorno o sitio natural de acumulación en el hospedador recombinante. La separación a partir de moléculas pequeñas se lleva a cabo normalmente mediante una diálisis, tal como mediante el uso de membranas de celulosa. Normalmente se usa una cromatografía de filtración en gel como una técnica más discriminativa. Alternativamente o adicionalmente se usa una precipitación salina, tal como con sulfato de amonio, que normalmente se usa para la purificación de proteínas, por ejemplo, para precipitar el fibrinógeno. Como una alternativa más, o adicionalmente, se usa una cromatografía de intercambio iónico para separar el procolágeno sobre la base de su carga neta. La cromatografía de afinidad es otra potente metodología para el aislamiento de las proteínas de interés. Más específicamente, pueden usarse anticuerpos o métodos de unión por afinidad basados en las fuerzas de atracción naturales de la proteína hacia ciertos grupos químicos.

Algunos ejemplos de métodos de purificación o de semipurificación del procolágeno de la presente divulgación se describen con detalle en la sección de Ejemplos que sigue.

Independientemente del método de producción, una vez que el procolágeno está disponible, puede ser administrado al sujeto como tal o en una composición farmacéutica.

Según se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de los principios activos descritos en el presente documento con otros componentes químicos tales como portadores y excipientes fisiológicamente adecuados. El objetivo de la composición farmacéutica es facilitar la administración de los principios activos (por ejemplo, del procolágeno) al sujeto.

Según se usa en el presente documento, el término "principio activo" se refiere al procolágeno responsable del efecto biológico previsto (es decir, de promover la curación de heridas y el tratamiento de la fibrosis).

En lo sucesivo, las frases "portador fisiológicamente aceptable" y "portador farmacéuticamente aceptable", que pueden usarse de forma intercambiable, se refieren a un portador o a un diluyente que no provoca ninguna irritación significativa en el sujeto y que no anula la actividad biológica ni las propiedades de los principios activos administrados. En estas frases se incluye un adyuvante.

En el presente documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a la composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un principio activo de la presente divulgación.

Las técnicas para la formulación y la administración de fármacos pueden encontrarse en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

La composición farmacéutica puede formularse en forma de una forma de dosificación unitaria. En dicha forma, la preparación está subdividida en dosis unitarias que contienen las cantidades apropiadas de los principios activos, tal como para una administración individual. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades individuales de la preparación, por ejemplo, un vendaje adhesivo, un vendaje no adhesivo, una toallita, una toallita para bebés, una gasa, una almohadilla y una compresa.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden ser aplicadas de una forma local, por ejemplo, a través de la administración de las composiciones directamente en una región de tejido (por ejemplo, en una herida) del sujeto. Las vías de administración adecuadas de las composiciones farmacéuticas pueden incluir, por ejemplo, una administración tópica (por ejemplo, en un tejido queratinoso, tal como la piel, el cabello, la uña, el cuero cabelludo), subcutánea, mucosal (por ejemplo, oral, vaginal, ocular), intramuscular.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación también pueden ser aplicadas mediante la inyección de la composición que incluye el principio activo y un portador fisiológicamente aceptable. Para su administración local, las composiciones pueden ser inyectadas en la herida y/o en el tejido sano (por ejemplo, la piel) que rodea el tejido herido, o ambos, por ejemplo, subcutáneas.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden ser elaboradas mediante procesos bien conocidos en la materia, por ejemplo, mediante procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, elaboración de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

El principio activo también puede estar en forma de un polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, con una solución basada en agua estéril exenta de pirógenos, antes de su uso.

Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente divulgación pueden formularse por lo tanto de una forma convencional mediante el uso de uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los principios activos en las preparaciones. La formulación apropiada depende de la metodología de administración elegida.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está en la pericia de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento. El tratamiento puede llevarse a cabo antes de la formación de tejido cicatricial masivo, tal como antes del reclutamiento de los fibroblastos al sitio afectado. Sin embargo, la presente divulgación también contempla la administración del procolágeno en cualquier otra fase de la curación.

Para cualquier preparación usada en el método de la divulgación, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Además, puede formularse una dosis en sistemas de cultivo tisulares o en modelos animales para conseguir una concentración o título deseado. Los modelos animales pueden usarse con objeto de establecer los criterios de administración. Por ejemplo, puede usarse un modelo de rata diabética o de herida en ratón [Galeano et al., Diabetes. (2004) 53 (9): 2509 - 17]. Puede emplearse el resultado de las medidas, tales como la perfusión y la supervivencia, así como criterios histológicos y funcionales, para evaluar la eficacia de los diferentes parámetros, con objeto de conseguir una eficacia óptima de la metodología.

Dicha información puede usarse para determinar de forma más precisa las dosis útiles en seres humanos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los principios activos descritos en el presente documento pueden ser determinadas mediante los procedimientos farmacéuticos habituales *in vitro*, en cultivos celulares o en animales de experimentación. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos *in vitro* y de cultivos celulares y de estudios animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosis puede variar dependiendo del tipo de formulación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosis pueden ser elegidas por el médico individual dependiendo del estado del paciente (Véase, por ejemplo, Fingl, E. et al. (1975), "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1, pág. 1.)

Dependiendo de la gravedad de la afección (por ejemplo, el área, la profundidad y el grado de la herida o de la cicatriz) y de la sensibilidad de la piel, la dosis puede ser una administración individual o una pluralidad de administraciones, variando la duración del tratamiento desde varios días hasta varias semanas o hasta que se produce la curación o hasta que se consigue una disminución en la afección. En las formas de realización ejemplares, la composición farmacéutica de la presente divulgación se administra al menos una vez al día.

La cantidad de composición que se administrará dependerá, por supuesto, del sujeto que se va a tratar, de la gravedad de la afección, de la forma de administración, de juicio del médico prescriptor, etc.

Las composiciones de la presente divulgación pueden presentarse, si se desea, en un paquete o en un dispositivo dispensador, tal como en un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el principio activo. El paquete puede comprender, por ejemplo, una lámina metálica plástica, tal como un envase alveolado. El paquete o el dispositivo dispensador pueden estar acompañados por unas instrucciones de administración. El paquete o el dispositivo dispensador pueden estar acompañados por un aviso con la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la elaboración, el uso o la venta de productos farmacéuticos, que refleje la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones para su administración humana o veterinaria. Dicho aviso puede incluir, por ejemplo, un etiquetado aprobado por la Food and Drug Administration de EE.UU. por la prescripción de fármacos o de un prospecto de un producto aprobado. Las composiciones que comprenden una preparación de la divulgación formulada en un portador farmacéuticamente aceptable también pueden ser preparadas, colocadas en un recipiente adecuado y etiquetadas para el tratamiento de una afección indicada, como se detalla adicionalmente a continuación.

Dado que las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se utilizan *in vivo*, las composiciones tienen preferiblemente una pureza elevada y están sustancialmente exentas de contaminantes potencialmente perjudiciales, por ejemplo, al menos de calidad National Food (NF), generalmente al menos de calidad analítica, y preferiblemente al menos de calidad farmacéutica. Dado que un compuesto dado debe ser sintetizado antes de su uso, dicha síntesis o la posterior purificación deben dar como resultado preferiblemente un producto que esté sustancialmente exento de cualquier agente tóxico potencialmente contaminante que pueda haber sido usado durante los procedimientos de síntesis o de purificación.

Para mejorar la eficacia terapéutica pueden incorporarse agentes adicionales en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación. Los agentes para la promoción de la curación de heridas, el tratamiento de la fibrosis y/o la promoción de la angiogénesis pueden ser formulados en una única composición junto con el procolágeno (por ejemplo, en un único recipiente) o cuando se desee, envasarse en recipientes por separado e incluirse en un artículo

- de elaboración, que puede comprender adicionalmente instrucciones para su uso. Dichos agentes incluyen, pero no se limitan a, componentes de la matriz extracelular (por ejemplo, vitronectina, laminina, colágeno, elastina), factores de crecimiento (por ejemplo, FGF 1, FGF 2, IGF 1, IGF 2, PDGF, EGF, KGF, HGF, VEGF, SDF-1, GM-CSF, CSF, G-CSF, TGF alfa, TGF beta, NGF, PDWHF y ECGF), factores inducibles por hipoxia (por ejemplo, HIF-1 alfa y beta y HIF-2), hormonas (por ejemplo, insulina, hormona del crecimiento (GH), CRH, leptina, prolactina, oxandrolona y TSH), factores angiogénicos (por ejemplo, angiogenina y angiopoyetina), factores de la coagulación y de la anticoagulación (por ejemplo, Factor I, Factor XIII, tejido factor, calcio, vWF, proteína C, proteína S, proteína Z, fibronectina, antitrombina, heparina, plasminógeno, heparina de bajo peso molecular (Clixan), cininógeno de alto peso molecular (HMK), precalicreína, inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PA11), inhibidor del activador del plasminógeno 2 (PAI2), urocinasa, trombomodulina, activador tisular del plasminógeno (tPA), alfa 2-antiplasmina e inhibidor de la proteasa relacionado con la proteína Z (ZPI)), citocinas (IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13 y IFN-alfa, IFN, beta e IFN-gamma), proteínas morfogénicas óseas (BMP), quimiocinas (por ejemplo, MCP-1 o CCL2), enzimas (por ejemplo, endoglucosidasas, exoglucosidasas, endonucleasas, exonucleasas, peptidasas, lipasas, oxidasas, descarboxilasas, hidrasas, condroitinasa, condroitinasa ABC, condroitinasa AC, hialuronidasa, queratanasa, heparanasas, variantes de empalme de la heparanasa, colagenasa, tripsina, catalasas), neurotransmisores (por ejemplo, acetilcolina y monoaminas), neuropéptidos (por ejemplo, la sustancia P), vitaminas (por ejemplo, D-biotina, cloruro de colina, ácido fólico, mioinositol, niacinamida, ácido D-pantoténico, sales de calcio, HCl de piridoxal, HCl de piridoxina, riboflavina, HCl de tiamina, vitamina B12, vitamina E, vitamina C, vitamina D, vitaminas B 1 - 6, vitamina K, vitamina A y vitamina PP), carbohidratos (por ejemplo, mono / di / polisacáridos incluyendo glucosa, manosa, maltosa y fructosa), iones, quelantes (por ejemplo, quelantes de Fe, quelantes de Ca), antioxidantes (por ejemplo, vitamina E, quercetina, capturadores de superóxido, dismutasa de superóxido, capturadores de H_2O_2 , capturadores de radicales libres, capturadores de Fe), ácidos grasos (por ejemplo, triglicéridos, fosfolípidos, colesterol, ácidos grasos libres y ácidos grasos no libres, alcoholes grasos, ácido linoleico, ácido oleico y ácido lipoico), antibióticos (por ejemplo, penicilinas, cefalosporinas y tetraciclinas), analgésicos, anestésicos, agentes antibacterianos, agentes antilevaduras, agentes antifúngicos, agentes antivíricos, agentes probióticos, agentes antiparazitarios, agentes antipruriginosos, agentes antidermatitis, antieméticos, agentes antiinflamatorios, agentes antihiperqueratolíticos, antitranspirantes, agentes antipsoriáticos, agentes antiseborreicos, agentes antihistamínicos, aminoácidos (por ejemplo, esenciales y no esenciales, especialmente glutamina y arginina), sales de sulfatos (por ejemplo, sulfato de calcio), esteroides (por ejemplo, andrógenos, estrógenos, progestágenos, glucocorticoides y mineralocorticoides), catecolaminas (por ejemplo, epinefrina y norepinefrina), nucleósidos y nucleótidos (por ejemplo, purinas y pirimidinas), prostaglandinas (por ejemplo, prostaglandina E2), leucotrienos, eritropoyetinas (por ejemplo, trombopoyetina), proteoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparán, sulfato de queratán), hidroxiapatitas (por ejemplo, hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)), haptoglobinas (Hp1-1, Hp2-2 y Hp1-2), dismutasas de superóxido (por ejemplo, SOD 1 / 2 / 3), óxidos nítricos, donantes de óxido nítrico (por ejemplo, nitroprusiato, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU., peroxidasas de glutatión, compuestos humectantes (por ejemplo, vasopresina), células (por ejemplo, plaquetas), medio celular (por ejemplo, M199, DMEM/F12, RPMI, Iscoves), suero (por ejemplo, suero humano, suero bovino fetal), tampones (por ejemplo, HEPES, bicarbonato de sodio), detergentes (por ejemplo, Tween), desinfectantes, plantas medicinales, extractos de frutas, extractos vegetales (por ejemplo, de col, de pepino), extractos florales, extractos vegetales, flavinoides (por ejemplo, zumo de granada), especias, hojas (por ejemplo, té verde), polifenoles (por ejemplo, vino tinto), miel, lectinas, micropartículas, nanopartículas (liposomas), micelas, carbonato de calcio ($CaCO_3$, por ejemplo, carbonato de calcio precipitado, carbonato de calcio molido / pulverizado, albacar, PCC, GCC), calcita, caliza, mármol molido, caliza molida, cal y tiza (por ejemplo, tiza blanca, tiza champán, tiza francesa).
- Las presentes composiciones también pueden contener ingredientes, sustancias, elementos y materiales que contienen hidrógeno, grupos alquilo, grupos arilo, grupos halo, grupos hidroxilo, grupos alcoxi, grupos alquilamino, grupos dialquilamino, grupos acilo, grupos carboxilo, grupos carboamido, grupos sulfonamida, grupos aminoacilo, grupos amida, grupos amina, grupos nitro, compuestos de organoselenio, hidrocarburos e hidrocarburos cíclicos.
- Las presentes composiciones pueden combinarse con sustancias tales como peróxido de benzol, vasoconstrictores, vasodilatadores, ácido salicílico, ácido retinoico, ácido azelaico, ácido láctico, ácido glicólico, ácido pirolico, taninos, bencilidencanfor y derivados de los mismos, alfa hidroxis, tensioactivos.
- Las composiciones de algunas formas de realización de la presente divulgación pueden estar bioconjugadas con polietilenglicol (por ejemplo, PEG, SE-PEG) que preserva la estabilidad (por ejemplo, frente a actividades de proteasa) y/o la solubilidad (por ejemplo, en un fluido biológico tal como la sangre, los jugos digestivos) de los principios activos, preservando su actividad biológica y prolongando su semivida.
- Las composiciones de la presente divulgación pueden formularse en forma de masillas, ungüentos, inhalantes, almohadillas tejidas / no tejidas, vendajes, esponjas, geles o hidrogeles, (formulados con, por ejemplo, gelatina, ácido hialurónico) o sobre la base de un poliacrilato o de un oleogel (por ejemplo, hecho de agua y Eucerin).
- Los oleogeles que comprenden una fase tanto acuosa como grasa se basan particularmente en Eucerinum anhidricum, una base de alcoholes de parafina y parafina, en la que el porcentaje de agua y de la base puede variar. Adicionalmente pueden añadirse algunos componentes lipófilos adicionales para que influyan en la consistencia, por ejemplo, glicerina, polietilenglicoles de diferentes longitudes de cadena, por ejemplo, PEG400, aceites vegetales

tales como aceite de almendras, parafina líquida, aceite neutro, y similares. Los hidrogeles de la presente divulgación pueden producirse mediante el uso de agentes formadores de geles y agua, en los que los primeros se seleccionan especialmente de entre productos naturales tales como derivados de celulosa, tales como éster y éter celulosa, por ejemplo, derivados de hidroxietil-hidroxipropilo, por ejemplo, tilosa, o también a partir de productos sintéticos tales como derivados del ácido poliacrílico, tales como Carbopol o Carbómero, por ejemplo, P934, P940, P941. Pueden ser producidos o polimerizados basándose en normas conocidas, a partir de suspensiones alcohólicas, mediante la adición de bases para la formación de un gel.

Algunos ejemplos de cantidades de procolágeno en el gel incluyen 0,01 - 30 g por 100 g de gel, 0,01 - 10 g por 100 g de gel, 0,01 - 8 g por 100 g de gel, 0,1 - 5 g por 100 g de gel.

Además, las composiciones farmacéuticas de este aspecto de la presente divulgación también incluyen un portador dermatológicamente aceptable.

La expresión "portador dermatológicamente aceptable", se refiere a un portador que es adecuado para su aplicación tópica sobre la piel, es decir, el tejido queratinoso, tiene unas buenas propiedades estéticas, es compatible con los agentes activos de la presente divulgación y con cualquier otro componente, y es seguro y no tóxico para su uso en mamíferos.

Con objeto de mejorar la absorción percutánea del principio activo, pueden añadirse uno o más de diversos agentes a las composiciones farmacéuticas, incluyendo, pero no se limitan a, dimetilsulfóxido, dimetilacetamida, dimetilformamida, tensioactivos, azona, alcohol, acetona, propilenglicol y polietilenglicol.

El portador utilizado en las composiciones de la divulgación puede estar en una gran diversidad de formas. Estas incluyen portadores en emulsión, que incluyen, pero no se limitan a, emulsiones de aceite en agua, de agua en aceite, de agua en aceite en agua y de aceite en agua en silicona, una crema, un ungüento, una solución acuosa, una loción, un jabón, una pasta, una emulsión, un gel, un nebulizador, una espuma o un aerosol. Como comprenderá el artesano experto, un componente dado se distribuirá principalmente en la fase acuosa o en la fase de aceite / silicona, dependiendo de la solubilidad / dispersibilidad en agua del componente en la composición.

Las emulsiones de acuerdo con la presente divulgación contienen generalmente una cantidad farmacéuticamente eficaz del agente divulgado en el presente documento, y un lípido o un aceite. Los lípidos y los aceites pueden derivar de animales, de plantas o del petróleo, y pueden ser naturales o sintéticos (es decir, elaborados artificialmente). Algunos ejemplos de emulsionantes adecuados se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. nº 3.755.560, concedida a Dickert, et al., 28 de agosto de 1973; en la Patente de EE.UU. nº 4.421.769, concedida a Dixon, et al., 20 de diciembre de 1983; y en McCutcheon's Detergents and Emulsifiers, edición norteamericana, páginas 317 - 324 (1986).

La emulsión también puede contener un agente antiespumante para minimizar la formación de espuma tras su aplicación en el tejido queratinoso. Algunos agentes antiespumantes incluyen siliconas de alto peso molecular y otros materiales muy conocidos en la materia para dicho uso.

Las emulsiones adecuadas pueden tener una amplia variedad de viscosidades, dependiendo la forma del producto deseado.

Algunos ejemplos de portadores adecuados que comprenden emulsiones de aceite en agua se describen en la Patente de EE.UU. nº 5.073.371 a favor de Turner, D. J. et al., concedida el 17 de diciembre de 1991, y en la Patente de EE.UU. nº 5.073.372, a favor de Turner, D. J. et al., concedida el 17 de diciembre de 1991. Una emulsión de aceite en agua especialmente preferida, que contiene un agente de estructuración, un tensioactivo hidrófilo y agua, se describe con detalle a continuación.

Una emulsión de aceite en agua preferida comprende un agente de estructuración para ayudar en la formación de una estructura reticular de un gel cristalino líquido. Sin estar ceñidos a ninguna teoría, se cree que el agente de estructuración ayuda a proporcionar unas características reológicas a la composición que contribuyen a la estabilidad de la composición. El agente de estructuración también puede funcionar como emulsionante o como tensioactivo.

En el presente documento también son útiles una amplia variedad de tensioactivos aniónicos. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 3.929.678, a favor de Laughlin et al., concedida el 30 de diciembre de 1975. Además, en el presente documento también son útiles los tensioactivos anfóteros y bipolares.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden ser formuladas en cualquiera de una diversidad de las formas utilizadas por la industria farmacéutica o cosmética para su aplicación en la piel, incluyendo soluciones, lociones, aerosoles, cremas, ungüentos, bálsamos, geles, aceites, lavados, etc., como se describe a continuación.

Las composiciones farmacéuticas o cosméticas de la presente divulgación pueden ser formuladas para que sean lo suficientemente viscosas como para permanecer en el área de la piel tratada, que no se evaporen fácilmente y/o que nos eliminen fácilmente con un aclarado con agua, sino que más bien se eliminen con la ayuda de jabones, limpiadores y/o champús.

5 Los métodos para la preparación de las composiciones que tienen dichas propiedades son bien conocidos por los expertos en la materia, y se describen con detalle en Remington's Pharmaceutical Sciences, 1990 (*supra*); y en Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 6ª ed., Williams & Wilkins (1995).

10 Las composiciones tópicas de la divulgación en cuestión, que incluyen, pero no se limitan a, lociones y cremas, pueden comprender un emoliente dermatológicamente aceptable. Según se usa en el presente documento, "emoliente" se refiere a un material útil para la prevención o el alivio de la sequedad, así como para la protección de la piel. Se conoce una amplia variedad de emolientes adecuados, y pueden ser usados en el presente documento. Véase, por ejemplo, Sagarin, Cosmetics, Science and Technology, 2ª Edición, Vol. 1, página 3243 (1972), que
15 contiene numerosos ejemplos de materiales adecuados como emolientes. Un emoliente preferido es la glicerina.

Las lociones y las cremas de acuerdo con la presente divulgación comprenden generalmente un sistema portador en solución y uno o más emolientes.

20 La composición farmacéutica o cosmética aplicada tópicamente de la presente divulgación también puede incluir componentes adicionales que se añaden, por ejemplo, con objeto de enriquecer las composiciones farmacéuticas o cosméticas con una fragancia y factores de nutrición de la piel.

25 Dichos componentes se seleccionan adecuados para su uso sobre tejido queratinoso humano sin la inducción de toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica, y similares en el ámbito de un juicio médico razonable. Además, dichos componentes óptimos son útilmente proporcionados de forma que no alteren de forma inaceptable los beneficios de los compuestos activos de la divulgación.

30 El CTFA Cosmetic Ingredient Handbook, segunda edición (1992) describe una gran diversidad de ingredientes cosméticos no limitantes usados habitualmente en la industria del cuidado de la piel, que son adecuados para su uso en las composiciones de la presente divulgación. Algunos ejemplos de estas clases de ingredientes incluyen: abrasivos, absorbentes, componentes estéticos tales como fragancias, pigmentos, colorantes, aceites esenciales, estimulantes para la piel, astringentes, etc. (por ejemplo, aceite de clavo, mentol, canfor, aceite de eucalipto, eugenol, lactato de mentilo, destilado de agua de hamamelis), agentes antiacné, agentes antiapelmazantes, agentes
35 antiespumantes, agentes antimicrobianos (por ejemplo, butilcarbamato de yodopropilo), antioxidantes, aglutinantes, aditivos biológicos, agentes tamponantes, agentes de volumen, agentes quelantes, aditivos químicos, colorantes, astringentes cosméticos, biocidas cosméticos, desnaturalizantes, astringentes farmacológicos, analgésicos externos, formadores de película o materiales, por ejemplo, polímeros, cuadyuvantes de las propiedades formadoras de película y de la sustantividad de la composición (por ejemplo, copolímero de eicoseno y vinil pirrolidona), agentes
40 opacificantes, ajustadores del pH, propelentes, agentes reductores, secuestrantes, agentes acondicionadores de la piel (por ejemplo, humectantes, incluyendo diversos y oclusivos), agentes suavizantes y/o curativos de la piel (por ejemplo, pantenol y sus derivados, por ejemplo, etil pantenol), aloe vera, ácido pantoténico y sus derivados, alantoina, bisabolol, y glicirricinato de dipotasio, agentes para el tratamiento de la piel, espesantes, y vitaminas y derivados de los mismos.

45 Se apreciará que el procolágeno de la presente divulgación puede ser incorporado en productos ya desarrollados o que están siendo desarrollados por compañías cosméticas, que incluyen, pero no se limitan a, Estee Lauder, Helena Rubinstein y L'Oreal.

50 Las composiciones farmacéuticas o cosméticas de la presente divulgación pueden ser aplicadas directamente sobre la piel. Alternativamente, pueden ser administradas a través de una aplicación cutánea normal mediante diversos sistemas de administración transdérmica de fármacos que son conocidos en la materia, tales como parches transdérmicos que liberan la composición en la piel de una forma controlada en el tiempo. Otros sistemas de administración de fármacos conocidos en la materia incluyen frascos de aerosol presurizados, iontoforesis o
55 sonoforesis. La iontoforesis se emplea para aumentar la permeabilidad de la piel y facilitar la administración transdérmica. Las Patentes de EE.UU. nº 5.667.487 y 5.658.247 desvelan un aparato ionosónico adecuado para el transporte iontoforético mediado por ultrasonidos de agentes terapéuticos a través de la piel. Alternativamente, o además, también pueden emplearse liposomas o micelas como vehículos de administración.

60 Dado que las heridas y la isquemia pueden implicar al cuero cabelludo, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen adicionalmente emolientes, tensioactivos y/o acondicionadores que son adecuados para su uso en la piel del cuero cabelludo y en el cabello.

65 Algunos emolientes incluyen, pero no se limitan a, aceites hidrocarbonados y ceras, tales como aceite mineral, vaselina, y similares, aceites y grasas vegetales y animales, tales como aceite de oliva, aceite de palma, aceite de ricino, aceite de maíz, aceite de soja, y similares, y lanolina y sus derivados, tales como lanolina, aceite de lanolina,

cera de lanolina, alcoholes de lanolina, y similares. Otros emolientes incluyen ésteres de ácidos grasos con entre 10 y 20 átomos de carbono, tales como, incluyendo mirístico, esteárico, isoesteárico, palmítico, y similares, tales como miristato de metilo, miristato de propilo, miristato de butilo, estearato de propilo, isoestearato de propilo, palmitato de propilo, y similares. Otros emolientes incluyen ácidos grasos con entre 10 y 20 átomos de carbono, incluyendo esteárico, mirístico, láurico, isoesteárico, palmítico, y similares. Algunos emolientes también incluyen alcoholes grasos con entre 10 y 20 átomos de carbono, tales como cetilo, miristilo, laurilo, isoestearilo, estearilo y similares.

Preferiblemente, se utiliza un emulsionante / tensioactivo cuando las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se formulan para su uso sobre el cabello.

Algunos ejemplos de tensioactivos incluyen, pero no se limitan a, los productos de condensación de óxido de espoxialquileno de grupos funcionales aromáticos hidrófobos alquilo, alqueno o alquilo que tienen un hidrógeno reactivo libre disponible para su condensación, con óxido de alquilo hidrófilo, óxido de polietileno, óxido de propileno, óxido de butileno, óxido de polietileno o polietilenglicol. Particularmente eficaces son los productos de condensación del octilfenol con entre 7 y 13 moles de óxido de etileno, vendidos por Rohm & Haas Company con el nombre comercial de productos de la serie TRITON 100®.

Otros ingredientes tales como, fragancias, agentes estabilizantes, colorantes, agentes antimicrobianos, agentes antibacterianos, antiaglomerantes, absorbentes de radiación ultravioleta, y similares, también están incluidos en la composición de la presente divulgación que se formula para su uso sobre el cabello.

También se utiliza un agente acondicionador estable frente a una hidrólisis ácida, tal como un compuesto de silicona que tiene al menos una fracción de amonio cuaternario junto con un monoquat etoxilado con objeto de estabilizar, y opcionalmente de espesar, la composición de la presente divulgación que se formula para su uso sobre el cabello.

También puede incluirse un espesante opcional para mejorar la estética de la composición y facilitar la aplicación de la composición sobre el cabello. Algunos ejemplos de espesantes son metil celulosa, hidroxibutil metil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, hidroxietil etil celulosa e hidroxietil celulosa, di amida (sebo hidrogenado) del ácido ftálico, copolímero reticulado de anhídrido maleico-metil vinil éter, goma guar, goma xántica y goma arábica.

El portador de la composición acondicionadora es predominantemente agua, pero también pueden incluirse disolventes orgánicos con objeto de facilitar la elaboración de la composición o para proporcionar propiedades estéticas, tales como un control de la viscosidad. Algunos disolventes adecuados incluyen alcoholes inferiores tales como alcohol etílico y alcohol isopropílico; éteres de glicol, como 2-butoxietanol, etilenglicol monoetil éter, propilenglicol y dietilenglicol monoetil éter o monometil éter y mezclas de los mismos. Algunos agentes acondicionadores no limitantes que pueden usarse en acondicionadores opacos incluyen: cloruro de esteariltrimetilamonio; cloruro de beheniltrimetilamonio; bromuro de cetrimonio; cloruro de sojatrimeronio; cloruro de sebotrimeronio; cloruro de sebodimetilamonio dihidrogenado; metosulfato de beheniltrimetilamonio; cloruro de Peg-2 oleamonio; bromuro de sebodimetilamonio dihidrogenado; metosulfato de sebodimetilamonio dihidrogenado; cloruro de palmitiltrimetilamonio; cloruro de sebotrimeronio hidrogenado; bromuro de sebotrimeronio dihidrogenado; cloruro de dicetildimetilamonio; cloruro de diestearildimetilamonio; cloruro de dipalmitildimetilamonio; metosulfato de sebotrimeronio dihidrogenado; tosilato de cetrimonio; cloruro de eicosiltrimetilamonio y cloruro de disebodimetilamonio.

Las formulaciones de champú son en ocasiones ventajosas para el tratamiento de afecciones de la piel del cuero cabelludo (por ejemplo, lesiones, psoriasis).

La composición de champú para el cabello de la presente divulgación puede proporcionarse en cualquier forma seleccionada de entre un líquido, un polvo, un gel y un gránulo, según sea necesario. Se prefiere una composición líquida mediante el uso de agua o de un alcohol inferior como disolvente, siendo especialmente preferida una composición líquida mediante el uso de agua. Las composiciones de champú que pueden usarse de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación se describen adicionalmente en la Patente de EE.UU. nº 6194363 y en la Patente de EE.UU. nº 6007802.

Se apreciará que el procolágeno de la presente divulgación puede ser incorporado en matrices basadas en polímeros biocompatibles y/o biodegradables, incluyendo láminas, películas, esponjas de membrana y geles.

El procolágeno puede ser absorbido o encapsulado en matrices basadas en polímeros biocompatibles o, como alternativa, reticulado activamente con dichas construcciones mediante la exposición a una radiación ultravioleta, técnicas deshidrotérmicas (DHT) o a través de reactivos químicos tales como el reticulador de longitud cero clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (Cornwell KG, et al., Biomed Mater Res A. Febrero de 2007; 80 (2): 362 - 71). Los protocolos detallados de cómo puede incorporarse el procolágeno de la presente divulgación en matrices de colágeno se proporcionan en el siguiente Ejemplo 2 del presente documento.

El procolágeno de la divulgación puede ser incluido en componentes de matrices acelulares biodegradables. Un componente de matriz acelular generalmente juega un papel estructural. Por ejemplo, puede rellenar un defecto, un orificio, un espacio o una cavidad del tejido y proporcionar un entorno en el que las células inyectadas o implantadas pueden adherirse a la matriz o el tejido circundante y crecer y producir otros factores (por ejemplo, factores quimiotácticos) que resultan del crecimiento del nuevo tejido. En muchos casos, la función de rellenar huecos de la matriz es temporal y sólo permanece hasta que las células implantadas y/u hospedadoras migran a la zona y forman nuevo tejido. Preferiblemente, la matriz acelular es biodegradable. La matriz es preferiblemente una sustancia sólida o semisólida que es insoluble en las condiciones fisiológicas. Dichas composiciones son adecuadas para su inyección o implantación en un sujeto para la reparación de un tejido que ha degenerado.

El término "biodegradable", según se usa en el presente documento, se refiere a una composición que no es biológicamente perjudicial y que puede ser degradada químicamente o descompuesta por efectores naturales (por ejemplo, el clima, las bacterias del suelo, las plantas o los animales). Algunos ejemplos de matrices que pueden usarse en la presente divulgación incluyen, sin limitación, matrices acelulares que contienen proteínas autólogas y no autólogas, y matrices acelulares que contienen polímeros biodegradables.

El procolágeno de la presente divulgación puede ser incorporado en cualquiera de las numerosas matrices acelulares biodegradables que contienen proteínas no autólogas. Algunos ejemplos de matrices acelulares biodegradables incluyen matrices que contienen cualquier tipo de colágeno (por ejemplo, bovino, porcino, humano o colágeno biomodificado), o cualquier tipo de colágeno con glucosaminoglicanos (GAG) reticulados, por ejemplo, con glutaraldehído. Algunas matrices que contienen colágeno incluyen, sin limitación, esponjas de colágeno absorbible, membranas de colágeno y esponjas óseas. Algunos tipos útiles de colágeno incluyen, por ejemplo, colágeno bovino, colágeno porcino, colágeno marino, colágeno cadavérico humano, colágeno biomodificado y colágeno humano autólogo.

Las esponjas de colágeno absorbible pueden adquirirse, por ejemplo, en Sulzer Calcitek, Inc. (Carlsbad, Calif.). Estos apósitos de esponjas de colágeno, vendidos con los nombres comerciales COLLATAPE™, COLLACOTE™ y COLLAPLUG™ están hechos de colágeno reticulado extraído del tendón flexor profundo bovino (de Aquiles) y de GAG. Estos productos son blandos, plegables, no friables y apirógenos. Más del 90 % de una esponja de colágeno consiste normalmente en poros abiertos.

Las matrices acelulares biodegradables en las que puede incorporarse el procolágeno pueden contener colágeno (por ejemplo, colágeno de tipo I bovino o porcino) formado en forma de, por ejemplo, una fina membrana. Una de dichas membranas es fabricada por Sulzer Calcitek y se comercializa como BIOMEND™. Otra de dichas matrices membranosa es comercializada como BIO-GIDE™ por Geistlich Sohne AG (Wolhusen, Suiza), y está hecha de colágeno porcino de tipo I y de tipo III. BIO-GIDE™ tiene una estructura bilaminar, con una superficie que es porosa y que permite el crecimiento hacia el interior de las células, y una segunda superficie que es densa e impide el crecimiento hacia el interior del tejido fibroso.

Otras matrices adecuadas que contienen colágeno en las que puede incorporarse el procolágeno de la presente divulgación incluyen COLLAGRAFT™ fabricada por NeuCell, Inc. (Campbell, Calif.) y los gránulos de sulfato de calcio alfa hemihidratado OSTEOSET™ vendidos por Wright Medical Technology (Arlington, Tenn.).

Las matrices acelulares biodegradables en las que puede incorporarse el procolágeno de la presente divulgación también pueden estar hechas a partir de esponjas óseas formadas en gránulos o en bloques. Este material consiste en hueso animal (por ejemplo, humano, de un primate no humano, bovino, de oveja, de cerdo o de cabra) del cual se ha eliminado sustancialmente todo el material orgánico (por ejemplo, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos y pequeñas moléculas orgánicas tales como vitaminas y hormonas no proteicas). Este tipo de matriz se denomina en el presente documento "matriz anorgánica". Una de dichas matrices, que es comercializada como gránulos de esponja ósea BIO-OSS™ y bloques BIO-OSS™, es fabricada por Geistlich Sohne AG. Esta compañía también fabrica una matriz en bloque (colágeno BIO-OSS™) que contiene hueso anorgánico y adicionalmente contiene aproximadamente un 10 % de fibras de colágeno en peso.

El hueso desmineralizado puede combinarse con el procolágeno de la presente divulgación para producir una matriz en forma de una esponja, un bloque o una membrana. Un ejemplo de matriz hecha a partir de hueso humano desmineralizado se forma, por ejemplo, en pequeños bloques y es comercializada como DYNAGRAFT™ por GenSci Regeneration Laboratories, Inc. (Toronto, Ontario, Canadá), TUTOPLAST™ por Tutogen Medical, Inc. (Clifton, N.J.), o GRAFTON™ Demineralized Bone Matrix por Osteotech, Inc. (Eatontown, N. J.). Otras matrices extracelulares biodegradables útiles en las que puede incorporarse el procolágeno son aquellas que contienen gelatina, *catgut*, hueso anorgánico, coral, glucosaminoglucanos tales como mucopolisacárido o ácido hialurónico o hidroxiapatito, o mezclas de estas sustancias.

Además, pueden usarse polímeros sintéticos hechos de uno o varios monómeros para elaborar las matrices extracelulares biodegradables en las que puede incorporarse el procolágeno de la presente divulgación. Dichos polímeros sintéticos incluyen, por ejemplo, ácido poliglicólico, ácido poliláctico y ácido poliglicólico-ácido poliláctico. Los polímeros sintéticos también pueden combinarse con cualquiera de las sustancias mencionadas anteriormente

para formar las matrices. Los diferentes polímeros que forman una única matriz pueden estar en compartimentos o en capas individuales. Por ejemplo, W. L. Gore & Associates, Inc. (Flagstaff, Ariz.) fabrica una matriz acelular biodegradable porosa (GORE RESOLUT XT Regenerative Material). Esta matriz está formada por un glucólido sintético bioabsorbible y una fibra de un copolímero de carbonato de trimetileno en la que las células pueden migrar, unidos a una membrana oclusiva que está formada por un glucólido sintético bioabsorbible y un copolímero de lactida que no permite el crecimiento hacia el interior de las células. Otros ejemplos de matrices biodegradables adecuadas pueden encontrarse en la Patente de EE.UU. nº 5.885.829, por ejemplo.

Se apreciará que las matrices en las que se incorpora el procolágeno de la presente divulgación pueden estar recubiertas con una o más moléculas de unión conocidas en la materia, de forma que se mejore la capacidad de las células de unirse a las matrices acelulares biodegradables. Estas moléculas de unión incluyen moléculas naturales (por ejemplo, factores de la matriz extracelular tales como laminina y fibronectina) y moléculas sintéticas (por ejemplo, péptidos que contienen los sitios de unión de la fibronectina y/o de la laminina). Algunos ejemplos de agentes útiles son, sin limitación, componentes de la membrana basal, gelatina, goma arábica, colágeno de los tipos I, II, fibronectina, laminina, tromboespondina, entactina, proteoglicanos, glucosaminoglicanos y mezclas de los mismos. Otras moléculas de adhesión apropiadas incluyen carbohidratos simples, carbohidratos complejos, asialoglicoproteínas, lectinas, factores de crecimiento, lipoproteínas de baja densidad, heparina, polilisina, poliornitina, trombina, vitronectina y fibrinógeno. El uso de las moléculas de unión y los métodos para unir las a las matrices acelulares biodegradables se describen en la Patente de EE.UU. nº 6.095.148.

El procolágeno de la divulgación también puede ser incluido en materiales de relleno acelulares biodegradables (es decir, agentes de volumen). Dichas composiciones pueden ser adecuadas para su inyección en un sujeto con objeto de preparar un tejido que ha degenerado. Un material de relleno generalmente cumple una función estructural. Por ejemplo, puede rellenar un defecto, un orificio, un espacio o una cavidad del tejido y proporcionar un entorno en el que las células inyectadas pueden adherirse al tejido circundante y crecer y producir otros factores (por ejemplo, factores quimiotácticos) que resultan del crecimiento del nuevo tejido. En muchos casos, la función de rellenar huecos de la matriz es temporal y sólo permanece hasta que las células implantadas y/u hospedadoras migran a la zona y forman nuevo tejido. Preferiblemente, el relleno es biodegradable. Los rellenos normalmente se proporcionan y se usan en forma de una solución o de una suspensión viscosa.

De acuerdo con una forma de realización, el relleno en el que está incorporado el procolágeno es un relleno dérmico.

Según se usa en el presente documento, el término "relleno dérmico" se refiere a un tipo de material de aumento tisular que generalmente se usa en la zona de la dermis, tal como por debajo de la epidermis o por encima de la hipodermis, y como tal puede ser inyectado por vía subcutánea, hipodérmica o intradérmica, o en alguna combinación.

Pueden usarse numerosos tipos de rellenos inyectables acelulares biodegradables junto con el procolágeno de la presente divulgación. El relleno puede consistir en proteínas autólogas, que incluyen cualquier tipo de colágeno obtenido a partir de un sujeto. Un ejemplo de dicho relleno es AUTOLOGEN™, anteriormente producido por Collagenesis Corp. (Beverly, Mass.). AUTOLOGEN™ es una dispersión de fibras de colágeno dérmico autólogo de un sujeto, y por lo tanto no desencadena ni siquiera una mínima respuesta inmunitaria cuando se administra de nuevo al sujeto. Con objeto de obtener AUTOLOGEN™ se obtiene una muestra de tejido (por ejemplo, de dermis, de placenta o de cordón umbilical) a partir de un sujeto y se remite a Collagenesis Corp., donde es procesada en una dispersión rica en colágeno. Aproximadamente, una pulgada y media cuadrada de tejido dérmico puede producir un centímetro cúbico (cc) de AUTOLOGEN™. La concentración de AUTOLOGEN™ puede ajustarse dependiendo de la cantidad necesaria para corregir los defectos o aumentar el tejido en el sujeto. La concentración de AUTOLOGEN™ en la dispersión puede ser, por ejemplo, de al menos aproximadamente 25 mg/l (por ejemplo, de al menos aproximadamente 30 mg/l, de al menos aproximadamente 40 mg/l, de al menos aproximadamente 50 mg/l o de al menos aproximadamente 100 mg/l).

Un material de relleno inyectable acelular también puede contener proteínas no autólogas, incluyendo cualquier tipo de colágeno, tales como las descritas a continuación en el presente documento.

Un ejemplo de matriz de relleno dérmico en la que puede incorporarse el procolágeno es la fabricada por Johnson & Johnson (EVOLENCE™) que incluye un colágeno de origen porcino, según se divulga en la Patente de EE.UU. nº 6.682.760.

Otros ejemplos de matrices de relleno dérmico en las que puede incorporarse el procolágeno son las fabricadas por Allergan Medical. Estas incluyen los rellenos dérmicos denominados ZYDERM™ (Collagen Corp., Palo Alto, California) y ZYPLAST™, que son formulaciones inyectables de colágeno bovino, y Cosmoderm y Cosmoplast, que están formadas por colágeno humano. ZYDERM™ se prepara a partir de piel bovina y está formado por atelopéptido de colágeno reconstituido en solución salina con una pequeña cantidad de un anestésico local. ZYDERM™ se describe en la Patente de EE.UU. nº 3.949.073. ZYPLAST™ es una preparación de colágeno bovino ligeramente reticulado y es procesado mediante una reticulación con glutaraldehído al 0,25 %, seguida de una filtración y un

cizallamiento mecánico a través de una malla fina. Las metodologías implicadas en la preparación y la utilización clínica de este material se divulgan en la Patente de EE.UU. nº 4.582.640 y en la Patente de EE.UU. nº 4.642.117.

COSMODERM™ y COSMOPLAST™ son rellenos dérmicos aprobados para la corrección de arrugas faciales, cicatrices acnéicas y otras deficiencias de contorno de los tejidos blandos, así como para la restauración del contorno de labios. El colágeno de COSMODERM™ y COSMOPLAST™ se purifica a partir de tejido dérmico humano que se ha cultivado en unas condiciones controladas.

La presente divulgación también concibe la incorporación del procolágeno de la presente divulgación en rellenos dérmicos basados en microesferas tales como ARTEFILL1™. ARTEFILL™ es una combinación única de microesferas sintéticas filtradas con precisión (20 %) suspendidas uniformemente en Ultra-Purified Collagen™ (80 %). Después de inyectar ARTEFILL™, las esferas microscópicas estimulan la propia producción natural de colágeno del cuerpo para que sustituyan al colágeno purificado. La tecnología basada en microesferas de este producto se divulga en la Patente de EE.UU. nº 5.344.452.

ISOLAGEN™ es otro producto de relleno dérmico en el que puede ser útil incorporar el procolágeno de la presente divulgación. ISOLAGEN™ (fabricado por Isolagen Inc.) comprende fibroblastos autólogos cultivados. Este relleno dérmico se divulga en las Patentes de EE.UU. nº 5.591.444 y 6.432.710.

HUMALLAGEN™, fabricado por Albiorex International, es un colágeno humano derivado de placenta para inyecciones de relleno dérmico para la corrección de las arrugas faciales. Este relleno dérmico se divulga en la Patente de EE.UU. nº 5.002.071.

El procolágeno de la presente divulgación también puede ser incorporado en DERMALOGEN™ (Angiotech Pharmaceuticals). Este producto es una matriz de colágeno inyectable procedente de piel humana después de la eliminación de las proteínas que no son colágeno, y se usa como un material de implante alogénico comercial estándar.

El procolágeno de la presente divulgación también puede ser incorporado en FASCIAN™ (Fascian Biosystems). Este es un material de implante humano inyectable hecho a partir de fascia.

Otros ejemplos de materiales de relleno útiles en los que puede incorporarse el procolágeno de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, gelatina solubilizada, ácido poliglicólico (por ejemplo, ácido poliglicólico solubilizado o partículas de ácido poliglicólico), o suturas de *catgut*. Un implante de matriz de gelatina particular se vende, por ejemplo, con el nombre comercial FIBRIL™. Este relleno contiene volúmenes iguales de (1) una mezcla de polvo de gelatina porcina y ácido o-aminocaproico dispersado en una solución de cloruro de sodio al 0,9 % (en volumen), y (2) una alícuota de plasma del sujeto. Otras sustancias útiles como rellenos incluyen hialuron, ácido hialurónico, restalina y parleano.

De acuerdo con otra forma de realización, el procolágeno de la presente divulgación puede ser incorporado en una matriz para su uso en un procedimiento de fusión medular. Los procedimientos de fusión medular están indicados en el tratamiento de enfermedades degenerativas de los discos intervertebrales, una causa habitual de dolor lumbar.

Por lo tanto, por ejemplo, el procolágeno de la presente divulgación puede ser incorporado en una esponja tal como INFUSE™ (una esponja hecha a partir de colágeno bovino de tipo 1), fabricada por Medtronic. Para el procedimiento de fusión medular, las esponjas se empapan en proteína morfogenética ósea humana recombinante (rhBMP-2) y después se insertan en dispositivos de jaula (INTER FIX y/o INTER FIX RP Threaded Fusion Devices), antes de su implantación entre las vértebras.

Otro soporte usado para los procedimientos de fusión medular en los que puede ser incorporado el procolágeno de la presente divulgación es el denominado OP-1™, fabricado por Stryker. Este soporte consiste en rh-BMP-7 y colágeno bovino, que son reconstituídos con solución salina para formar una pasta.

Otras matrices para la fusión medular en las que puede ser incorporado el procolágeno de la presente divulgación son las que se enseñan en las Patentes de EE.UU. nº 5645084, 5776193, 5910315, 6187047, 6425920, 6613091, 7041309 y en las Solicitudes de Patente de EE.UU. nº 2004/0192658, 2002/0082697 y 2005/0037978.

De acuerdo con otra forma de realización más, el procolágeno de la presente divulgación puede ser incorporado en una matriz que comprende colágeno para su uso en injertos óseos. Consecuentemente, el procolágeno de la presente divulgación puede ser incorporado en las matrices divulgadas en las Patentes de EE.UU. nº 4789663, 5171574, 5866113, 6077988, 6166184, 6630153, 7172629 y en las Solicitudes de Patente de EE.UU. nº 2002/0082694, 2007/0254042 y 2006/0233853.

La matriz puede tener incorporados gránulos cerámicos tales como MASTERGRAFT™ Matrix y masilla MASTERGRAFT™, ambos fabricados por Medtronic, y COLLAGRAFT™ (fabricado por Angiotech Pharmaceuticals y distribuido por Zimmer). Este último producto consiste esencialmente en una mezcla de microesferas porosas formadas por un 60 % de hidroxiapatito y un 40 % de fosfato de tricalcio cerámico y colágeno fibrilar. Otro soporte

poroso contemplado para la incorporación del procolágeno es el soporte Integra OS™, que está hecho a partir de colágeno muy purificado de tipo I y fosfato de tricalcio. Un producto similar es BI-OSTETIC FOAM™, fabricado por Berkeley Advanced Biomaterials. Es un injerto óseo estéril formado por colágeno fibrilar bovino de tipo I muy purificado y BI-OSTETIC™ gránulos reabsorbibles de un 60 % de hidroxiapatito y un 40 % de fosfato de tricalcio.

La matriz puede ser maleable o no maleable. La Solicitud de Patente de EE.UU. 20070178130 enseña una matriz maleable ejemplar en la que puede ser incorporado el procolágeno de la presente invención.

Algunos ejemplos de matrices maleables en las que puede ser incorporado el procolágeno de la presente divulgación para un injerto óseo incluyen la masilla MASTERGRAFT™, mencionada anteriormente en el presente documento; la masilla MOZAIC™, fabricada por Integra; la masilla Integra OS™, fabricada por Integra, la masilla ósea DBX™ fabricada por Synthes y la masilla GENEX™, fabricada por Biocomposites, y la pasta GENEX™, fabricada por Biocomposites. GENEX™ es un material de injerto óseo reabsorbible fabricado a través de un proceso patentado que confiere al producto una carga superficial negativa reproducible. Otra pasta contemplada por la presente divulgación es BIOSET™ RT Allograft Paste. Esta es una pasta de matriz ósea desmineralizada moldeable mezclada con virutas óseas corticales de tamaño uniforme, fabricada por RTI biologics.

De acuerdo con una forma de realización, la matriz de colágeno para su uso en injertos óseos en las que puede ser incorporado el procolágeno está en forma de tiras flexibles, tales como las tiras MOZAIC™, fabricadas por Integra, HEALOS™, fabricadas por Johnson and Johnson, y VITOSS™ fabricadas por Orthovita.

Se apreciará que la matriz de colágeno para su uso en los injertos por ser también puede ser moldeada en bloques y en otras formas, tales como algunos de los productos VITOSS™ fabricados por Orthovita. Los productos VITOSS™ están cubiertos por la Patente de EE.UU. nº 5.939.039.

La presente divulgación también contempla la adición de procolágeno a los soportes de Osteotech que incluyen, por ejemplo, MAGNIFUSE™. MAGNIFUSE™ es una combinación de aloinjerto óseo en una malla polimérica que proporciona una administración dirigida y contenida. La malla polimérica está hecha de un material de sutura biodegradable y está diseñada para un crecimiento hacia el interior eficaz y una completa reabsorción a los entre tres y seis meses, sin interferir en la regeneración ósea.

Además, la presente divulgación contempla la adición del procolágeno a los soportes de Pioneer Surgical tales como FORTROSS™, que es una combinación de hidroxiapatito NANOSS™ y una promoción del crecimiento óseo del soporte E-MATRIX™ y el Bioset RTI™.

De acuerdo con otra forma de realización más, el procolágeno de la presente divulgación puede ser incorporado en cementos óseos tales como los fabricados por Biomet.

En el mercado hay disponibles diversos productos basados en colágeno y no basados en colágeno para la sustitución de la piel en los que puede ser incorporado el procolágeno de la presente divulgación. Por ejemplo, el procolágeno de la presente divulgación ser incorporado en recubrimientos de piel artificial. Los recubrimientos de piel artificial pueden usarse como un cubrimiento temporal en pacientes con quemaduras de tercer grado, evitando el riesgo de las enfermedades infecciosas relacionadas con los aloinjertos cadavéricos humanos (HCA). Consecuentemente, la presente divulgación contempla la incorporación del procolágeno de la presente divulgación en los productos de piel enseñados en las Patentes de EE.UU. nº 4882162, 5273900, 5460939, 6040493, 4837379, 5830507, 5536656, 4060081, 5032508, 5443950, 5837278, 5256418, 6497875, 5266480, 5591444, 586398, 5,489,304, 5660850, 6855860 y en la Patente Internacional nº WO/1997/006837.

Un ejemplo de un recubrimiento de piel artificial es TRANSCYTE™, también conocido como DERMAGRAFT™. Esto es una capa epidérmica sintética que es biocompatible y protege la superficie de la herida de una infección. Es semipermeable, lo que permite el intercambio de fluidos y gases. La capa interna de TRANSCYTE™ se crea mediante el cultivo de fibroblastos derivados de prepucio neonatal humano en una red de silicio y nailon. Los procedimientos de congelación destruyen los fibroblastos, dejando atrás un producto sólido de factores de crecimiento, incluyendo las proteínas esenciales estructurales de la matriz y provisionales humanas, glucosaminoglucanos y factores de crecimiento que se sabe que facilitan la curación. La capa interna, que contiene los componentes dérmicos que se sabe que promueven la curación de la quemadura, se adhiere rápidamente a la superficie de la herida. Las células epiteliales del paciente proliferan y migran a través de la herida, dando como resultado una rápida curación de las heridas.

BIOBRANE™ (Smith and Nephew, Holanda) es un producto de vendaje biosintético que consiste en una tela de nailon parcialmente incluida en una película de silicio. El colágeno se une químicamente a la compleja estructura tridimensional del hilo trifilamentoso. La sangre o el suero se coagulan en la matriz de nailon, que adhiere el apósito a la herida hasta que se produce la epitelización o hasta que es posible un autoinjerto.

INTEGRA™ (Integra Artificial Skin Dermal Regeneration Template; Integra LifeSciences Corp, New Jersey, EE.UU.) es una membrana bicapa que consiste en una capa epidérmica sintética de polisiloxano y una capa dérmica que

consiste en una red porosa de fibras de colágeno reticuladas. La capa de dérmica es un molde biodegradable en el que los vasos sanguíneos y linfáticos, los fibroblastos y otras células migran desde la red hacia el tejido sano circundante. Los fibroblastos degradan el molde y recrean una matriz de colágeno. Entre siete y catorce días después de haber sido aplicada la piel artificial, se retira la capa epidérmica sintética y puede injertarse piel sobre la herida.

ALLODERM™, fabricado por BioHorizons, es una matriz dérmica acelular alogénica no biológica inmunológicamente inerte, con un complejo de membrana basal intacto. Prepara el lecho de la herida para el injerto, permite un mejor "agarre" del aloinjerto cultivado y proporciona una membrana basal intacta.

Otro equivalente cutáneo biológico, la piel compuesta cultivada (ORCEL™, Ortec), consiste en fibroblastos y queratinocitos alogénicos sembrados en los lados opuestos de una matriz bicapa de colágeno bovino.

La presente divulgación también contempla la incorporación del procolágeno de la presente divulgación en un material de apósito derivado de cerdos: matriz de colágeno acelular de submucosa de intestino delgado porcino (OASIS™) y una matriz de colágeno xenogénico acelular (E-Z-DERM™).

Tissue Sciences (Covington, Ga.) comercializa un producto conocido como PERMACOL™, que está formado por dermis porcina reticulada. DePuy (Warsaw, Ind.) comercializa el RESTORE PATCH™ que está fabricado a partir de submucosa de intestino delgado porcino. Biomet (Warsaw, Ind.) comercializa un producto conocido como CUFFPATCH™, otro producto de intestino delgado porcino. Los productos CUFFPATCH™ y RESTORE PATCH™ proporcionan soportes biocompatibles para la reparación de heridas, y también pueden ser incorporados con el procolágeno de la presente divulgación. La fabricación de dichos parches a partir de submucosa de intestino delgado porcino se describe en la Patente de EE.UU. nº 4.902.508 a favor de Badylak et al. y en la Patente de EE.UU. nº 5.573.784 a favor de Badylak et al.

Para la reparación de grandes desgarros de la piel o de heridas cutáneas crónicas (por ejemplo, los pies de personas diabéticas), es deseable el uso de un soporte o de un material de injerto para ayudar a soportar el tejido lesionado y guiar su reparación.

Consecuentemente, la presente divulgación contempla la incorporación del procolágeno de la presente divulgación en soportes tales como los que se enseñan en las Patentes de EE.UU. nº 5.336.616; 5.024.830; 4.865.871.

Se han usado varios tipos de materiales para dichos procedimientos. Wright Medical (Memphis, Tenn.) comercializa un producto conocido como GRAFTJACKET™, que es fabricado por Lifecell Corporation (Branchburg, N. J.) a partir de piel cadavérica humana. La piel experimenta un proceso que elimina la epidermis y las células dérmicas. Este proceso permite que el cuerpo acepte la matriz y reduce la respuesta de rechazo. Las etapas de procesamiento que producen la GRAFTJACKET™ Matrix preservan lo suficiente el tejido dérmico humano, incluyendo su proteína natural, la estructura del colágeno, los canales de los vasos sanguíneos y la composición bioquímica esencial, para permitir la repoblación celular y la revascularización a través del proceso de curación natural del cuerpo.

Después de la implantación, el proceso de reparación natural del cuerpo revasculariza y repuebla la GRAFTJACKET™ Matrix con células y permite que el cuerpo convierta la GRAFTJACKET™ Matrix en tejido vivo, por ejemplo, en piel. Esto significa que el cuerpo puede usar la GRAFTJACKET® Matrix como si se reparara a sí mismo. Consecuentemente, la presente divulgación contempla la incorporación del procolágeno de la presente divulgación en el soporte GRAFTJACKET™.

Otra matriz para el tratamiento de heridas profundas en las que puede ser incorporado el procolágeno de la presente divulgación es la INTEGRA Flowable Wound Matrix™, producida por Integra Lifesciences, que es una avanzada matriz de tratamiento de heridas formada por colágeno de tendón bovino reticulado granulado y glucosaminoglucano. El colágeno-glucosaminoglucano granulado es hidratado con solución salina y aplicado en sitios con heridas de difícil acceso y en heridas en túnel. Proporciona un soporte para la invasión celular y el crecimiento de los capilares.

La presente divulgación también contempla la incorporación del procolágeno de la presente divulgación en productos sellantes hemostáticos que comprenden colágeno tales, los divulgados en las Patentes de EE.UU. nº 4016877, 4578067, 4606910, 5951583, 6096309, 6596304 y en la Solicitud de Patente de EE.UU. nº 2004/0076647.

VITAGEL™ Surgical Hemostat, producido por Orthovita, es un producto hemostático líquido pulverizable formado por trombina bovina y colágeno bovino que se mezclan con plasma derivado de sangre autóloga. Vitagel funciona mediante la combinación de la suspensión de trombina / colágeno con el propio plasma del paciente, para formar un coágulo de fibrina / colágeno. Unas jeringas unidas, una que contiene el plasma (humano) del paciente, y la otra una mezcla acuosa de trombina bovina y colágeno, mezclan estos componentes para su pulverización sobre heridas hemorrágicas.

AVITENE Ultrafoam™, una esponja de colágeno producida por Bard, es otro hemostático de colágeno indicado para detener las hemorragias durante procedimientos quirúrgicos, al acelerar la formación del coágulo sanguíneo.

5 INSTAT™ Collagen Absorbable Hemostat, de Johnson & Johnson, es otro hemostático ejemplar que puede ser incorporado con el procolágeno de la presente divulgación. Está disponible en forma de una almohadilla, así como en polvo. INSTAT™ Collagen Absorbable Hemostat está hecho con colágeno dérmico bovino purificado y liofilizado. El material, cuando se prepara en forma de una almohadilla de tipo esponja, está ligeramente reticulado, es estéril, apirógeno y absorbible.

10 El engrosamiento uretral para el tratamiento de la incontinencia urinaria implica la inyección de material alrededor de la uretra. Esto puede realizarse para cerrar un orificio en la uretra a través del cual se pierde orina, o para aumentar el espesor de la pared de la uretra de forma que se cierre fuertemente cuando se contiene la orina. La mayoría de los materiales de engrosamiento son inyectados alrededor de la uretra justo en el exterior del músculo de la uretra en la salida de la vejiga. La inyección del material de engrosamiento puede llevarse a cabo a través de la piel, a
15 a través de la uretra o, en mujeres, a través de la vagina. La colocación de la aguja está guiada mediante el uso de un cistoscopio insertado en la uretra. Los materiales usados para el engrosamiento uretral normalmente incluyen politetrafluoroetileno (PTFE), colágeno bovino (colágeno bovino reticulado con glutaraldehído) y durasfera. Consecuentemente, la presente divulgación contempla la incorporación del procolágeno de la presente divulgación en la matriz de colágeno usada para el engrosamiento uretral.

20 Por lo tanto, el procolágeno de la presente divulgación puede ser incorporado en el implante de colágeno denominado Contigen™ Bard™ fabricado por Bard, o en los implantes divulgados en las Patentes de EE.UU. nº 4773393, 5385561, 5989180 y 6328687.

25 Las graves heridas abiertas ofrecen un punto de entrada para las infecciones nosocomiales. Las heridas se infectan no sólo como resultado de los procedimientos médicos, sino también por el aire circulante del hospital y por los microbios cutáneos. Las heridas deben mantenerse limpias y exentas de contaminación bacteriana, o la población bacteriana de una herida debe reducirse mediante la aplicación de los antisépticos apropiados. Varios tipos de apósitos intentan abordar las necesidades de reducir la carga biológica. Éstos incluyen apósitos secos, apósitos
30 húmedos, apósitos de alginato, apósitos de hidrocoloide y de hidrogel, así como apósitos basados en colágeno y apósitos de gasa. En dichos apósitos se puede incorporar el procolágeno de la presente divulgación.

Un ejemplo de apósitos para heridas que comprenden colágeno en los que se puede incorporar el procolágeno de la presente divulgación incluyen los divulgados en las patentes de EE.UU. nº 4950699, 5196185, 5676967, 5735812,
35 5.836.970, 5888987, 6087549, 7041868 y en las Solicitudes de Patente de EE.UU. 20040001878, 20050260251, 20060188486, 20070250177, 20070255192, 20070154530 y 20080213344.

Por lo tanto, por ejemplo, el procolágeno de la presente divulgación puede ser incorporado en los apósitos para heridas de Integra, incluyendo HELISTAT™ y HELITENE™. HELISTAT™ está hecho a partir de una esponja hemostática de colágeno absorbible, mientras que HELITENE™ este hecho a partir de una forma fibrilar de colágeno absorbible. En ambos productos, el colágeno es procesado a partir de tendón flexor profundo bovino.

45 INTEGRA Bilayer Matrix Wound Dressing™ es un avanzado dispositivo para el tratamiento de heridas formado por una matriz porosa de colágeno de tendón bovino reticulado y glucosaminoglucano y una capa semipermeable de polisiloxano (silicona). La membrana de silicona semipermeable controla la pérdida de vapor de agua, proporciona un adherente flexible que cubre la superficie de la herida y añade un aumento en la resistencia al desgarro al dispositivo. La matriz biodegradable de colágeno-glucosaminoglucano proporciona un soporte para la invasión celular y el crecimiento de los capilares.

50 Johnson and Johnson produce diversos apósitos para heridas, todos los cuales están contemplados para la presente divulgación. Algunos ejemplos de apósitos para heridas incluyen NU-GEL™, FIBRACOLL PLUS™, Instat™ y PROMOGRAN MATRIX™.

55 NU-GEL™ es una formulación estéril en hidrogel de polivinilpirrolidona conservada en agua. El gel está soportado por una malla de tela de fibras fusibles y protegido en ambos lados por una película de polietileno. El apósito NU-GEL™ favorece la autólisis natural mediante la rehidratación y el ablandamiento del tejido necrótico, proporcionando un entorno húmedo a la herida. Protege frente a la deshidratación, la contaminación bacteriana y absorbe los exudados de la herida.

60 Se apreciará que el apósito para heridas puede estar formado por un material compuesto tal como celulosa y colágeno o alginato y colágeno.

PROMOGRAN MATRIX™ es un ejemplo de un apósito que combina celulosa oxidada regenerada y colágeno. FIBRACOLL PLUS™ es un apósito formado por hasta un 90 % de colágeno y un 10 % de alginato. Esta combinación mantiene un entorno húmedo en la herida, que conduce a la formación de tejido de granulación y a una epitelización que permite que la curación se produzca de forma óptima.

Organogénesis también produce una variedad de apósitos para heridas que están contemplados para su incorporación en la presente divulgación.

Por lo tanto, por ejemplo, la presente divulgación contempla la incorporación del procolágeno en FORTADERM™. Este apósito para heridas consiste en una monocapa de una lámina fenestrada de colágeno intestinal porcino.

ColActive™ y ColActive Ag™ son apósitos para heridas basados en colágeno producidos por Covalon Technologies. ColActive™ se produce a partir de colágeno porcino desnaturalizado de calidad USP. ColActive™ también puede estar impregnado con sales de plata para crear un apósito para heridas antiséptico basado en colágeno - ColActive Ag™.

BioCore Medical Technologies produce apósitos para heridas tales como MEDIFIL™, SKINTEMP™ y COLLATEK™. Las partículas de MEDIFIL™ comprenden colágeno bovino de tipo I y están destinadas a heridas de cavidades profundas supurativas, socavadas, tunelizadas, infectadas o contaminadas. Las almohadillas de MEDIFIL™ son para heridas supurativas de cavidades profundas. SKINTEMP™ está formado por láminas de colágeno poroso unidas a un revestimiento no adherente, y está indicado para heridas supurativas secas superficiales. COLLATEK™ comprende colágeno bovino de tipo I.

Southwest Technologies produce un producto denominado STIMULEN™ que es un apósito estéril primario de un solo uso formado por una base de colágeno bovino modificado soluble. El colágeno de STIMULEN™ es soluble en el fluido de la herida y se suministra en forma de un polvo o de un gel o de una lámina.

Healthpoint ofrece un recubrimiento para heridas estéril denominado OASIS™ que ayuda a la regeneración del tejido en heridas con un grosor parcial. Proporciona una matriz de colágeno diseñada en tejido derivada de submucosa de intestino delgado porcino (SIS). OASIS™ tiene una vida de almacenamiento de un año y está disponible en láminas fenestradas de grosor único.

PURACOL™, producido por Medline, es otro apósito más para heridas basado en colágeno en el que se puede incorporar el procolágeno de la presente divulgación. Este producto comprende un 100 % de colágeno puro de origen bovino en su forma natural de hélice triple.

TENOGLIDE™ Tendon Protector Sheet de Integra es un implante (dispositivo) absorbible que proporciona un atrapamiento protector no constrictor para tendones lesionados. También se contempla que dicho producto sea incorporado con el procolágeno de la presente divulgación. TENOGLIDE™ está formado por una matriz porosa de colágeno bovino de tipo I reticulado y glucosaminoglucano (GAG). TenoGlide Tendon Protector está diseñado para que sirva como una interfase entre el tendón y los tejidos circundantes. TenoGlide Tendon Protector es una lámina fácil de manipular, cómoda, porosa de colágeno-GAG diseñada para una fácil colocación debajo, alrededor o sobre un tendón lesionado.

También puede usarse la matriz de tejido regenerativo GRAFTJACKET™ para proteger tendones. Este producto ha sido descrito anteriormente en el presente documento.

El cierre quirúrgico de la duramadre, o duroplastia, es una parte esencial de cualquier procedimiento de neurocirugía abierta. Las lesiones traumáticas en la cabeza y la médula espinal a menudo dan como resultado desgarros y laceraciones en la duramadre que requieren una reparación quirúrgica. La duramadre es una resistente lámina de tejido conectivo fibroso que forma la membrana protectora externa que envuelve el cerebro y la médula espinal. La duramadre es el primer tejido del cerebro que aparece durante cualquier procedimiento de neurocirugía. El neurocirujano tiene que cortar a través de la duramadre para obtener acceso al cerebro. Al final de un procedimiento de neurocirugía debe conseguirse una reparación "estanca" de la duramadre para impedir una pérdida de líquido cefalorraquídeo de sustento (LCR) desde los tejidos del cerebro y la médula espinal. Consecuentemente, la presente divulgación contempla la incorporación del procolágeno de la presente divulgación en las matrices usadas para una duroplastia.

Dichas matrices basadas en colágeno para la duroplastia se divulgan en las Solicitudes de Patente de EE.UU. nº US 20070161109 y 20030204270. Un producto ejemplar que puede ser incorporado con el procolágeno de la presente divulgación es DURAGEN™ de Integra Lifesciences, que comprende una matriz de colágeno de tipo I.

Como resultado de la elevada incidencia de lesiones neurológicas, regeneración y reparación nerviosa, un subcampo de diseño de tejido neural es un campo en rápido crecimiento dedicado al descubrimiento de nuevas formas para recuperar la funcionalidad nerviosa después de una lesión. La presente divulgación contempla la incorporación del procolágeno de la presente divulgación en matrices basadas en colágeno diseñadas para ayudar en la regeneración de los nervios.

Las envolturas nerviosas se divulgan en las Solicitudes de Patente de EE.UU. nº 2004/0048796 y 2003/0072749.

Collagen Matrix Inc. produce una envoltura nerviosa denominada Collagen Nerve Wrap™, que es una matriz de colágeno reabsorbible que proporciona un atrapamiento no constrictor para nervios periféricos lesionados para la protección del entorno neural, y está diseñado para que sea una interfase entre el nervio y el tejido circundante.

NeuraWrap™ producido por Integra es otro protector nervioso, que es un implante de colágeno absorbible que proporciona un atrapamiento no constrictor para nervios periféricos lesionados para la protección del entorno neural. La pared del conducto tiene una ranura longitudinal que permite que NeuraWrap™ se extienda ampliamente para una fácil colocación sobre el nervio lesionado. La elasticidad del conducto de colágeno permite que NeuraWrap recubra y mantenga el cierre una vez que el dispositivo es colocado alrededor del nervio.

Se espera que durante la vida de una patente que madura a partir de esta solicitud se desarrollen muchas composiciones, matrices y portadores relevantes, y el ámbito de los términos proporcionados en el presente documento pretende incluir *a priori* todas dichas nuevas tecnologías.

Según se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "incluyendo", "que tiene" y sus conjugados, significan "incluyendo pero no se limita a". Este término engloba los términos "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

La expresión "que consiste esencialmente en" significa que la composición o el método puede incluir ingredientes y/o etapas adicionales, pero únicamente si los ingredientes y/o las etapas adicionales no alteran significativamente las características básicas y novedosas de la composición o del método reivindicado.

Según se usa en el presente documento, la forma singular "un", "una" y "el / la" incluyen las referencias en plural salvo que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por ejemplo, el término "un compuesto" o "al menos un compuesto" pueden incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

A lo largo de esta solicitud pueden presentarse diversas formas de realización de esta divulgación en un formato de intervalos. Debería entenderse que la descripción en un formato de intervalos es simplemente por conveniencia y brevedad, y no debería interpretarse como una limitación inflexible del ámbito de la divulgación. Consecuentemente, debería considerarse que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los posibles subintervalos, así como los valores numéricos individuales dentro del intervalo. Por ejemplo, debería considerarse que la descripción de un intervalo tal como de entre 1 y 6 ha divulgado específicamente subintervalos tales como desde 1 hasta 3, desde 1 hasta 4, desde 1 hasta 5, desde 2 hasta 4, desde 2 hasta 6, desde 3 hasta 6 etc., así como las cifras individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto aplica independientemente de la anchura del intervalo.

Siempre que en el presente documento se indique un intervalo numérico, se entiende que incluye cualquier número indicador (fraccionario o entero) dentro del intervalo indicado. Las frases "que varía(n) entre" un primer número indicado y el segundo número indicado, y "que varía(n) desde" un primer número indicado "hasta" un segundo número indicado, se usan en el presente documento de forma intercambiable, y se entiende que incluyen el primer y el segundo número indicado así como todos los números fraccionarios y enteros entre los mismos.

Según se usa en el presente documento el término "método" se refiere a formas, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea dada que incluyen, pero no se limitan a, aquellas formas, medios, técnicas y procedimientos ya conocidos, o fácilmente desarrollados a partir de formas, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los profesionales de las artes químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

Se aprecia que ciertas características de la divulgación, que por claridad se han descrito en el contexto de formas de realización individuales, también pueden proporcionarse combinadas en una única forma de realización. Por el contrario, diversas características de la divulgación, que por brevedad se han descrito en el contexto de una única forma de realización, también pueden proporcionarse individualmente o en cualquier subcombinación adecuada o según sea adecuado en cualquier otra forma de realización descrita de la divulgación. Algunas de las características descritas en el contexto de varias formas de realización no deben ser consideradas características esenciales de esas formas de realización, salvo que la forma de realización sea inoperante sin esos elementos.

Varias formas de realización y aspectos de la presente divulgación según se han definido anteriormente en el presente documento y según se reivindica en la siguiente sección de reivindicaciones encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran algunas formas de realización de la invención de una forma no limitante.

Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y en los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican en profundidad en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I - III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Mariland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1 - 4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); las metodologías según se establecen en las Patentes de EE.UU. n° 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I - III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" de Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), tercera edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I - III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles son ampliamente descritos en la bibliografía patente y científica, véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. n° 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1, 2, 317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); a lo largo de este documento se proporcionan otras referencias generales. Se cree que los procedimientos del presente documento son bien conocidos en la materia, y se proporcionan por conveniencia del lector.

EJEMPLO 1

Expresión del procolágeno en plantas de tabaco

Construcciones - Todas las secuencias codificantes fueron optimizadas para su expresión en la planta de tabaco. Las Figuras 1 A - D muestran los genes sintéticos codifican para la Col1 (la cadena $\alpha 1$ del colágeno de tipo I humano, número de registro P02452, eliminada la señal ER; Figura 1 A), la Col2 (la cadena $\alpha 2$ del colágeno de tipo I humano, número de registro P08123, eliminada la señal ER; Figura 1 B), la P4H α (la subunidad alfa de la 4-hidroxilasa de proloilo humana, número de registro P13674, eliminada la señal ER; Figura 1 C), la P4H β (la subunidad beta de la 4-hidroxilasa de proloilo humana, número de registro P07237, eliminada la señal ER y la señal KDEL C' terminal) y la LH3 (la isoforma 3 de la hidroxilasa de lisilo humana, número de registro 060568, eliminada la señal ER; Figura 1 D). Todos los genes se fusionaron N' terminalmente con una señal de tránsito vacuolar M AHARVLL LALAVLAT AAVAVAS SSSFADSNPIRPVT D RAASTLA (SEQ ID N°: 14). Estas secuencias se originan a partir de la señal de direccionamiento dentro de la secuencia que codifica para una proteasa de tiol vacuolar vegetal (número de registro P05167, GI:113603). Se clonaron la cadena $\alpha 1$ del colágeno de tipo I y la cadena $\alpha 2$ del colágeno de tipo I fusionadas con la señal vacuolar en casetes de expresión formados por un promotor rbcS1 de *Chrysanthemum* y una UTR en 5' junto con una UTR en 3' de rbcS1 y de terminación de *Chrysanthemum* (Outchkourov et al., 2003). Los casetes de expresión completos se clonaron en un sitio de clonación múltiple del vector de transformación vegetal pBINPLUS (van Engelen et al., 1995, Transgenic Res. 4: 288 - 290). Los genes sintéticos que codifican para la P4H β humana y la P4H α humana fusionada con la señal de direccionamiento vacuolar se clonaron en casetes de expresión formados por el promotor 35S del CaMV, la secuencia omega del TMV y el terminador de sintetasa (NOS) de *Agrobacterium Nopaline* portado por el vector pJD330 (Galili et al., 1987, Nucleic Acids Res 15: 3257 - 3273). Los casetes de expresión completos se clonaron en un sitio de clonación múltiple del pBINPLUS. Se clonó el gen sintético que codifica para la LH3 flanqueado por el promotor del virus de la rizada de la fresa (SVBV) (número de acceso del NCBI AF331666 REGION: 623..950 versión AF331666.1 GI: 13345788) y terminados por el terminador de la sintasa de *Agrobacterium octopin* (OCS) (número de acceso del NCBI Z37515 REGION: 1344..1538 versión Z37515.1 GI: 886843) fusionados con la señal de direccionamiento vacuolar en un sitio de clonación múltiple del vector pBINPLUS portador de los casetes de expresión de la P4H β .

Transformaciones - Los cuatro construcciones de expresión fueron transformados en *Agrobacterium tumefaciens* (EHA 105) mediante una electroporación. Se usaron los *Agrobacterium* que contienen la Col1 y la Col2 para inocular conjuntamente una cepa de la planta de tabaco *Nicotiana tabacum* Samsun NN, creando así una línea parental Col1 / Col2. Paralelamente se usaron los casetes de expresión de *Agrobacterium* que contienen P4H α y P4H β + LH3 para inocular conjuntamente una línea individual de la cepa de la planta de tabaco Samsun NN, generando así una línea parental P4H α / P4H β + LH3. Se usaron un análisis mediante una PCR y de inmunotransferencia western para validar la inserción de los genes y la expresión de las proteínas en las dos líneas parentales. A continuación las plantas parentales se cruzaron ubicando las anteras de Col1 / Col2 en el estigma de las flores P4H α / P4H β + LH3 después de la eliminación de las anteras de las últimas plantas. Los progenitores de este proceso de cruce fueron cribados mediante una validación basada en una PCR de los genes integrados en el genoma mediante el uso de cebadores específicos para los genes. Además, se llevaron a cabo análisis por inmunotransferencia Southern de las plantas parentales y de una planta progenitora que contenía todos los genes, para definir el número de copias de

cada gen (véase la siguiente Tabla 1). Se asumió que el número de copias de la LH3 era idéntico al de la P4H β , ya que eran expresadas bajo un único promotor. Finalmente se llevó a cabo un análisis mediante inmunotransferencia western para verificar y cuantificar la expresión de las proteínas.

5

Tabla 1

<i>Análisis mediante inmunotransferencia Southern de las líneas parentales 2 - 372, 20 - 279 y de las plantas progenitoras cruzadas A3 - 29 y C2 - 15</i>				
	A3 - 29	C2 - 15	2 - 372	20 - 279
P4H α	2 inserciones	3 inserciones		3 inserciones
P4H β	2 inserciones	2 inserciones		2 inserciones
COL1	3 inserciones	3 inserciones	3 inserciones	
COL2	2 inserciones	2 inserciones	2 inserciones	

Inmunotransferencias Western - Se cribaron las plantas para comprobar la expresión de la Col1 y la Col2 mediante el uso de AB745 (policlonal de conejo anticógeno de tipo I de placenta humano Collagen, Millipore) y anti-fosfatasa alcalina de conejo de cabra (policlonal, AP132A, Millipore) como anticuerpos primario y secundario, respectivamente. Se cribaron las plantas para comprobar la expresión de la P4H α mediante el uso de un anticuerpo anti-P4H α humana (#63-163 de ICN Biomedicals Inc.) y para comprobar la expresión de la P4H β con anticuerpo anti-P4H β humana (#MAB2701 de Millipore). Se usaron anticuerpos de cabra anti-ratón conjugados con fosfatasa alcalina (#A3688 de Sigma) como anticuerpos secundarios para la detección tanto de la P4H α como de la P4H β .

10

15

Las plántulas se produjeron mediante el cultivo de los tejidos a partir de esquejes de la línea parental. Las plantas se cultivaron en un entorno controlado en un invernadero.

Extracción y purificación del procolágeno a partir de plantas transgénicas - La molienda de las hojas de las plantas de tabaco transgénicas se llevó a cabo con un homogeneizador en línea IKA Labor Pilot. En resumen, se colocaron 4 l de tampón de extracción frío en el depósito del homogeneizador, que a continuación se hizo funcionar a aproximadamente 8.000 rpm durante aproximadamente 1 minuto. Se añadieron las hojas molidas (1 kg) al depósito. Después se aumentó la velocidad del homogeneizador hasta 13.789 rpm durante aproximadamente 2 minutos y a continuación se redujo hasta aproximadamente 8.000 rpm. Se abrió la válvula inferior para eliminar la solución del depósito. El extracto se centrifugó a 3.800 g, a 5 °C, durante 20 minutos. Finalmente, el sobrenadante se filtró a través de 4 capas de gasa de algodón (Muestra A, Figuras 2 A - B).

20

25

Para una concentración adicional se añadieron 6,68 g de carbón vegetal y 16,67 g de polivinilpirrolidona (PVPP) al extracto con agitación durante 20 minutos (5 °C, velocidad de raspado del 50 % o como alternativa, se agitaron con un agitador suspendido establecido a 1.200 rpm (5 °C, 20 minutos). La solución se saturó después con sulfato de amonio al 15 % (AMS) (p/v) con agitación durante 1 hora a 5 °C. Esto fue seguido por una centrifugación a 6.880 rpm - 8.000 g (5 °C, 20 minutos) o como alternativa, por una centrifugación con una centrífuga Cepa Z41 a 26.000 rpm (4 °C, 20 l/h). El sobrenadante (Muestra B, Figuras 2 A - B) se saturó después adicionalmente con AMS al 25 % (p/v) y se agitó durante 1 hora (5 °C). La solución se centrifugó después a 6.880 rpm, 5 °C, 30 minutos) o como alternativa, se centrifugó (26.000 rpm, 20 l/h, 4 °C) con una centrífuga Cepa Z41 (Muestra C, Figuras 2 A - B).

30

35

Todas las etapas posteriores se llevaron a cabo en un entorno enfriado con hielo con soluciones enfriadas previamente. El sedimento así formado se resuspendió en tampón (fosfato de sodio 100 mM a pH 7,65) en una proporción de 20 ml de tampón por g de sedimento saturado con AMS. Los sedimentos resuspendidos se centrifugaron (13.000 rpm, 10 minutos, 5 °C) y se recogieron los sobrenadantes que contienen el procolágeno y se filtraron a través de una gasa de 12 capas para eliminar los grandes desechos de partículas. A continuación se diluyó el sobrenadante filtrado a través de la gasa cinco veces con fosfato de sodio 25 mM (pH 7,65) y se cargó en una columna de intercambio aniónico (XK 26/20 GE Healthcare) que contiene 20 ml de resina CaptoQ (GE Healthcare), y eluyendo posteriormente con un gradiente de NaCl (20 volúmenes de columna, 0 - 50 % de NaCl, caudal 20 ml/min). El procolágeno eluyó principalmente en las fracciones de NaCl de 170 - 250 mM. Las fracciones eluidas que contienen el procolágeno (Figuras 3 A - B, fracciones 14 - 20) se agruparon y después se purificaron adicionalmente a través de una de las dos técnicas descritas a continuación. Las fracciones de intercambio aniónico agrupadas se concentraron con un centrífugo de 100 kDa de corte (Vivaspin, Vivascience). A continuación el concentrado se cargó en una columna de filtración en gel Supredex 200 GL 10/300 (GE healthcare). El procolágeno eluyó entre 8,4 - 9,6 ml (Figuras 4 - 6 A - B), mientras que el resto de las proteínas eluyeron a continuación (Figura 4). De esta forma se aisló el procolágeno intacto con un elevado grado de pureza, como es evidente a partir de las Figuras 7 A - B. Alternativamente, las fracciones de intercambio aniónico agrupadas se precipitaron con sulfato de amonio al 25 % y se centrifugaron (8.000 g, 30 minutos, 5 °C). El sedimento se resuspendió en fosfato de sodio 100 mM (pH 7,65) hasta un 1/15 del volumen del volumen de la fracción agrupada previa a la centrifugación. Después esta solución se diluyó 10 veces con etanol al 100 % enfriado previamente y se incubó (-20 °C, 3 horas). Después de la centrifugación (14.000 g, 30 minutos 5 °C), el sedimento se resuspendió en fosfato de sodio 100 mM (pH 7,65) hasta un 1/15 del volumen del volumen de la fracción agrupada previa a la centrifugación, se dializó frente al mismo tampón, se centrifugó (20.200 g, 10 minutos, 5 °C) y se filtró a través de un filtro de 0,2 μ m (Figura 8).

40

45

50

55

RESULTADOS

La expresión del procolágeno se demuestra en las líneas vegetales CP A3-29 (lote #CP C-18) mediante la presencia de dos bandas prominentes a unos pesos moleculares > 170 kDa y de aproximadamente 150 kDa, según se detecta con anticuerpos anti-colágeno de tipo I de placenta humana (las fechas de las Figuras 2 A - B). Unas bandas similares eran evidentes en el extracto en bruto (Figura 2, carriles A) y en el sobrenadante posterior a la centrifugación en AMS al 15 % (Figura 2, carriles B), pero no se detectaron en los sobrenadantes posteriores a la centrifugación en AMS al 25 % (Figura 2, carriles C). Claramente se había conseguido un enriquecimiento en procolágeno en los precipitados del tratamiento con AMS al 25 % (Figura 2, carriles D), según se confirmó adicionalmente mediante una tinción SDS PAGE Instant Blue. Se demostró un aumento en la intensidad de la banda correspondiente, así como una reducción en las bandas relacionadas con el tabaco natural no colágeno, especialmente aquellas con unos pesos moleculares por debajo de 105 kDa. Por lo tanto, esta etapa añadida de precipitación basada en AMS enriquece la pureza del procolágeno de la muestra.

La cromatografía de intercambio aniónico demostró que el grueso del procolágeno eluía en las fracciones 14 - 24 (Figuras 3 A - B), equivalentes a NaCl 170 - 250 mM, medido mediante la conductividad de la muestra. Las fracciones que contienen el procolágeno se agruparon y se concentraron con un centrífugo de 100 kDa de corte (Vivaspin, Vivascience) y se cargaron en una columna de filtración en gel. El cromatograma de filtración en gel (Figura 4) mostró un pico de resolución definida que eluía entre 7,5 - 9,1 ml, antes de la elución del resto de las proteínas (picos de elución: 10 - 18 ml). La tinción con plata (Figuras 5 A - B) y los análisis mediante inmunotransferencia Western (Figura 6 A - B) demostraron una significativa elución del procolágeno en las fracciones 3 y 4. La discrepancia < 1 ml en la definición del volumen de elución en el cual aparecía el pico del procolágeno, según se determina mediante las curvas de absorbancia frente al análisis en gel, es un resultado habitual del volumen de los tubos entre el detector y el tubo colector. Después se concentraron las fracciones 3 y 4 10 veces con un centrífugo de 30 kDa de corte (Vivaspin, Vivascience) y se analizaron mediante una SDS-PAGE, que confirmó claramente el aislamiento del procolágeno con un elevado grado de pureza (Figuras 7 A - B).

La Figura 8 ilustra una precipitación basada en AMS de las fracciones agrupadas del eluido del intercambio aniónico como un método alternativo de purificación del procolágeno, según se ha descrito con detalle anteriormente. La etapa de precipitación con etanol de este protocolo permite la eliminación de la pigmentación verde de la muestra. La proteína resultante es estable y soluble después de una incubación a 4 °C, ciclos de congelación y descongelación y liofilización, según se determina mediante un análisis con una SDS PAGE (Figura 8).

EJEMPLO 2

Incorporación del procolágeno en matrices basadas en colágeno

El colágeno es a menudo el material de elección para que actúe como depósito para la liberación de compuestos terapéuticamente activos, tales como proteínas morfogenéticas óseas, factores de crecimiento, antibióticos, etc. [Meaney Murray M., Rice K., Wright RJ, Spector M. The effect of selected growth factors on human anterior cruciate ligament cell interactions with a three-dimensional collagen-GAG scaffold. J Orthop Res (2003) 21 (2): 238 - 44, Qian Y., Yao G., Lin Z., Chen J., Fan Y., Davey T., Xu J., Zheng M. (2009) Natural bone collagen scaffold combined with OP-1 for bone formation induction *in vivo*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater Epub., Adhirajan N., Shanmugasundaram N., Shanmuganathan S., Babu M. Eur J Pharm Sci (2009) 36 (2-3): 235 - 45. Functionally modified gelatin microspheres impregnated collagen scaffold as novel wound dressing to attenuate the proteases and bacterial growth]. El colágeno puede formarse en láminas, en películas, en membranas, en esponjas y en geles, todos los cuales pueden usarse para la liberación del compuesto activo en el sitio de la herida para ampliar sus capacidades de aplicación terapéutica y sus perfiles farmacocinéticos de liberación.

El procolágeno puede ser absorbido pasivamente en matrices de colágeno, o como alternativa, reticulado activamente con dichas construcciones mediante una exposición a radiación ultravioleta, técnicas deshidrotérmicas (DHT) o a través de reactivos químicos tales como el reticulador de longitud cero clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (Cornwell KG, Lei P, Andreadis ST, Pins GD. J Crosslinking of discrete self-assembled collagen threads: Effects on mechanical strength and cell-matrix interactions. Biomed Mater Res A. Febrero de 2007; 80 (2): 362 - 71).

El presente ejemplo describe tres protocolos que pueden usarse para la incorporación del procolágeno en una matriz de colágeno.

Protocolo nº 1

Se ensambla colágeno de origen animal o recombinante soluble suspendido en HCl 10 mM en fibrillas mezclándolo (9:1 v/v) con Na₂HPO₄ 200 mM, a pH 11,2, seguido de una incubación (4 - 16 h, 25 - 37 °C). El hidrogel formado se concentra hasta 10 - 20 mg/ml mediante una centrifugación y se vierte en un molde de aluminio. El molde se incuba (2 h, -30 °C) y se transfiere a -80 °C durante 30 minutos adicionales, seguido de una etapa de liofilización de 24 horas. Después la matriz de colágeno se sumerge (2 - 6 h, 28 °C) en una solución de reticulación que contiene EDC

10 - 50 mM preparada en etanol al 90 %. El EDC no unido se elimina mediante un lavado tres veces con DDW. El acceso a las moléculas de EDC unidas individualmente se inactiva con una solución de ácido aspártico 10 mM. Después de unos intensos lavados, la muestra se incuba (2 h, -30 °C) y después se transfiere a -80 °C durante 30 minutos adicionales, seguido de una etapa de liofilización de 24 horas. La matriz de colágeno es esterilizada con óxido de etileno (ETO) o con radiación gamma. Media hora antes de la implantación de la matriz, la matriz se sumerge en una solución de procolágeno recombinante para permitir su absorción en la matriz. La matriz enriquecida en procolágeno se fija después al sitio de la herida.

Protocolo nº 2

Se ensambla una matriz fibrilar mediante la mezcla de colágeno de origen animal o recombinante soluble suspendido en HCl 10 mM con procolágeno recombinante en unas proporciones (p/p) que varían desde 95:5 hasta 80:20 y una incubación (4 - 16 h, 25 - 37 °C, a pH 7,4). El hidrogel formado se concentra hasta 10 - 20 mg/ml mediante una centrifugación y se vierte en un molde de aluminio. El molde se incuba (2 h, -30 °C) y se transfiere a -80 °C durante 30 minutos adicionales, seguido de una etapa de liofilización de 24 horas. Después la matriz de colágeno que contiene el procolágeno se sumerge en una solución de reticulación que contiene EDC 10 - 50 mM preparada en etanol al 90 % (2 - 6 h, 28 °C). El EDC no unido se elimina mediante un lavado tres veces con DDW. El acceso a las moléculas de EDC unidas individualmente se inactiva con una solución de ácido aspártico 10 mM. Después de unos intensos lavados, la muestra se incuba (2 h, -30 °C) y se transfiere a -80 °C durante 30 minutos adicionales, seguido de una etapa de liofilización de 24 horas. La matriz híbrida de procolágeno-colágeno resultante se esteriliza con ETO o con radiación gamma.

Protocolo nº 3

Se ensambla colágeno de origen animal o recombinante soluble suspendido en HCl 10 mM en fibrillas mezclándolo (9:1, v/v) con Na₂HPO₄ 200 mM, a pH 11,2, seguido de una incubación (4 - 16 horas, 25 - 37 °C). El hidrogel formado se concentra hasta 10 - 20 mg/ml mediante una centrifugación y se vierte en un molde de aluminio. El molde se incuba (2 h, -30 °C) y se transfiere a -80 °C durante 30 minutos adicionales, seguido de una etapa de liofilización de 24 horas. La matriz en polvo se sumerge después en una solución que contiene procolágeno recombinante para permitir su absorción en la matriz, que a continuación se deja secar a la temperatura ambiente. La matriz de procolágeno-colágeno se sumerge después en una solución de reticulación de EDC 10 - 50 mM preparada en etanol al 90 % (2 - 6 horas, 28 °C). El EDC no unido se elimina mediante un lavado tres veces con DDW. El exceso de moléculas de EDC unidas individualmente se inactiva con una solución de ácido aspártico 10 mM. Después de unos intensos lavados, la muestra se incuba (2 horas, -30 °C) y se transfiere a -80 °C durante 30 minutos adicionales, seguido de una etapa de liofilización de 24 horas. Después la matriz híbrida de procolágeno-colágeno se esteriliza con ETO o con radiación gamma.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CollPlant Ltd. Shoseyov, Oded Dgany, Or Siegel, Daniel L.

<120> MÉTODOS DE GENERACIÓN Y DE USO DEL PROCOLÁGENO

<130> 45364

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1464

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

<223> colágeno alfa 1 de tipo I

<400> 1

ES 2 565 185 T3

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

Pro Gly Ala Pro Gly Pro Gln Gly Phe Gln Gly Pro Pro Gly Glu Pro
 195 200 205
 Gly Glu Pro Gly Ala Ser Gly Pro Met Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly
 210 215 220
 Pro Pro Gly Lys Asn Gly Asp Asp Gly Glu Ala Gly Lys Pro Gly Arg
 225 230 235 240
 Pro Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Ala Arg Gly Leu Pro
 245 250 255
 Gly Thr Ala Gly Leu Pro Gly Met Lys Gly His Arg Gly Phe Ser Gly
 260 265 270
 Leu Asp Gly Ala Lys Gly Asp Ala Gly Pro Ala Gly Pro Lys Gly Glu
 275 280 285
 Pro Gly Ser Pro Gly Glu Asn Gly Ala Pro Gly Gln Met Gly Pro Arg
 290 295 300
 Gly Leu Pro Gly Glu Arg Gly Arg Pro Gly Ala Pro Gly Pro Ala Gly
 305 310 315 320
 Ala Arg Gly Asn Asp Gly Ala Thr Gly Ala Ala Gly Pro Pro Gly Pro
 325 330 335
 Thr Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Phe Pro Gly Ala Val Gly Ala Lys
 340 345 350
 Gly Glu Ala Gly Pro Gln Gly Pro Arg Gly Ser Glu Gly Pro Gln Gly
 355 360 365
 Val Arg Gly Glu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ala Ala Gly Pro
 370 375 380
 Ala Gly Asn Pro Gly Ala Asp Gly Gln Pro Gly Ala Lys Gly Ala Asn
 385 390 395 400
 Gly Ala Pro Gly Ile Ala Gly Ala Pro Gly Phe Pro Gly Ala Arg Gly
 405 410 415
 Pro Ser Gly Pro Gln Gly Pro Gly Gly Pro Pro Gly Pro Lys Gly Asn
 420 425 430
 Ser Gly Glu Pro Gly Ala Pro Gly Ser Lys Gly Asp Thr Gly Ala Lys
 435 440 445
 Gly Glu Pro Gly Pro Val Gly Val Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly
 450 455 460
 Glu Glu Gly Lys Arg Gly Ala Arg Gly Glu Pro Gly Pro Thr Gly Leu
 465 470 475 480
 Pro Gly Pro Pro Gly Glu Arg Gly Gly Pro Gly Ser Arg Gly Phe Pro

485										490										495																																			
Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Ala	Gly	Pro	Lys	Gly	Pro	Ala	Gly	Glu	Arg	Gly																																								
			500					505					510																																										
Ser	Pro	Gly	Pro	Ala	Gly	Pro	Lys	Gly	Ser	Pro	Gly	Glu	Ala	Gly	Arg																																								
		515					520					525																																											
Pro	Gly	Glu	Ala	Gly	Leu	Pro	Gly	Ala	Lys	Gly	Leu	Thr	Gly	Ser	Pro																																								
		530				535					540																																												
Gly	Ser	Pro	Gly	Pro	Asp	Gly	Lys	Thr	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Ala	Gly																																								
		545			550					555																																													
Gln	Asp	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Ala	Arg	Gly	Gln																																								
				565					570																																														
Ala	Gly	Val	Met	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Ala	Ala	Gly	Glu	Pro																																								
			580					585																																															
Gly	Lys	Ala	Gly	Glu	Arg	Gly	Val	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Ala	Val	Gly																																								
		595					600																																																
Pro	Ala	Gly	Lys	Asp	Gly	Glu	Ala	Gly	Ala	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro																																								
		610				615																																																	
Ala	Gly	Pro	Ala	Gly	Glu	Arg	Gly	Glu	Gln	Gly	Pro	Ala	Gly	Ser	Pro																																								
		625			630																																																		
Gly	Phe	Gln	Gly	Leu	Pro	Gly	Pro	Ala	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Ala	Gly																																								
				645																																																			
Lys	Pro	Gly	Glu	Gln	Gly	Val	Pro	Gly	Asp	Leu	Gly	Ala	Pro	Gly	Pro																																								
			660																																																				
Ser	Gly	Ala	Arg	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Pro	Gly	Glu	Arg	Gly	Val	Gln																																								
			675																																																				
Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Ala	Gly	Pro	Arg	Gly	Ala	Asn	Gly	Ala	Pro	Gly																																								
		690				695																																																	
Asn	Asp	Gly	Ala	Lys	Gly	Asp	Ala	Gly	Ala	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Ser																																								
		705				710																																																	
Gln	Gly	Ala	Pro	Gly	Leu	Gln	Gly	Met	Pro	Gly	Glu	Arg	Gly	Ala	Ala																																								
				725																																																			
Gly	Leu	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Asp	Arg	Gly	Asp	Ala	Gly	Pro	Lys	Gly																																								
			740																																																				
Ala	Asp	Gly	Ser	Pro	Gly	Lys	Asp	Gly	Val	Arg	Gly	Leu	Thr	Gly	Pro																																								
			755																																																				
Ile	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Ala	Gly	Ala	Pro	Gly	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser																																								
		770				775																																																	

Gly Pro Ser Gly Pro Ala Gly Pro Thr Gly Ala Arg Gly Ala Pro Gly
785 790 795 800

Asp Arg Gly Glu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Phe Ala Gly Pro
805 810 815

Pro Gly Ala Asp Gly Gln Pro Gly Ala Lys Gly Glu Pro Gly Asp Ala
820 825 830

Gly Ala Lys Gly Asp Ala Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly
835 840 845

Pro Pro Gly Pro Ile Gly Asn Val Gly Ala Pro Gly Ala Lys Gly Ala
850 855 860

Arg Gly Ser Ala Gly Pro Pro Gly Ala Thr Gly Phe Pro Gly Ala Ala
865 870 875 880

Gly Arg Val Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Asn Ala Gly Pro Pro Gly
885 890 895

Pro Pro Gly Pro Ala Gly Lys Glu Gly Gly Lys Gly Pro Arg Gly Glu
900 905 910

Thr Gly Pro Ala Gly Arg Pro Gly Glu Val Gly Pro Pro Gly Pro Pro
915 920 925

Gly Pro Ala Gly Glu Lys Gly Ser Pro Gly Ala Asp Gly Pro Ala Gly
930 935 940

Ala Pro Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln Arg Gly Val
945 950 955 960

Val Gly Leu Pro Gly Gln Arg Gly Glu Arg Gly Phe Pro Gly Leu Pro
965 970 975

Gly Pro Ser Gly Glu Pro Gly Lys Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ser Gly
980 985 990

Glu Arg Gly Pro Pro Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly Leu Ala Gly Pro
995 1000 1005

Pro Gly Glu Ser Gly Arg Glu Gly Ala Pro Gly Ala Glu Gly Ser
1010 1015 1020

Pro Gly Arg Asp Gly Ser Pro Gly Ala Lys Gly Asp Arg Gly Glu
1025 1030 1035

Thr Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala
1040 1045 1050

Pro Gly Pro Val Gly Pro Ala Gly Lys Ser Gly Asp Arg Gly Glu
1055 1060 1065

Thr Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly Pro Val Gly Pro Val Gly Ala

ES 2 565 185 T3

1070	1075	1080
Arg Gly 1085	Pro Ala Gly Pro Gln 1090	Gly Pro Arg Gly Asp 1095
Lys Gly Glu		
Thr Gly 1100	Glu Gln Gly Asp Arg 1105	Gly Ile Lys Gly His 1110
Arg Gly Phe		
Ser Gly 1115	Leu Gln Gly Pro Pro 1120	Gly Pro Pro Gly Ser 1125
Pro Gly Glu		
Gln Gly 1130	Pro Ser Gly Ala Ser 1135	Gly Pro Ala Gly Pro 1140
Arg Gly Pro		
Pro Gly 1145	Ser Ala Gly Ala Pro 1150	Gly Lys Asp Gly Leu 1155
Asn Gly Leu		
Pro Gly 1160	Pro Ile Gly Pro Pro 1165	Gly Pro Arg Gly Arg 1170
Thr Gly Asp		
Ala Gly 1175	Pro Val Gly Pro Pro 1180	Gly Pro Pro Gly Pro 1185
Pro Gly Pro		
Pro Gly 1190	Pro Pro Ser Ala Gly 1195	Phe Asp Phe Ser Phe 1200
Leu Pro Gln		
Pro Pro 1205	Gln Glu Lys Ala His 1210	Asp Gly Gly Arg Tyr 1215
Tyr Arg Ala		
Asp Asp 1220	Ala Asn Val Val Arg 1225	Asp Arg Asp Leu Glu 1230
Val Asp Thr		
Thr Leu 1235	Lys Ser Leu Ser Gln 1240	Gln Ile Glu Asn Ile 1245
Arg Ser Pro		
Glu Gly 1250	Ser Arg Lys Asn Pro 1255	Ala Arg Thr Cys Arg 1260
Asp Leu Lys		
Met Cys 1265	His Ser Asp Trp Lys 1270	Ser Gly Glu Tyr Trp 1275
Ile Asp Pro		
Asn Gln 1280	Gly Cys Asn Leu Asp 1285	Ala Ile Lys Val Phe 1290
Cys Asn Met		
Glu Thr 1295	Gly Glu Thr Cys Val 1300	Tyr Pro Thr Gln Pro 1305
Ser Val Ala		
Gln Lys 1310	Asn Trp Tyr Ile Ser 1315	Lys Asn Pro Lys Asp 1320
Lys Arg His		
Val Trp 1325	Phe Gly Glu Ser Met 1330	Thr Asp Gly Phe Gln 1335
Phe Glu Tyr		
Gly Gly 1340	Gln Gly Ser Asp Pro 1345	Ala Asp Val Ala Ile 1350
Gln Leu Thr		

Phe Leu Arg Leu Met Ser Thr Glu Ala Ser Gln Asn Ile Thr Tyr
 1355 1360 1365

His Cys Lys Asn Ser Val Ala Tyr Met Asp Gln Gln Thr Gly Asn
 1370 1375 1380

Leu Lys Lys Ala Leu Leu Leu Gln Gly Ser Asn Glu Ile Glu Ile
 1385 1390 1395

Arg Ala Glu Gly Asn Ser Arg Phe Thr Tyr Ser Val Thr Val Asp
 1400 1405 1410

Gly Cys Thr Ser His Thr Gly Ala Trp Gly Lys Thr Val Ile Glu
 1415 1420 1425

Tyr Lys Thr Thr Lys Thr Ser Arg Leu Pro Ile Ile Asp Val Ala
 1430 1435 1440

Pro Leu Asp Val Gly Ala Pro Asp Gln Glu Phe Gly Phe Asp Val
 1445 1450 1455

Gly Pro Val Cys Phe Leu
 1460

<210> 2
 <211> 1366
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 <223> colágeno alfa 2 de tipo I

<400> 2

Met Leu Ser Phe Val Asp Thr Arg Thr Leu Leu Leu Leu Ala Val Thr
 1 5 10 15

Leu Cys Leu Ala Thr Cys Gln Ser Leu Gln Glu Glu Thr Val Arg Lys
 20 25 30

Gly Pro Ala Gly Asp Arg Gly Pro Arg Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly
 35 40 45

Pro Pro Gly Arg Asp Gly Glu Asp Gly Pro Thr Gly Pro Pro Gly Pro
 50 55 60

Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Leu Gly Gly Asn Phe Ala Ala Gln
 65 70 75 80

Tyr Asp Gly Lys Gly Val Gly Leu Gly Pro Gly Pro Met Gly Leu Met
 85 90 95

Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Ala Ala Gly Ala Pro Gly Pro Gln Gly
 100 105 110

Phe Gln Gly Pro Ala Gly Glu Pro Gly Glu Pro Gly Gln Thr Gly Pro

ES 2 565 185 T3

115	120	125
Ala Gly Ala Arg Gly Pro 130	Ala Gly Pro Pro Gly 135	Lys Ala Gly Glu Asp 140
Gly His Pro Gly Lys 145	Pro Gly Arg Pro Gly 150	Glu Arg Gly Val Val Gly 155 160
Pro Gln Gly Ala Arg Gly Phe 165	Pro Gly Thr 170	Pro Gly Leu Pro Gly Phe 175
Lys Gly Ile Arg Gly His Asn Gly 180	Leu Asp Gly Leu Lys 185	Gly Gln Pro 190
Gly Ala Pro Gly Val Lys Gly 195	Glu Pro Gly Ala Pro Gly 200 205	Glu Asn Gly
Thr Pro Gly Gln Thr Gly Ala Arg Gly Leu Pro Gly Glu Arg Gly Arg 210 215 220		
Val Gly Ala Pro Gly Pro Ala Gly Ala Arg Gly Ser Asp Gly Ser Val 225 230 235 240		
Gly Pro Val Gly Pro Ala Gly Pro Ile Gly Ser Ala Gly Pro Pro Gly 245 250 255		
Phe Pro Gly Ala Pro Gly Pro Lys Gly Glu Ile Gly Ala Val Gly Asn 260 265 270		
Ala Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Glu Val Gly Leu Pro 275 280 285		
Gly Leu Ser Gly Pro Val Gly Pro Pro Gly Asn Pro Gly Ala Asn Gly 290 295 300		
Leu Thr Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Leu Pro Gly Val Ala Gly Ala 305 310 315 320		
Pro Gly Leu Pro Gly Pro Arg Gly Ile Pro Gly Pro Val Gly Ala Ala 325 330 335		
Gly Ala Thr Gly Ala Arg Gly Leu Val Gly Glu Pro Gly Pro Ala Gly 340 345 350		
Ser Lys Gly Glu Ser Gly Asn Lys Gly Glu Pro Gly Ser Ala Gly Pro 355 360 365		
Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Glu Glu Gly Lys Arg Gly Pro Asn 370 375 380		
Gly Glu Ala Gly Ser Ala Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Leu Arg Gly 385 390 395 400		
Ser Pro Gly Ser Arg Gly Leu Pro Gly Ala Asp Gly Arg Ala Gly Val 405 410 415		

Met Gly Pro Pro Gly Ser Arg Gly Ala Ser Gly Pro Ala Gly Val Arg
420 425 430

Gly Pro Asn Gly Asp Ala Gly Arg Pro Gly Glu Pro Gly Leu Met Gly
435 440 445

Pro Arg Gly Leu Pro Gly Ser Pro Gly Asn Ile Gly Pro Ala Gly Lys
450 455 460

Glu Gly Pro Val Gly Leu Pro Gly Ile Asp Gly Arg Pro Gly Pro Ile
465 470 475 480

Gly Pro Ala Gly Ala Arg Gly Glu Pro Gly Asn Ile Gly Phe Pro Gly
485 490 495

Pro Lys Gly Pro Thr Gly Asp Pro Gly Lys Asn Gly Asp Lys Gly His
500 505 510

Ala Gly Leu Ala Gly Ala Arg Gly Ala Pro Gly Pro Asp Gly Asn Asn
515 520 525

Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Val Gln Gly Gly Lys Gly
530 535 540

Glu Gln Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Phe Gln Gly Leu Pro Gly Pro
545 550 555 560

Ser Gly Pro Ala Gly Glu Val Gly Lys Pro Gly Glu Arg Gly Leu His
565 570 575

Gly Glu Phe Gly Leu Pro Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Glu Arg Gly
580 585 590

Pro Pro Gly Glu Ser Gly Ala Ala Gly Pro Thr Gly Pro Ile Gly Ser
595 600 605

Arg Gly Pro Ser Gly Pro Pro Gly Pro Asp Gly Asn Lys Gly Glu Pro
610 615 620

Gly Val Val Gly Ala Val Gly Thr Ala Gly Pro Ser Gly Pro Ser Gly
625 630 635 640

Leu Pro Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Ile Pro Gly Gly Lys Gly Glu
645 650 655

Lys Gly Glu Pro Gly Leu Arg Gly Glu Ile Gly Asn Pro Gly Arg Asp
660 665 670

Gly Ala Arg Gly Ala Pro Gly Ala Val Gly Ala Pro Gly Pro Ala Gly
675 680 685

Ala Thr Gly Asp Arg Gly Glu Ala Gly Ala Ala Gly Pro Ala Gly Pro
690 695 700

Ala Gly Pro Arg Gly Ser Pro Gly Glu Arg Gly Glu Val Gly Pro Ala

705		710		715		720
Gly Pro Asn Gly	Phe Ala Gly	Pro Ala Gly	Ala Ala Gly	Gln Pro Gly		
	725		730		735	
Ala Lys Gly Glu Arg Gly	Ala Lys Gly	Pro Lys Gly	Glu Asn Gly	Val		
	740		745		750	
Val Gly Pro Thr Gly	Pro Val Gly	Ala Ala Gly	Pro Ala Gly	Pro Asn		
	755		760		765	
Gly Pro Pro Gly	Pro Ala Gly	Ser Arg Gly	Asp Gly	Gly Pro Pro Gly		
	770		775		780	
Met Thr Gly Phe Pro Gly	Ala Ala Gly	Arg Thr Gly	Pro Pro Gly	Pro		
	785		790		795	800
Ser Gly Ile Ser Gly	Pro Pro Gly	Pro Gly	Pro Ala Gly	Lys Glu		
	805		810		815	
Gly Leu Arg Gly	Pro Arg Gly	Asp Gln Gly	Pro Val Gly	Arg Thr Gly		
	820		825		830	
Glu Val Gly Ala Val Gly	Pro Pro Gly	Phe Ala Gly	Glu Lys Gly	Pro		
	835		840		845	
Ser Gly Glu Ala Gly	Thr Ala Gly	Pro Pro Gly	Thr Pro Gly	Pro Gln		
	850		855		860	
Gly Leu Leu Gly Ala	Pro Gly Ile Leu Gly	Leu Pro Gly	Ser Arg Gly			
	865		870		875	880
Glu Arg Gly Leu Pro Gly	Val Ala Gly	Ala Val Gly	Glu Pro Gly	Pro		
	885		890		895	
Leu Gly Ile Ala Gly	Pro Pro Gly	Ala Arg Gly	Pro Pro Gly	Ala Val		
	900		905		910	
Gly Ser Pro Gly Val Asn	Gly Ala Pro Gly	Glu Ala Gly	Arg Asp Gly			
	915		920		925	
Asn Pro Gly Asn Asp Gly	Pro Pro Gly	Arg Asp Gly	Gln Pro Gly	His		
	930		935		940	
Lys Gly Glu Arg Gly Tyr	Pro Gly Asn Ile	Gly Pro Val Gly	Ala Ala			
	945		950		955	960
Gly Ala Pro Gly Pro His	Gly Pro Val Gly	Pro Ala Gly	Lys His Gly			
	965		970		975	
Asn Arg Gly Glu Thr Gly	Pro Ser Gly	Pro Val Gly	Pro Ala Gly	Ala		
	980		985		990	
Val Gly Pro Arg Gly Pro Ser	Gly Pro Gln Gly	Ile Arg Gly	Asp Lys			
	995		1000		1005	

Gly	Glu	Pro	Gly	Glu	Lys	Gly	Pro	Arg	Gly	Leu	Pro	Gly	Leu	Lys
1010						1015					1020			
Gly	His	Asn	Gly	Leu	Gln	Gly	Leu	Pro	Gly	Ile	Ala	Gly	His	His
1025						1030					1035			
Gly	Asp	Gln	Gly	Ala	Pro	Gly	Ser	Val	Gly	Pro	Ala	Gly	Pro	Arg
1040						1045					1050			
Gly	Pro	Ala	Gly	Pro	Ser	Gly	Pro	Ala	Gly	Lys	Asp	Gly	Arg	Thr
1055						1060					1065			
Gly	His	Pro	Gly	Thr	Val	Gly	Pro	Ala	Gly	Ile	Arg	Gly	Pro	Gln
1070						1075					1080			
Gly	His	Gln	Gly	Pro	Ala	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro
1085						1090					1095			
Gly	Pro	Pro	Gly	Val	Ser	Gly	Gly	Gly	Tyr	Asp	Phe	Gly	Tyr	Asp
1100						1105					1110			
Gly	Asp	Phe	Tyr	Arg	Ala	Asp	Gln	Pro	Arg	Ser	Ala	Pro	Ser	Leu
1115						1120					1125			
Arg	Pro	Lys	Asp	Tyr	Glu	Val	Asp	Ala	Thr	Leu	Lys	Ser	Leu	Asn
1130						1135					1140			
Asn	Gln	Ile	Glu	Thr	Leu	Leu	Thr	Pro	Glu	Gly	Ser	Arg	Lys	Asn
1145						1150					1155			
Pro	Ala	Arg	Thr	Cys	Arg	Asp	Leu	Arg	Leu	Ser	His	Pro	Glu	Trp
1160						1165					1170			
Ser	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Trp	Ile	Asp	Pro	Asn	Gln	Gly	Cys	Thr	Met
1175						1180					1185			
Asp	Ala	Ile	Lys	Val	Tyr	Cys	Asp	Phe	Ser	Thr	Gly	Glu	Thr	Cys
1190						1195					1200			
Ile	Arg	Ala	Gln	Pro	Glu	Asn	Ile	Pro	Ala	Lys	Asn	Trp	Tyr	Arg
1205						1210					1215			
Ser	Ser	Lys	Asp	Lys	Lys	His	Val	Trp	Leu	Gly	Glu	Thr	Ile	Asn
1220						1225					1230			
Ala	Gly	Ser	Gln	Phe	Glu	Tyr	Asn	Val	Glu	Gly	Val	Thr	Ser	Lys
1235						1240					1245			
Glu	Met	Ala	Thr	Gln	Leu	Ala	Phe	Met	Arg	Leu	Leu	Ala	Asn	Tyr
1250						1255					1260			
Ala	Ser	Gln	Asn	Ile	Thr	Tyr	His	Cys	Lys	Asn	Ser	Ile	Ala	Tyr
1265						1270					1275			
Met	Asp	Glu	Glu	Thr	Gly	Asn	Leu	Lys	Lys	Ala	Val	Ile	Leu	Gln

1280		1285		1290
Gly Ser Asn Asp Val Glu Leu Val Ala Glu Gly Asn Ser Arg Phe				
1295		1300		1305
Thr Tyr Thr Val Leu Val Asp Gly Cys Ser Lys Lys Thr Asn Glu				
1310		1315		1320
Trp Gly Lys Thr Ile Ile Glu Tyr Lys Thr Asn Lys Pro Ser Arg				
1325		1330		1335
Leu Pro Phe Leu Asp Ile Ala Pro Leu Asp Ile Gly Gly Ala Asp				
1340		1345		1350
Gln Glu Phe Phe Val Asp Ile Gly Pro Val Cys Phe Lys				
1355		1360		1365

<210> 3
 <211> 5927
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 <223> colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), ARNm

<400> 3

tcgtcggagc agacgggagt ttctctcctgg ggtcggagca ggaggcacgc ggagtgtgag	60
gccacgcatg agcggagcgt aacccccctc ccagccacaa agagtctaca tgtctagggg	120
ctagacatgt tcagctttgt ggacctccgg ctctgtctcc tcttagcggc caccgccc	180
ctgacgcacg gccaaagagga agggccaagt gagggccaag acgaagacat cccaccaatc	240
acctgcgtac agaacggcct caggtaccat gaccgagacg tgtggaaacc cgagccctgc	300
cggatctgag tctgcgacaa cggcaagggt ttgtgcgatg acgtgatctg tgacgagacc	360
aagaactgcc ccggcgccga agtccccgag ggcgagtgct gtcccgtctg ccccgacggc	420
tcagagtcac ccaccgacca agaaaccacc ggcgtcgagg gacccaaggg agacactggc	480
ccccgaggcc caaggggacc cgcaggcccc cctggccgag atggcatccc tggacagcct	540
ggacttcccg gaccccccgga accccccgga cctcccggac cccctggcct cggaggaaac	600
tttgcctccc agctgtctta tggctatgat gagaaatcaa ccggagggaat ttccgtgcct	660
ggccccatgg gtccctcttg tctctgtggg ctccctggcc cccctgggtg acctggctcc	720
caaggcttcc aagggtcccc tggtagacct ggcgagcctg gagcttcagg tcccatgggt	780
ccccgaggtc cccaggtcc cctgggaaag aatggagatg atggggaagc tggaaaacct	840
ggtcgtcctg gtgagcgtgg gcctcctggg cctcagggtg ctcgaggatt gcccggaaca	900
gttggcctcc ctggaatgaa gggacacaga ggtttcagtg gtttggtatg tgccaaggga	960
gatgctggtc ctgctgttcc taagggtagg cctggcagcc ctggtgaaaa tggagctcct	1020
ggtcagatgg gccccctgg cctgcctggg gagagaggtc gccctggagc ccttggccct	1080
gctgggtgctc ttggaaatga tgggtctact ggtgctgccg ggccccctgg tcccaccggc	1140
cccgtgggtc ctccctggct cctgggtgct gttggtgcta aggggtgaagc tgggtcccaa	1200

gggccccgag gctctgaagg tccccagggg gtgcgtgggt agcctggccc ccctggccct 1260
 gctgggtgctg ctggccctgc tggaaacctt ggtgctgatg gacagcctgg tgctaaaggt 1320
 gccaatgggtg ctcttggtat tgctgggtgct cctggcttcc ctggtgcccg agggccctct 1380
 ggaccccagg gccccggcgg cctcctctgt cccaagggta acagcgggtga acctgggtgct 1440
 cctggcagca aaggagacac tgggtgctaag ggagagcctg gccctggttg tgttcaagga 1500
 cccctggccc ctgctggaga ggaaggaaag cgaggagctc gaggtgaacc cggaccact 1560
 ggctgcccc gacccctgg cgagcgtggg ggacctggta gccgtggttt ccctggcgca 1620
 gatgggtgtg ctgggtccaa ggggtccgct ggtgaacgtg gttctctctg ccctgctggc 1680
 cccaaaggat ctcttggtga agctggctgt cccgggtgaag ctgggtctgc tgggtccaag 1740
 ggtctgactg gaagccctgg cagccctggg cctgatggca aaactggccc ccctggctcc 1800
 gccggtcaag atggctgccc cggaccccca gggccacctg gtgcccgtgg tcaggctggt 1860
 gtgatgggat tccctggacc taaaggtgct gctggagagc ccggcaaggc tggagagcga 1920
 ggtgttcccc gacccctgg cgtgtctggt cctgctggca aagatggaga ggctggagct 1980
 cagggacccc ctggccctgc tgggtccgct ggcgagagag gtgaacaagg ccctgctggc 2040
 tccccggat tccagggtct ccctggtcct gctggctctc caggtgaagc aggcaaacct 2100
 ggtgaacagg gtgttccctg agaccttggc gccctggcc cctctggagc aagaggcgag 2160
 agaggtttcc ctggcgagcg tgggtgtcaa ggtcccccctg gtccctgctg tccccgagg 2220
 gccaacgggtg ctcccggcaa cgatggtgct aagggtgatg ctggtgcccc tggagctccc 2280
 ggtagccagg gcgcccctgg ccttcaggga atgcctgggt aacgtgggtc agctggctct 2340
 ccagggccta aggggtgacg aggtgatgct ggtcccaaa gtgctgatgg ctctcctggc 2400
 aaagatggcg tccgtggtct gaactggccc attggctctc ctggccctgc tgggtcccct 2460
 ggtgacaagg gtgaaagtgg tcccagcggc cctgctggte ccaactggagc tctgtggtgc 2520
 cccggagacc gtgggtgagc tgggtccccc ggccctgctg gctttgctgg ccccccctgt 2580
 gctgacggcc aacctggtgc taaaggcgaa cctggtgatg ctggtgctaa aggcgatgct 2640
 ggtcccccctg gccctgcccg acccgtgga ccccccggcc ccattggtaa tgttgggtgct 2700
 cctggagcca aagggtgctg cggcagcgt ggtccccctg gtgctactgg tttccctggt 2760
 gctgctggcc gagtgggtcc tcctggcccc tctggaaatg ctggaccccc tggccctcct 2820
 ggtcctgctg gcaaaagaag cggcaaagggt ccccggtgtg agactggccc tgttggaagt 2880
 cctggtgaag ttgggtcccc tgggtccctt ggccctgctg gcgagaaagg atccctggt 2940
 gctgatggtc ctgctggtgc tcctggtact cccgggctc aaggtattgc tggacagcgt 3000
 ggtgtggtcg gcctgctgg tcagagagga gagagaggct tccctggtct tcctggcccc 3060
 tctggtgaac ctggcaaaac aggtccctct ggagcaagtg gtgaacgtgg tccccctggt 3120
 cccatgggcc cccctggatt ggtgggacct cctggtgaat ctggacgtga gggggctcct 3180
 ggtgccgaag gttccctgg acgagacggt tctcctggcg ccaagggtga ccgtggtgag 3240
 accggccccg ctggaccccc tgggtgctct ggtgctcctg gtgcccctgg ccccggtggc 3300
 cctgctggca agagtgggtg tcgtggtgag actggtcctg ctgggtccgc cggctcctgc 3360
 ggccctgttg gcgcccgtgg ccccgccgga cccaaggcc cccgtggtga caagggtgag 3420

acaggcgaaac agggcgacag aggcataaag ggtcaccgtg gcttctcttg cctccagggt 3480
ccccctggcc ctccctggctc tccctggtag caaggtccct ctggagcctc tggctcctgt 3540
ggtccccgag gtccccctgg ctctgctggt gctcctggca aagatggact caacggtctc 3600
cctggcccca ttggggcccc tggctcctgc ggtcgactg gtgatgctgg tcctgttggt 3660
ccccccggcc ctccctggacc tccctggccc cctggctcctc ccagcgctgg ttctgacttc 3720
agcttccctgc ccagccacc tcaagagaag gctcacgatg gtggccgcta ctaccgggt 3780
gatgatgcca atgtggttcg tgaccgtgac ctcgaggtgg acaccaccct caagagcctg 3840
agccagcaga tcgagaaeat ccggagccca gagggcagcc gcaagaacct cggccgcacc 3900
tgccgtgacc tcaagatgtg ccactctgac tggaaagagt gagagtactg gattgacccc 3960
aaccaaggct gcaacctgga tgccatcaaa gtcttctgca acatggagac tggtagagac 4020
tgctgtgacc ccactcagcc cagtgtggcc cagaagaact ggtacatcag caagaacccc 4080
aaggacaaga ggcattgtctg gtccggcgag agcatgaccg atggattcca gttcgagtat 4140
ggcgccagag gctccgaccc tgccgatgtg gccatccagc tgaccttcct gcgcctgatg 4200
tccaccgagg cctcccagaa catcacctac cactgcaaga acagcgtagc ctacatggac 4260
cagcagactg gcaacctcaa gaaggccctg ctctccagag gctccaacga gatcgagatc 4320
cgcgccgagg gcaacagccg ctccacctac agcgctcactg tcgatggctg cagcagtcac 4380
accggagcct ggggcaagac agtgattgaa taaaaacca ccaagacctc ccgcctgccc 4440
atcatcgatg tggccccctt ggacgttggt gcccagacc aggaattcgg ctctgacgtt 4500
ggccctgtct gcttctgtta aactccctcc atcccaacct ggctccctcc caccacaacca 4560
actttcccc caaccggaa acagacaagc aaccacaact gaacccctc aaaagccaaa 4620
aaatgggaga caatttcaca tggacttttg aaaatatatt tttcctttgc attcatctct 4680
caaaacttagt ttttatcttt gaccaaccga acatgaccaa aaaccaaaag tgcattcaac 4740
cttaccaaaa aaaaaaaaaa aaaaagaata aataaataac tttttaaaaa aggaagcttg 4800
gtccacttgc ttgaagaccc atgcgggggt aagtcctttt ctgcccgttg ggcttatgaa 4860
accccaatgc tgccctttct gctcctttct ccacaccccc ctgggggctt cccctccact 4920
ccttcccaa tctgtctccc cagaagacac aggaacaact gtattgtctg ccagcaatc 4980
aaaggcaatg ctcaaacacc caagtggccc ccacctcag ccgctcctg ccgcccagc 5040
accccaggg cctgggggac ctgggggtct cagactgcca aagaagcctt gccatctggc 5100
gtcccatggt ctcttgcaac atctccctt cgtttttgag ggggtcatgc cgggggagcc 5160
accagccct cactgggttc ggaggagagt caggaaaggg cagacaaaag cagaaacatc 5220
ggatttgagg aacgcgtgtc aatcccttgt gccgcagggc tgggcgggag agactgttct 5280
gttccttgtg taactgtgtt gctgaaagac tacctcgttc ttgtcttgat gtgtcacogg 5340
ggcaactgcc tggggggcgg gatgggggca ggggtggaag ggctcccat tttataccaa 5400
aggtgctaca tctatgtgat ggggtgggtg gggagggaat cactggtgct atagaaattg 5460
agatgcccc ccagccagc aaatgttctt ttttgtcaa agtctatttt tattccttga 5520
tatttttctt tttttttttt ttttttgtg gatggggact tgtgaatttt tctaaaggtg 5580
ctatttaaca tgggaggaga gcgtgtgcgg ctccagccca gcccgctgct cactttccac 5640

cctctctcca cctgcctctg gcttctcagg cctctgctct ccgacctctc tcctctgaaa 5700
 ccctctctcca cagctgcagc ccctctctcc ggctccctcc tagctgtgcc tgcgtcctct 5760
 gtccccgggt ttcagagaca acttcccaaa gcacaaagca gtttttcccc ctagggggtg 5820
 gaggaagcaa aagactctgt acctattttg tatgtgtata ataatttgag atgtttttaa 5880
 ttattttgat tgctggaata aagcatgtgg aaatgaccca aacataa 5927

<210> 4
 <211> 5411
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Colágeno, tipo I, alfa 2 (COL1A2), ARNm

<400> 4

gtgtcccata gtgtttccaa acttggaag ggcgggggag ggcgggagga tgcggagggc 60
 ggaggtatgc agacaacgag tcagagtttc cccttgaaag cctcaaaagt gtccacgtcc 120
 tcaaaaagaa tggaaccaat ttaagaagcc agccccgtgg ccacgtccct tccccattc 180
 gctccctect ctgccccccc gcaggctcct ccagctgtg gctgccccgg cccccagccc 240
 cagccctccc attggtggag gcccttttgg aggcacccta ggccagggga aacttttgcc 300
 gtataaatag ggcagatccg ggctttatta ttttagcacc acggcagcag gaggtttcgg 360
 ctaagtggga ggtactggcc acgactgcat gcccgcccc gccaggtgat acctccgccg 420
 gtgaccaggg ggctctgcga cacaaggagt ctgcatgtct aagtgtaga catgetcagc 480
 tttgtggata cgcggacttt gttgctgctt gcagtaacct tatgcctagc aacatgcca 540
 tctttacaag aggaaactgt aagaaagggc ccagccggag atagaggacc acgtggagaa 600
 aggggtccac caggcccccc aggcagagat ggtgaagatg gtcccacagg cctcctggt 660
 ccacctggtc ctctggccc ccctggtctc ggtgggaact ttgctgetca gtatgatgga 720
 aaaggagtgt gacttggccc tggaccaatg ggcttaatgg gacctagagg ccacctggt 780
 gcagctggag cccagggccc tcaaggtttc caaggacctg ctggtgagcc tggtaacct 840
 ggtcaaaactg gtctgcagg tctcgtggt ccagctggcc ctctggcaa ggctgggtgaa 900
 gatggtcacc ctggaaaacc cggacgacct ggtgagagag gattgttgg accacaggg 960
 gctcgtggtt tccctggaac tcctggactt cctggcttca aaggcattag gggacacaat 1020
 ggtctggatg gattgaagg acagcccggt gctcctggtg tgaagggtga acctggtgcc 1080
 cctggtgaaa atggaactcc aggtcaaaaca ggagcccggt ggcttcctgg tgagagagga 1140
 cgtgttgggt cccctggccc agctggtgcc cgtggcagtg atggaagtgt gggccccgtg 1200
 ggtcctgctg gtcccattgg gtctgctggc cctccaggct tcccagggtc ccttggcccc 1260
 aagggtgaaa ttggagctgt tggtaacgct ggtcctgctg gtcccgccgg tccccgtggt 1320
 gaagtgggtc ttccaggcct ctccggcccc gttggacctc ctggtaatcc tggagcaaac 1380
 ggccctactg gtgccaaggg tctgctgggc cttccccggc ttgctggggc tccccgctc 1440
 cctggacccc gcggtattcc tggccctggt ggtgctgccg gtgctactgg tgccagagga 1500
 cttgttggtg agcctggtcc agctggctcc aaaggagaga gcggtacaaa gggtagagcc 1560

ggctctgctg ggccccaagg tcctcctggt cccagtggtg aagaaggaaa gagaggccct	1620
aatggggaag ctggatctgc cgccctcca ggacctcctg ggctgagagg tagtcctggt	1680
tctcgtggte ttectggagc tgatggcaga gctggcgtea tggccctcc tggtagtctg	1740
ggtgcaagtg gccctgctgg agtcgagga cctaattgag atgctggtcg cctggggag	1800
cctggtctca tgggaccag aggtcttcct ggttccctg gaaatatcg ccccgctgga	1860
aaagaaggtc ctgtcggcct ccctggcatc gacggcaggc ctggcccaat tggccagct	1920
ggagcaagag gagagcctgg caacattgga ttccctggac ccaaaggccc cactggtgat	1980
cctggcaaaa acggtgataa aggtcatget ggtcttgctg gtgctcgggg tgctccaggt	2040
cctgatggaa acaatggtgc tcagggacct cctggaccac aggggtttca aggtgaaaa	2100
ggtgaacagg gtccctctgg tcctccaggc ttccagggtc tgectggccc ctccaggtccc	2160
gctggtgaag ttggcaaacc aggagaaagg ggtctccatg gtgagtttg tctccctggt	2220
cctgctggtc caagagggga acgcggtccc ccaggtgaga gtggtgctgc cggctctact	2280
ggtcctattg gaagccgagg tccttctgga ccccagggc ctgatggaaa caagggtgaa	2340
cctggtgtgg ttggtgctgt gggcactgct ggtccatctg gtctagtgg actcccagga	2400
gagaggggtg ctgctggcat acctggaggc aaggagaaaa aggggaacc tggctcaga	2460
ggtgaaattg gtaacctgga cagagatggt gctcgtggtg ctctggtgc ttaggtgccc	2520
cctggtcctg ctggagccac aggtgaccgg ggcgaagctg gggctgctgg tcctgctggt	2580
cctgctggtc ctcggggaag ccctggtgaa cgtggtgagg tcggtcctgc tggcccaat	2640
ggatttgctg gtctgctggt tgctgctggt caacctggtg ctaaaggaga aagaggagcc	2700
aaagggccta aggggtgaaa cggtgttgtt ggtcccacag gcccggttg agctgctggc	2760
ccagctggtc caaatggtcc ccccggtcct gctggaagtc gtggtgatgg agggccctct	2820
ggatgactg gtttccctgg tgctgctgga cggactggtc ccccaggacc ctctggtatt	2880
tctggccctc ctggtecccc tggctcctgct gggaaagaag ggcttcgtgg tcctcgtggt	2940
gaccaaggtc cagttggcgg aactggagaa gtaggtgag ttggtccccc tggttcgct	3000
ggtgagaagg gtccctctgg agaggtggt actgctggac ctctggcac tccaggtcct	3060
cagggtcttc ttggtgctcc tggattctg ggtctccctg gctcgagagg tgaactggt	3120
ctaccagggt ttgctggtgc tgtgggtgaa cctggtcctc ttggcattgc cggccctcct	3180
ggggccctg gtctcctggt tgctgtgggt agtctggag tcaacggtgc tcctggtgaa	3240
gctggtcgtg atggcaaccc tgggaacgat ggtcccccag gtcgcgatgg tcaaccggga	3300
cacaaggag agcgcggtta ccctggcaat attggtcccg ttggtgctgc aggtgcacct	3360
ggtcctcatg gcccggtggg tcctgctggc aaacatggaa accgtggtga aactggtcct	3420
tctggtcctg ttggtcctgc tgggtgctgt ggcccaagag gtctagtgg cccacaaggc	3480
attcgtggcg ataagggaga gcccggtgaa aaggggccca gaggtcttcc tggcttaaa	3540
ggacacaatg gattgcaagg tctgcctggt atcgtggtc accatggtga tcaagggtgt	3600
cctggtcctg tgggtcctgc tggctcctagg ggcctgctg gtccctctg cctgctgga	3660
aaagatggtc gcactggaca tcctggtaca gttggacctg ctggcattcg aggcctcag	3720
ggtcaccaag gccctgctgg cccctcctggt cccctggcc ctccctggacc tccaggtgta	3780

```

agcgggtggtg gttatgactt tggttacgat ggagacttct acagggctga ccagcctcgc 3840
tcagcacctt ctctcagacc caaggactat gaagttgatg ctactctgaa gtctctcaac 3900
aaccagattg agacccttct tactcctgaa ggctctagaa agaaccacgc tcgcacatgc 3960
cgtgacttga gactcagcca ccagagtgg agcagtgggt actactggat tgaccctaac 4020
caaggatgca ctatggatgc tatcaaagta tactgtgatt tctctactgg cgaaacctgt 4080
atccgggccc aacctgaaaa catcccagcc aagaactgggt ataggagctc caaggacaag 4140
aaacacgtct ggctaggaga aactatcaat gctggcagcc agtttgaata taatgtagaa 4200
ggagtgaact ccaaggaaat ggctacccaa ctgtccttca tgcgcctgct ggccaactat 4260
gcctctcaga acatcaccta ccaactgcaag aacagcattg catacatgga tgaggagact 4320
ggcaacctga aaaaggctgt cattctacag ggctctaagt atgttgaact tgttgetgag 4380
ggcaacagca ggttcactta cactgttctt gtagatggct gctctaaaaa gacaaatgaa 4440
tggggaaaga caatcattga atacaaaaca aataagccat cagcctgcc cttccttgat 4500
attgcacctt tggacatcgg tgggtctgac caggaattct ttgtggacat tggcccagtc 4560
tgtttcaaat aaatgaactc aatctaaatt aaaaaagaaa gaaatttgaa aaaactttct 4620
ctttgccatt tcttcttctt cttttttaac tgaaagctga atccttccat ttctcttgca 4680
catctacttg cttaaattgt gggcaaaaga gaaaaagaag gattgatcag agcattgtgc 4740
aatacagttt cattaaactc ttccccgct cccccaaaaa tttgaatttt tttttcaaca 4800
ctcttacacc tgttatggaa aatgtcaacc tttgtaagaa aaccaaaata aaaattgaaa 4860
aataaaaacc ataaacattt gcaccacttg tggcttttga atatcttcca cagaggggaag 4920
tttaaaaccc aaacttccaa aggtttaaac tacctcaaaa cactttccca tgagtgtgat 4980
ccacattgtt aggtgctgac ctgacagag atgaactgag gtccttgttt tgttttgttc 5040
ataatacaaa ggtgctaatt aatagtattt cagatacttg aagaatgttg atgggtctag 5100
aagaatttga gaagaaatac tctgtatttg agttgtatcg tgtggtgat tttttaaaaa 5160
atttgattta gcattcatat ttcccatctt attcccaatt aaaagtatgc agattatttg 5220
cccaaactct cttcagatc agcatttgtt ctttgccagt ctcatcttca tcttcttcca 5280
tggttccaca gaagctttgt ttcttgggca agcagaaaaa ttaaattgta cctattttgt 5340
atatgtgaga tgtttaataa aattgtgaaa aaaatgaaat aaagcatgtt tggttttcca 5400
aaagaacata t 5411

```

<210> 5

<211> 1633

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> La secuencia sintética contiene las regiones codificantes de la secuencia señal vascular del gen de la cebada para el precursor de la tiol proteasa aleuraina fusionado a la subunidad beta de la 4-hidroxilasa de prolilo y regiones flanqueantes.

10

<400> 5

```

ctcgagtaaa ccatggctca tgctaggggtt ttgcttttgg ctcttgctgt tcttgctact    60
gctgctgttg ctgtggcttc ttcttcctct ttcgctgatt ctaaccaat tagggcagtg    120
actgatagag ctgcttctac tcttgctcaa ttggtcgaca tggatgctcc agaagaggag    180

gatcacgttc ttgtgcttag gaagtctaac ttcgctgaag ctcttgctgc tcacaagtac    240
cttcttggtg agttttatgc tccttggtgc ggacattgca aagctcttgc tccagagtat    300
gctaaggctg ctggaaagt gaaggctgag ggaactgaaa ttaggcttgc taaagtggat    360
gctactgagg agtctgatct tgctcaacag tacggagtta ggggataccc aactattaag    420
ttcttcagga acggagatac tgcttctcca aaggagtata ctgctggaag ggaggctgat    480
gatattgtga actggcttaa gaagagaact ggaccagctg ctactactct tccagatgga    540
gctgctgctg aatctcttgt ggagtcctct gaggtggcag tgattggatt cttcaaggat    600
gtggagtctg attctgctaa gcagttcctt caagctgctg aggctattga tgatattcca    660
ttcggaatta cttctaactc tgatgtgttc tctaagtacc agcttgataa ggaaggagt    720
gtgcttttca agaaattcga tgagggaagg aacaatttcg agggagaggt gacaaaggag    780
aaccttcttg atttcattaa gcacaaccag ctccacttg tgattgagtt cactgagcag    840
actgctcaa agattttcgg aggagagatt aagactcaca ttcttctttt ccttccaaag    900
tctgtgtctg attacgatgg aaagttgtct aacttcaaga ctgctgctga gtctttcaag    960
ggaaagattc ttttcatttt cattgattct gatcacactg ataaccagag gattcttgag   1020
ttcttcggac ttaagaagga agagtgccca gctgttaggc ttattactct tgaggaggag   1080
atgactaagt acaagccaga gtctgaagaa cttactgctg agaggattac tgagttctgc   1140
cacagattcc ttgagggaaa gattaagcca caccttatgt ctcaagagct tccagaggat   1200
tggaataagc agccagttaa ggtgttggtg ggtaaaaact tcgaggatgt ggctttcgat   1260
gagaagaaga acgtgttctg ggagttctac gcaccttggt gtggtcactg taagcagctt   1320
gctccaattt gggataagtt gggagagact tacaaggatc acgagaacat tgtgattgct   1380
aagatggatt ctactgctaa cgaggtggag gctgttaagg ttcactcttt cccaactttg   1440
aagttcttcc cagcttctgc tgataggact gtgattgatt acaacggaga aaggactctt   1500
gatggattca agaagttcct tgagtctgga ggacaagatg gagctggaga tgatgatgat   1560
cttgaggatt tggaagaagc tgaggagcca gatatggagg aggatgatga tcagaaggct   1620
gtgtgatgag etc                                                                1633

```

<210> 6

<211> 1723

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> La secuencia sintética contiene las regiones codificantes de la secuencia señal vascular del gen de la cebada para el precursor de la tiol proteasa aleuraina fusionado a la subunidad alfa-1 de la 4-hidroxilasa de prolilo y regiones flanqueantes

10

<400> 6

```

ctcagagtaaa ccatgggtca tgctagggtt ttgcttttgg ctcttgtgt tcttgctact      60
gctgctgttg ctgtgggttc ttcttcatct ttcgttgatt ctaacccaat taggccagt      120
actgatagag ctgcttctac tcttgctcaa ttggtcgaca tgcaccagc attcttctact      180
tctattggac agatgactga tcttattcac actgagaagg atcttgtgac ttctcttaag      240
gattacatta aggctgagga ggataagttg gagcagatta agaagtgggc tgagaagttg      300

gataggctta cttctactgc tacaaaagat ccagagggat tcgttgggtca tccagtgaac      360
gctttcaagt tgatgaagag gcttaacact gagtggagtg agcttgagaa ccttgtgctt      420
aaggatatgt ctgatggatt ctttctaac cttactatc agaggcagta cttcccaaat      480
gatgaggatc aagtgggagc tgctaaggct cttcttaggc ttcaggatac ttacaacctt      540
gatactgata caatttctaa gggaaacctt ccaggagtta agcacaagtc tttccttact      600
gctgaggatt gcttcgagct tggaaaggtt gcatacactg aggctgatta ctaccacact      660
gagcttttga tggaacaagc tcttaggcaa cttgatgagg gagagatttc tactattgat      720
aagggtgcag tgcttgatta ctttcttac gctgtgtacc agcagggtga tcttgataag      780
gctcttttgc ttactaagaa gttgcttgag cttgatccag aacatcagag ggctaacgga      840
aaccttaagt acttcgagta cattatggct aaggaaaagg atgtgaacaa gtctgcttct      900
gatgatcagt ctgatcaaaa gactactcca aagaagaagg gagtggctgt tgattatctt      960
cctgagaggc agaagtatga gatgttgtgt aggggagagg gtattaagat gactccaagg      1020
aggcagaaga agttgttctg caggatcac gatggaaaca ggaacccaaa gttcattctt      1080
gctccagcta agcaagaaga tgagtgggat aagccaagga ttattagggt ccacgatatt      1140
atttctgatg ctgagattga gattgtgaag gatcttgcta agccaagact taggagggtc      1200
actatttcta acctattac tggatgctt gagactgtgc actacaggat ttctaagtct      1260
gcttggcttt ctggatacga gaaccagtg gtgtctagga ttaacatgag gattcaggat      1320
cttactggac ttgatgtgtc tactgctgag gagcttcaag ttgctaacta cggagttgga      1380
ggacaatatg agccacactt cgatttcgct aggaaggatg agccagatgc ttttaaggag      1440
cttggaactg gaaacaggat tgctacttgg ctttctaca tgtctgatgt ttctgctgga      1500
ggagctactg tttcccaga agtgggagct tctgtttggc caaagaaggg aactgctgtg      1560
ttctggtaca accttttgc ttctggagag ggagattact ctactaggca tgctgcttgc      1620
ccagttcttg ttggaaacaa gtgggtgtca aacaagtggc ttcagagag gggacaagag      1680
tttagaaggc catgcactct ttctgagctt gagtgatgag etc      1723

```

<210> 7

<211> 1489

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una proteína recombinante que consiste en la señal transitoria vacuolar fusionada al colágeno alfa 1 (I) humano

<400> 7

ES 2 565 185 T3

Met	Ala	His	Ala	Arg	Val	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Ala	Thr
1				5					10				15		
Ala	Ala	Val	Ala	Val	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Phe	Ala	Asp	Ser	Asn	Pro
			20					25					30		
Ile	Arg	Pro	Val	Thr	Asp	Arg	Ala	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	Gln	Leu	Gln
		35					40					45			
Glu	Glu	Gly	Gln	Val	Glu	Gly	Gln	Asp	Glu	Asp	Ile	Pro	Pro	Ile	Thr
50						55					60				

ES 2 565 185 T3

Cys Val Gln Asn Gly Leu Arg Tyr His Asp Arg Asp Val Trp Lys Pro
 65 70 75 80
 Glu Pro Cys Arg Ile Cys Val Cys Asp Asn Gly Lys Val Leu Cys Asp
 85 90 95
 Asp Val Ile Cys Asp Glu Thr Lys Asn Cys Pro Gly Ala Glu Val Pro
 100 105 110
 Glu Gly Glu Cys Cys Pro Val Cys Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Thr
 115 120 125
 Asp Gln Glu Thr Thr Gly Val Glu Gly Pro Lys Gly Asp Thr Gly Pro
 130 135 140
 Arg Gly Pro Arg Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Arg Asp Gly Ile Pro
 145 150 155 160
 Gly Gln Pro Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly
 165 170 175
 Pro Pro Gly Leu Gly Gly Asn Phe Ala Pro Gln Leu Ser Tyr Gly Tyr
 180 185 190
 Asp Glu Lys Ser Thr Gly Gly Ile Ser Val Pro Gly Pro Met Gly Pro
 195 200 205
 Ser Gly Pro Arg Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Ala Pro Gly Pro Gln
 210 215 220
 Gly Phe Gln Gly Pro Pro Gly Glu Pro Gly Glu Pro Gly Ala Ser Gly
 225 230 235 240
 Pro Met Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Lys Asn Gly Asp
 245 250 255
 Asp Gly Glu Ala Gly Lys Pro Gly Arg Pro Gly Glu Arg Gly Pro Pro
 260 265 270
 Gly Pro Gln Gly Ala Arg Gly Leu Pro Gly Thr Ala Gly Leu Pro Gly
 275 280 285
 Met Lys Gly His Arg Gly Phe Ser Gly Leu Asp Gly Ala Lys Gly Asp
 290 295 300
 Ala Gly Pro Ala Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly Ser Pro Gly Glu Asn
 305 310 315 320
 Gly Ala Pro Gly Gln Met Gly Pro Arg Gly Leu Pro Gly Glu Arg Gly
 325 330 335
 Arg Pro Gly Ala Pro Gly Pro Ala Gly Ala Arg Gly Asn Asp Gly Ala
 340 345 350

Thr Gly Ala Ala Gly Pro Pro Gly Pro Thr Gly Pro Ala Gly Pro Pro
355 360 365

Gly Phe Pro Gly Ala Val Gly Ala Lys Gly Glu Ala Gly Pro Gln Gly
370 375 380

Pro Arg Gly Ser Glu Gly Pro Gln Gly Val Arg Gly Glu Pro Gly Pro
385 390 395 400

Pro Gly Pro Ala Gly Ala Ala Gly Pro Ala Gly Asn Pro Gly Ala Asp
405 410 415

Gly Gln Pro Gly Ala Lys Gly Ala Asn Gly Ala Pro Gly Ile Ala Gly
420 425 430

Ala Pro Gly Phe Pro Gly Ala Arg Gly Pro Ser Gly Pro Gln Gly Pro
435 440 445

Gly Gly Pro Pro Gly Pro Lys Gly Asn Ser Gly Glu Pro Gly Ala Pro
450 455 460

Gly Ser Lys Gly Asp Thr Gly Ala Lys Gly Glu Pro Gly Pro Val Gly
465 470 475 480

Val Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Glu Glu Gly Lys Arg Gly Ala
485 490 495

Arg Gly Glu Pro Gly Pro Thr Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Glu Arg
500 505 510

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

Pro Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ser Pro Gly Pro Ala Gly Pro
530 535 540

Lys Gly Ser Pro Gly Glu Ala Gly Arg Pro Gly Glu Ala Gly Leu Pro
545 550 555 560

Gly Ala Lys Gly Leu Thr Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Pro Asp Gly
565 570 575

Lys Thr Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Gln Asp Gly Arg Pro Gly Pro
580 585 590

Pro Gly Pro Pro Gly Ala Arg Gly Gln Ala Gly Val Met Gly Phe Pro
595 600 605

Gly Pro Lys Gly Ala Ala Gly Glu Pro Gly Lys Ala Gly Glu Arg Gly
610 615 620

Val Pro Gly Pro Pro Gly Ala Val Gly Pro Ala Gly Lys Asp Gly Glu
625 630 635 640

Ala Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly Glu Arg
645 650 655

Gly Glu Gln Gly Pro Ala Gly Ser Pro Gly Phe Gln Gly Leu Pro Gly
660 665 670

Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Lys Pro Gly Glu Gln Gly Val
675 680 685

Pro Gly Asp Leu Gly Ala Pro Gly Pro Ser Gly Ala Arg Gly Glu Arg
690 695 700

Gly Phe Pro Gly Glu Arg Gly Val Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly
705 710 715 720

Pro Arg Gly Ala Asn Gly Ala Pro Gly Asn Asp Gly Ala Lys Gly Asp
725 730 735

Ala Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ser Gln Gly Ala Pro Gly Leu Gln
740 745 750

Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly
755 760 765

Asp Arg Gly Asp Ala Gly Pro Lys Gly Ala Asp Gly Ser Pro Gly Lys
770 775 780

Asp Gly Val Arg Gly Leu Thr Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Ala
785 790 795 800

Gly Ala Pro Gly Asp Lys Gly Glu Ser Gly Pro Ser Gly Pro Ala Gly
805 810 815

Pro Thr Gly Ala Arg Gly Ala Pro Gly Asp Arg Gly Glu Pro Gly Pro
820 825 830

Pro Gly Pro Ala Gly Phe Ala Gly Pro Pro Gly Ala Asp Gly Gln Pro
835 840 845

Gly Ala Lys Gly Glu Pro Gly Asp Ala Gly Ala Lys Gly Asp Ala Gly
850 855 860

Pro Pro Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Pro Ile Gly Asn
865 870 875 880

Val Gly Ala Pro Gly Ala Lys Gly Ala Arg Gly Ser Ala Gly Pro Pro
885 890 895

Gly Ala Thr Gly Phe Pro Gly Ala Ala Gly Arg Val Gly Pro Pro Gly
900 905 910

Pro Ser Gly Asn Ala Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Lys
915 920 925

Glu Gly Gly Lys Gly Pro Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly Arg Pro
930 935 940

Gly Glu Val Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Glu Lys Gly
945 950 955 960

Ser Pro Gly Ala Asp Gly Pro Ala Gly Ala Pro Gly Thr Pro Gly Pro
965 970 975

Gln Gly Ile Ala Gly Gln Arg Gly Val Val Gly Leu Pro Gly Gln Arg
980 985 990

Gly Glu Arg Gly Phe Pro Gly Leu Pro Gly Pro Ser Gly Glu Pro Gly
995 1000 1005

Lys Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ser Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly
1010 1015 1020

Pro Met Gly Pro Pro Gly Leu Ala Gly Pro Pro Gly Glu Ser Gly
1025 1030 1035

Arg Glu Gly Ala Pro Gly Ala Glu Gly Ser Pro Gly Arg Asp Gly
1040 1045 1050

Ser Pro Gly Ala Lys Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly
1055 1060 1065

Pro Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Val Gly
1070 1075 1080

Pro Ala Gly Lys Ser Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly
1085 1090 1095

Pro Ala Gly Pro Val Gly Pro Ala Gly Ala Arg Gly Pro Ala Gly
1100 1105 1110

Pro Gln Gly Pro Arg Gly Asp Lys Gly Glu Thr Gly Glu Gln Gly
1115 1120 1125

Asp Arg Gly Ile Lys Gly His Arg Gly Phe Ser Gly Leu Gln Gly
1130 1135 1140

Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ser Pro Gly Glu Gln Gly Pro Ser Gly
1145 1150 1155

Ala Ser Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Ser Ala Gly
1160 1165 1170

Ala Pro Gly Lys Asp Gly Leu Asn Gly Leu Pro Gly Pro Ile Gly
1175 1180 1185

Pro Pro Gly Pro Arg Gly Arg Thr Gly Asp Ala Gly Pro Val Gly
1190 1195 1200

Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Ser
1205 1210 1215

Ala Gly Phe Asp Phe Ser Phe Leu Pro Gln Pro Pro Gln Glu Lys
1220 1225 1230

Ala His	Asp Gly Gly Arg Tyr	Tyr Arg Ala Asp Asp	Ala Asn Val
1235	1240	1245	
Val Arg	Asp Arg Asp Leu Glu	Val Asp Thr Thr Leu	Lys Ser Leu
1250	1255	1260	
Ser Gln	Gln Ile Glu Asn Ile	Arg Ser Pro Glu Gly	Ser Arg Lys
1265	1270	1275	
Asn Pro	Ala Arg Thr Cys Arg	Asp Leu Lys Met Cys	His Ser Asp
1280	1285	1290	
Trp Lys	Ser Gly Glu Tyr Trp	Ile Asp Pro Asn Gln	Gly Cys Asn
1295	1300	1305	
Leu Asp	Ala Ile Lys Val Phe	Cys Asn Met Glu Thr	Gly Glu Thr
1310	1315	1320	
Cys Val	Tyr Pro Thr Gln Pro	Ser Val Ala Gln Lys	Asn Trp Tyr
1325	1330	1335	
Ile Ser	Lys Asn Pro Lys Asp	Lys Arg His Val Trp	Phe Gly Glu
1340	1345	1350	
Ser Met	Thr Asp Gly Phe Gln	Phe Glu Tyr Gly Gly	Gln Gly Ser
1355	1360	1365	
Asp Pro	Ala Asp Val Ala Ile	Gln Leu Thr Phe Leu	Arg Leu Met
1370	1375	1380	
Ser Thr	Glu Ala Ser Gln Asn	Ile Thr Tyr His Cys	Lys Asn Ser
1385	1390	1395	
Val Ala	Tyr Met Asp Gln Gln	Thr Gly Asn Leu Lys	Lys Ala Leu
1400	1405	1410	
Leu Leu	Lys Gly Ser Asn Glu	Ile Glu Ile Arg Ala	Glu Gly Asn
1415	1420	1425	
Ser Arg	Phe Thr Tyr Ser Val	Thr Val Asp Gly Cys	Thr Ser His
1430	1435	1440	
Thr Gly	Ala Trp Gly Lys Thr	Val Ile Glu Tyr Lys	Thr Thr Lys
1445	1450	1455	
Thr Ser	Arg Leu Pro Ile Ile	Asp Val Ala Pro Leu	Asp Val Gly
1460	1465	1470	
Ala Pro	Asp Gln Glu Phe Gly	Phe Asp Val Gly Pro	Val Cys Phe
1475	1480	1485	

Leu

<210> 8
 <211> 1389
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una proteína recombinante que consiste en la señal transitoria vacuolar fusionada al colágeno alfa 2 (I) humano

5

<400> 8

```

Met Ala His Ala Arg Val Leu Leu Leu Ala Leu Ala Val Leu Ala Thr
 1              5              10              15

Ala Ala Val Ala Val Ala Ser Ser Ser Ser Phe Ala Asp Ser Asn Pro
                20              25              30

Ile Arg Pro Val Thr Asp Arg Ala Ala Ser Thr Leu Ala Gln Leu Leu
    35              40              45

Gln Glu Glu Thr Val Arg Lys Gly Pro Ala Gly Asp Arg Gly Pro Arg
 50              55              60

Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Arg Asp Gly Glu Asp Gly
 65              70              75              80

Pro Thr Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Leu
                85              90              95

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

Pro Gly Pro Met Gly Leu Met Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Ala Ala
    115              120              125

Gly Ala Pro Gly Pro Gln Gly Phe Gln Gly Pro Ala Gly Glu Pro Gly
    130              135              140

Glu Pro Gly Gln Thr Gly Pro Ala Gly Ala Arg Gly Pro Ala Gly Pro
    145              150              155              160

Pro Gly Lys Ala Gly Glu Asp Gly His Pro Gly Lys Pro Gly Arg Pro
                165              170              175

Gly Glu Arg Gly Val Val Gly Pro Gln Gly Ala Arg Gly Phe Pro Gly
    180              185              190

Thr Pro Gly Leu Pro Gly Phe Lys Gly Ile Arg Gly His Asn Gly Leu
    195              200              205

Asp Gly Leu Lys Gly Gln Pro Gly Ala Pro Gly Val Lys Gly Glu Pro
    210              215              220

Gly Ala Pro Gly Glu Asn Gly Thr Pro Gly Gln Thr Gly Ala Arg Gly
    225              230              235              240

Leu Pro Gly Glu Arg Gly Arg Val Gly Ala Pro Gly Pro Ala Gly Ala
    245              250              255

```

Arg Gly Ser Asp Gly Ser Val Gly Pro Val Gly Pro Ala Gly Pro Ile
 260 265 270
 Gly Ser Ala Gly Pro Pro Gly Phe Pro Gly Ala Pro Gly Pro Lys Gly
 275 280 285
 Glu Ile Gly Ala Val Gly Asn Ala Gly Pro Thr Gly Pro Ala Gly Pro
 290 295 300
 Arg Gly Glu Val Gly Leu Pro Gly Leu Ser Gly Pro Val Gly Pro Pro
 305 310 315 320
 Gly Asn Pro Gly Ala Asn Gly Leu Thr Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly
 325 330 335
 Leu Pro Gly Val Ala Gly Ala Pro Gly Leu Pro Gly Pro Arg Gly Ile
 340 345 350
 Pro Gly Pro Val Gly Ala Ala Gly Ala Thr Gly Ala Arg Gly Leu Val
 355 360 365
 Gly Glu Pro Gly Pro Ala Gly Ser Lys Gly Glu Ser Gly Asn Lys Gly
 370 375 380
 Glu Pro Gly Ser Ala Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Glu
 385 390 395 400
 Glu Gly Lys Arg Gly Pro Asn Gly Glu Ala Gly Ser Ala Gly Pro Pro
 405 410 415
 Gly Pro Pro Gly Leu Arg Gly Ser Pro Gly Ser Arg Gly Leu Pro Gly
 420 425 430
 Ala Asp Gly Arg Ala Gly Val Met Gly Pro Pro Gly Ser Arg Gly Ala
 435 440 445
 Ser Gly Pro Ala Gly Val Arg Gly Pro Asn Gly Asp Ala Gly Arg Pro
 450 455 460
 Gly Glu Pro Gly Leu Met Gly Pro Arg Gly Leu Pro Gly Ser Pro Gly
 465 470 475 480
 Asn Ile Gly Pro Ala Gly Lys Glu Gly Pro Val Gly Leu Pro Gly Ile
 485 490 495
 Asp Gly Arg Pro Gly Pro Ile Gly Pro Ala Gly Ala Arg Gly Glu Pro
 500 505 510
 Gly Asn Ile Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Pro Thr Gly Asp Pro Gly
 515 520 525
 Lys Asn Gly Asp Lys Gly His Ala Gly Leu Ala Gly Ala Arg Gly Ala
 530 535 540
 Pro Gly Pro Asp Gly Asn Asn Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Pro Gln

545		550		555		560
Gly Val Gln Gly Gly Lys Gly Glu Gln Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly	565		570		575	
Phe Gln Gly Leu Pro Gly Pro Ser Gly Pro Ala Gly Glu Val Gly Lys	580		585		590	
Pro Gly Glu Arg Gly Leu His Gly Glu Phe Gly Leu Pro Gly Pro Ala	595		600		605	
Gly Pro Arg Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly Glu Ser Gly Ala Ala Gly	610		615		620	
Pro Thr Gly Pro Ile Gly Ser Arg Gly Pro Ser Gly Pro Pro Gly Pro	625		630		635	640
Asp Gly Asn Lys Gly Glu Pro Gly Val Val Gly Ala Val Gly Thr Ala	645		650		655	
Gly Pro Ser Gly Pro Ser Gly Leu Pro Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly	660		665		670	
Ile Pro Gly Gly Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Leu Arg Gly Glu	675		680		685	
Ile Gly Asn Pro Gly Arg Asp Gly Ala Arg Gly Ala His Gly Ala Val	690		695		700	
Gly Ala Pro Gly Pro Ala Gly Ala Thr Gly Asp Arg Gly Glu Ala Gly	705		710		715	720
Ala Ala Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Ser Pro Gly Glu	725		730		735	
Arg Gly Glu Val Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Phe Ala Gly Pro Ala	740		745		750	
Gly Ala Ala Gly Gln Pro Gly Ala Lys Gly Glu Arg Gly Gly Lys Gly	755		760		765	
Pro Lys Gly Glu Asn Gly Val Val Gly Pro Thr Gly Pro Val Gly Ala	770		775		780	
Ala Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ser Arg	785		790		795	800
Gly Asp Gly Gly Pro Pro Gly Met Thr Gly Phe Pro Gly Ala Ala Gly	805		810		815	
Arg Thr Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Ile Ser Gly Pro Pro Gly Pro	820		825		830	
Pro Gly Pro Ala Gly Lys Glu Gly Leu Arg Gly Pro Arg Gly Asp Gln	835		840		845	

Gly Pro Val Gly Arg Thr Gly Glu Val Gly Ala Val Gly Pro Pro Gly
850 855 860

Phe Ala Gly Glu Lys Gly Pro Ser Gly Glu Ala Gly Thr Ala Gly Pro
865 870 875 880

Pro Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly Leu Leu Gly Ala Pro Gly Ile Leu
885 890 895

Gly Leu Pro Gly Ser Arg Gly Glu Arg Gly Leu Pro Gly Val Ala Gly
900 905 910

Ala Val Gly Glu Pro Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Pro Pro Gly Ala
915 920 925

Arg Gly Pro Pro Gly Ala Val Gly Ser Pro Gly Val Asn Gly Ala Pro
930 935 940

Gly Glu Ala Gly Arg Asp Gly Asn Pro Gly Asn Asp Gly Pro Pro Gly
945 950 955 960

Arg Asp Gly Gln Pro Gly His Lys Gly Glu Arg Gly Tyr Pro Gly Asn
965 970 975

Ile Gly Pro Val Gly Ala Ala Gly Ala Pro Gly Pro His Gly Pro Val
980 985 990

Gly Pro Ala Gly Lys His Gly Asn Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ser Gly
995 1000 1005

Pro Val Gly Pro Ala Gly Ala Val Gly Pro Arg Gly Pro Ser Gly
1010 1015 1020

Pro Gln Gly Ile Arg Gly Asp Lys Gly Glu Pro Gly Glu Lys Gly
1025 1030 1035

Pro Arg Gly Leu Pro Gly Phe Lys Gly His Asn Gly Leu Gln Gly
1040 1045 1050

Leu Pro Gly Ile Ala Gly His His Gly Asp Gln Gly Ala Pro Gly
1055 1060 1065

Ser Val Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Pro Ala Gly Pro Ser Gly
1070 1075 1080

Pro Ala Gly Lys Asp Gly Arg Thr Gly His Pro Gly Thr Val Gly
1085 1090 1095

Pro Ala Gly Ile Arg Gly Pro Gln Gly His Gln Gly Pro Ala Gly
1100 1105 1110

Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Val Ser Gly
1115 1120 1125

Gly Gly Tyr Asp Phe Gly Tyr Asp Gly Asp Phe Tyr Arg Ala Asp

1130	1135	1140
Gln Pro Arg Ser Ala Pro Ser 1145	Leu Arg Pro Lys Asp 1150	Tyr Glu Val 1155
Asp Ala Thr Leu Lys Ser Leu 1160	Asn Asn Gln Ile Glu 1165	Thr Leu Leu 1170
Thr Pro Glu Gly Ser Arg Lys 1175	Asn Pro Ala Arg Thr 1180	Cys Arg Asp 1185
Leu Arg Leu Ser His Pro Glu 1190	Trp Ser Ser Gly Tyr 1195	Tyr Trp Ile 1200
Asp Pro Asn Gln Gly Cys Thr 1205	Met Glu Ala Ile Lys 1210	Val Tyr Cys 1215
Asp Phe Pro Thr Gly Glu Thr 1220	Cys Ile Arg Ala Gln 1225	Pro Glu Asn 1230
Ile Pro Ala Lys Asn Trp Tyr 1235	Arg Ser Ser Lys Asp 1240	Lys Lys His 1245
Val Trp Leu Gly Glu Thr Ile 1250	Asn Ala Gly Ser Gln 1255	Phe Glu Tyr 1260
Asn Val Glu Gly Val Thr Ser 1265	Lys Glu Met Ala Thr 1270	Gln Leu Ala 1275
Phe Met Arg Leu Leu Ala Asn 1280	Tyr Ala Ser Gln Asn 1285	Ile Thr Tyr 1290
His Cys Lys Asn Ser Ile Ala 1295	Tyr Met Asp Glu Glu 1300	Thr Gly Asn 1305
Leu Lys Lys Ala Val Ile Leu 1310	Gln Gly Ser Asn Asp 1315	Val Glu Leu 1320
Val Ala Glu Gly Asn Ser Arg 1325	Phe Thr Tyr Thr Val 1330	Leu Val Asp 1335
Gly Cys Ser Lys Lys Thr Asn 1340	Glu Trp Gly Lys Thr 1345	Ile Ile Glu 1350
Tyr Lys Thr Asn Lys Pro Ser 1355	Arg Leu Pro Phe Leu 1360	Asp Ile Ala 1365
Pro Leu Asp Ile Gly Gly Ala 1370	Asp His Glu Phe Phe 1375	Val Asp Ile 1380
Gly Pro Val Cys Phe Lys 1385		

<210> 9

<211> 2888

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> La secuencia sintética contiene las regiones codificantes de la secuencia señal vascular del gen de la cebada para el precursor de la tiol proteasa aleuraina fusionado a la 3-hidroxilasa de lisilo y regiones flanqueantes

5

<400> 9

```

gcgaattcgc tagctatcac tgaaaagaca gcaagacaat ggtgtctcga tgcaccagaa      60
ccacatcttt gcagcagatg tgaagcagcc agagtgttcc acaagacgca ctcagaaaag      120
gcatcttcta ccgacacaga aaaagacaac cacagctcat catccaacat gtagactgtc      180
gttatgcgtc ggctgaagat aagactgacc ccaggccagc actaaagaag aaataatgca      240
agtggctccta gctccacttt agctttaata attatgttcc attattattc tctgcttttg      300
ctctctatat aaagagcttg tattttcatt tgaaggcaga ggcgaacaca cacacagaac      360
ctccctgctt acaaaccaga tcttaaacca tggtctcacgc taggggtttg cttcttgctc      420
ttgctgttct tgctactgct gctgttgctg tggcttcttc aagtcttttc gctgattcta      480
acccaattag gccagtgact gatagagctg cttctactct tgctcaattg agatctatgt      540
ctgatagacc aaggggaagg gatccagtta atccagagaa gttgcttggtg attactgtgg      600
ctactgctga gactgaagga taccttagat tccttaggag tgctgagttc ttcaactaca      660
ctgtgaggac tcttgactt ggagaagaat ggaggggagg agatgttgct agaactgttg      720
gaggaggaca gaaagtgaga tggcttaaga aagagatgga gaagtacgct gatagggagg      780
atatgattat tatgttcgtg gattcttacg atgtgattct tgctggatct ccaactgagc      840
ttttgaagaa attcgttcag tctggatcta ggcttctttt ctctgctgag tctttttgtt      900
ggccagaatg gggacttgcg gagcaatata cagaagtggg aactggaaag agattcctta      960
actctggagg attcattgga ttcgctacta ctattcacca gattgtgagg cagtggaaagt     1020
acaaggatga cgatgatgat cagcttttct aactaggct ttaccttgat ccaggactta     1080
gggagaagtt gtctcttaac cttgatcaca agtctaggat tttccagaac cttaacgggtg     1140
ctcttgatga ggttggtgctt aagttcgata ggaacagagt gaggattagg aacgtggctt     1200
acgatactct tcctattgtg gtgcattgaa acggaccaac aaaactccag ctttaactacc     1260
ttggaaacta cgttccaaac ggatggactc cagaaggagg atgtggattc tgcaatcagg     1320
ataggagaac tcttccagga ggacaaccac caccaagagt tttccttgct gtgttcggtg     1380
aacagccaac tccattcctt ccaagattcc ttcagaggct tcttcttttg gattaccac      1440
cagatagggt gacacttttc cttcacaaca acgagggttt ccacgagcca cacattgctg     1500
attcttggtc acagcttcag gatcatttct ctgctgtgaa gttggttggt ccagaagaag     1560
ctctttctcc aggagaagct agggatatgg ctatggattt gtgcaggcag gatccagagt     1620
gcgagttcta cttctctctt gatgctgatg ctgtgcttac taaccttcag actcttagga     1680
ttcttattga ggagaacagg aaagtgattg ctccaatgct ttctaggcac ggaaagtgtg     1740
ggcttaattt ctgggtgctt cttctctctg atgagtacta cgctagatca gaggactacg     1800
tgagcttgtt tcagagaaag agagtgggag tttggaacgt tccttatatt tctcaggctt     1860
acgtgattag gggagatact cttaggatgg agcttcacac gagggatgtt ttctctggat     1920
ctgatactga tccagatatg gctttctgca agtctttcag ggataaggga attttccttc     1980

```

```

acctttctaa ccagcatgag ttcggaagat tgcttgctac ttcaagatac gatactgagc 2040
accttcaccc tgatctttgg cagattttcg ataaccagc ggattggaag gagcagtaca 2100
ttcacgagaa ctactctagg gctcttgaag gagaaggaat tgtggagcaa ccatgccag 2160
atgtttactg gttccactt cttcttgagc aaatgtgcga tgagcttggt gctgagatgg 2220
agcattacgg acaatggagt ggaggtagac atgaggattc taggcttgct ggaggatacg 2280
agaacgttcc aactgtgat attcacatga agcaagtggg atacgaggat caatggcttc 2340
agcttcttag gacttatgtg ggaccaatga ctgagtctct tttcccagga taccacacta 2400
aggetagggc tgttatgaac ttcgttgtga ggtatcgctc agatgagcaa ccatctctta 2460
ggccacacca cgattcttct actttcactc ttaacgtggc tcttaaccac aagggaactg 2520
attatgaggg aggaggatgc cgtttcctta gatacgattg cgtgatttct tcaccaagaa 2580
agggatgggc tcttcttcat ccaggaaggc ttactcatta ccacgagggg cttccaacta 2640
cttgggggaa tagatatatt atggtgtctt tctgtgatcc atgactgctt taatgagata 2700
tgcgagacgc ctatgatcgc atgatatttg cttcaattc tgttgtgcac gttgtaaaaa 2760
acctgagcat gtgtagctca gacottacc gccggtttcg gttcattcta atgaatatat 2820
cacccgttac tatcgtattt ttatgaataa tattctccgt tcaatttact gattgtccag 2880
aatcgcg 2888

```

<210> 10
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> *Pisum sativum*

5

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Péptido señal que se dirige al cloroplasto de la subunidad pequeña de RuBisCO (Ribulosa 1,5
 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa)

10

<400> 10

```

Met Ala Ser Met Ile Ser Ser Ser Ala Val Thr Thr Val Ser Arg Ala
1           5           10           15

Ser Thr Val Gln Ser Ala Ala Val Ala Pro Phe Gly Gly Leu Lys Ser
          20           25           30

Met Thr Gly Phe Pro Val Lys Lys Val Asn Thr Asp Ile Thr Ser Ile
          35           40           45

Thr Ser Asn Gly Gly Arg Val Lys Cys
          50           55

```

<210> 11
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*

15

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Péptido señal que se dirige a la transaminasa A de la mitocondria

20

<400> 11

Met Ala Leu Ala Met Met Ile Arg Asn Ala Ala Ser Lys Arg Gly Met
1 5 10 15

Thr Pro Ile Ser Gly His Phe Gly Gly Leu Arg Ser
20 25

<210> 12

<211> 4467

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> La secuencia sintética contiene las regiones codificantes de la secuencia señal vascular del gen de la cebada para el precursor de la tiol proteasa aleuraina fusionado a colágeno alfa 1 humano

<400> 12

```

atggtctcag ctcgtgttct cctcctcgt ctcgtgttt tggcaacagc tgctgtggct      60
gtggcttcta gttcttcttt tctgtattca aacctatta gacctgttac tgatagagca      120
gcttccactt tggctcaatt gcaagaggag ggccagggtg agggccaaga tgaggatatt      180
cctccaatta catgctgca aaatggcttg cgttaccacg atagggatgt gtggaaacct      240
gaaccttgtc gtatctgtgt gtgtgataac ggcaagggtc tctgcgatga tgttatctgc      300
gatgagacaa aaaattgccc tggcgtgaa gttcctgagg gcgagtgttg ccctgtgtgc      360
cctgatgggt ccgagtcccc aactgatcag gaaactactg gcgtggaggg cccaaaagga      420
gatactggtc cactgtgtcc taggggtcca gcaggctcct caggtagaga tggatttcca      480
ggccagcctg gattgccagg accaccaggc ccacctggcc caccaggacc tcctgttctt      540
ggtggaaatt tcgtccaca actctcttat ggctatgatg agaagtcaac aggtggtatt      600
tcogttccag gtctatggg accatccgga ccaagaggtc tcccaggtec tccagggtgt      660
cctggacctc aaggctttca aggacctcca ggcaaccag gagaaccagg cgcttctgga      720
ccaatgggcc caaggggacc acctggccca ccaggaaaa atggcgatga tggcgagct      780
ggaaagcctg gtcgtcctgg agagagaggt cctcctggcc cacagggtgc aagaggcttg      840
ccaggaaact ctagcttgc tggaaatgaag ggacataggg gcttctccgg cctcgatggc      900
gctaagggtg atgctggccc tctgtggacca aaggcgagc caggttcccc tggagaaaac      960
ggtgctcctg gacaaatggg tcctcgtgga cttccaggag aaaggggtcg tccaggcgct      1020
ccaggaccag cagggtgctag gggaaacgat ggtgcaacag gcgctgctgg cctcctggc      1080
ccaactggtc ctgctggccc tccaggattc ccaggcgag ttggagctaa aggagaagca      1140
ggaccacagg gccctagggg ttctgaagga cctcagggtg ttagaggtga accaggtcct      1200
ccaggccccag ctggagcagc tggtcacgca ggaatccag gtgctgatgg tcaacctgga      1260
gctaagggtg ctaatggcgc accaggatc gcaggcgac caggttttcc tggcgctaga      1320
ggcccaagtg gtcctcaagg accagggtga ccaccaggtc caaaggcaa ttctggcgaa      1380
cctggcgctc caggttctaa aggagatact ggtgctaaag gcgaaccagg acctgttggg      1440
gttcagggtc ctctgtgtcc tgggtggaga gaaggaaaa gaggtgctcg tggagaacca      1500
ggaccaactg gacttcctgg acctcctggg gaacgtggcg gacctggctc aagggttttc      1560
cctggagctg atggagtggc aggtccaaaa ggccctgctg gagagagagg ttcaccagg      1620
ccagctggtc ctaagggtc cctgggtgaa gcaggtagac caggcgaagc aggtattgcca      1680

```

ggcgcaaagg gattgacagg ctctcctggt agtcctggcc cagatggaaa aacaggccca	1740
ccagggtccag caggacaaga tggacgtcca ggcccaccag gtctcctggt agcaagggga	1800
caagctggcg ttatgggttt tccaggacct aaaggtgctg ctggagagcc aggaaaggca	1860
ggtgaaagag gagttcctgg tccaccagga gcagtgggtc ctgctggcaa agatggtgaa	1920
gctggagcac agggccctcc aggccctgct ggcccagctg gcgaacgtgg agaacaaggc	1980
ccagctggtg gtccaggatt tcaaggattg cctggccctg ctggccctcc aggagaagca	2040
ggaaaacctg gagaacaagg agttcctggt gatttgggag cacctggacc ttcaggagca	2100
cgtggtgaaa gaggtctccc tggcgagagg ggtgttcaag gtccaccagg tccagcagga	2160
cctagagggtg ctaatggcgc tcttggaac gatggagcaa aaggtgatgc tgggtctcct	2220
ggcgacctg gaagttaggg tgctcctgga ttgcaaggaa tgctggaga gagggtgct	2280
gctggcttgc caggcccaaa ggcgatagg ggtgatgctg gaccaaaagg tgctgatgga	2340
tcccaggaa aagatggagt tcgtggtctt actggcccaa tcggacctcc aggccctgct	2400
ggcgctccag gtgataaggg cgaagtggtc ccaagtggac ctgctggacc tactggtgct	2460
agaggtgcac ctggtgatag ggtgaacct ggaccacctg gtccagctgg ttttctggt	2520
cctcctggag ctgatggaca acctggcgca aaggtgaac caggtgatgc tggcgcaaag	2580
ggagatgctg gtccacctgg acctgctggt ccagcaggcc cccctgggco aatcggtaat	2640
gttgagcac cagggtgctaa gggagctagg ggttccgctg gtccacctgg agcaacagga	2700
ttccaggcg ctgctggtag agttggccca ccaggcccat ccggaacgc aggccctcct	2760
ggtcctccag gtctgctggt caaggagggt ggcaaggac caaggggcga aactggccct	2820
gctggtagac ctggcgaagt tggccctcct ggaccaccag gtccagcagg agaaaaaggt	2880
tcccaggag ctgatggccc agctggtgct ccaggaaactc caggccctca aggtattgct	2940
ggacagagag gcgttgtggg actccctggt caaaggggag agagaggatt tccaggcttg	3000
ccaggacctg gtggagaacc tggaaaacaa ggcccatcag gcgctagtgg agagcgtgga	3060
cctcctggcc ctatgggacc tcttggttgg gctggccca ctggcgaatc aggtcgtgaa	3120
ggcgccaccag gcgcagaag atcacctgga agagatggat cccctggtgc taaaggcgat	3180
cgtggagaaa ctggtccagc agggccacca ggcgccaccag gtgcacctgg cgctccagga	3240
cctgtgggac cagctggaaa atccggagat agggcgagga caggccaccg aggaccagct	3300
ggacctgttg gccctgctgg cgctcgtgga ccagcaggac ctcaaggacc aaggggagat	3360
aagggagaaa caggcgaaca aggcgatagg ggcattaagg gtcatagggg ttttagtggc	3420
ctccagggtc ctctggccc acctggatca ccaggagaac agggaccatc tgggtgcttc	3480
ggcccagctg gtccaagagg acctccagga tcagctggtg cacctggaaa agatggtctt	3540
aacggtctcc caggaccaat cggccctcca ggacctagag gaagaacagg agatgctggc	3600
cctgttggtc ctccaggacc tcttggtcca ccaggtccac ctggtcctcc atcagctgga	3660
ttcgattttt catttcttcc acagccacca caagagaaaag ctacagatgg cggcagatat	3720
taccgtgctg atgatgctaa cgttggttagg gatagagatt tggaagtgga tacaactttg	3780
aaatccctct cccagcaaat tgaataacatt agatctccag aaggttcacg taaaaacca	3840
gctagaacat gtcgtgattt gaaaatgtgt cactccgatt ggaaaagtgg tgaatactgg	3900

```

attgatccaa atcagggctg taatctcgat gctatcaaaag ttttctgtaa catggaacaa 3960
ggcgaaacat gcgtttatcc tactcaacct tccgtggctc agaaaaattg gtacatctca 4020
aaaaatccta aagataagag gcacgtttg ttcggtgaaa gtatgactga tggatttcaa 4080
tttgagtacg gcggtcaagg tagtgatcca gctgatgtgg ctattcaact cacatttttg 4140
cgtcttatgt ccacagaggc atcacaaaac atcacttacc actgcaaaaa cagtgtggct 4200
tatatggatc aacaaacagg aaaccttaag aaggctcttc ttttgaaggg ctcaaacgag 4260
attgagatta gagcagaggg caactcaagg tttacttatt cagttactgt tgatggctgc 4320
acttcacata ctggcgcttg gggtaaaaca gttatcgagt ataagactac aaaaacatca 4380
agactcccaa tcattgatgt tgctcctctc gatgttggcg ctctgatca agagttcggc 4440
tttgatgtgg gccagtttg tttcctc 4467

```

<210> 13

<211> 3627

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> La secuencia sintética contiene las regiones codificantes de la secuencia señal vascular del gen de la cebada para el precursor de la tiol proteasa aleuraina fusionado al colágeno alfa 2 humano

<400> 13

```

atggctcacg ctggtgttct cctcctcgct ctgctgtttt tggcaacagc tgctgtggct 60
gtggcttcaa gttctagttt tgctgattcc aacccaattc gtccagttac tgatagagca 120
gcttccactt tggtcaatt gctcaagaa gaaactgtga ggaagggcc tgctggcgat 180
aggggcccta ggggcgaaag ggggccacca ggacctccag gcagggatgg cgaagatggt 240
ccaaactggc ctctggacc tcctggccct ccagggccac ccggcttggg cggaaacttc 300
gcagctcaat acgatggcaa ggggtgttgt cttggctctg gtctatggg cttgatggga 360
cttagaggcc cacctggtgc tgctggtgct cctggaccac agggttttca gggaccagct 420
ggcgagccag gagagccagg ccaaacagga ccagctggtg caaggggacc tgctggacct 480
cctggaaaag ctggtgaaga tggtaacca ggcaaacag gacgtcctgg cgaaagaggt 540
gttggtggac cacaaggcgc taggggattt ccagggtacac ctggattgcc aggttttaag 600
ggcattcgtg gtcataacgg cctcgatgga ttgaaggagc agctgggcgc acctggcggt 660
aagggtgaac ctggagcacc aggtgaaaac ggtactcctg gccagactgg tgcaagagga 720
ctcccaggtg aaagggttag agttggtgct cctggacctg ctggagctag gggtagtgat 780
ggtagtggtg gtcctgtggg ccctgctggt ccaatcggtt ccgctggccc acctggattc 840
ccaggcgctc caggacctaa aggagaaatc ggtgctgtgg gtaacgcagg tctactggt 900
ccagcaggtc ctctggaga agtgggattg ccaggacttt ctgggtccagt ggccctcca 960
ggcaacctg gagtaacgg cttgacagga gctaaaggcg cagcaggact cctggagtg 1020
gctggcgcac caggattgcc tggccaagg ggtatcccag gcctgttg cgcagctgga 1080
gctactggtg cacgtggact tgggtggcga ccaggccctg ctggatcaaa aggcgagttc 1140
ggaaataagg gagaacctgg ttctgctgga cctcaaggtc ctctggacc ttctggagaa 1200
gaaggaaaaa ggggaccaa tggcgaggct ggatcagcag gtccaccagg accacctgga 1260

```

cttcgtggat	cccctggtag	tagaggactt	ccaggcgctg	atggtagagc	aggcgttatg	1320
ggaccaccag	gaagttagag	agcatccggt	ccagcaggag	ttaggggtcc	taacggagat	1380
gctggtagac	caggtgaacc	aggctttatg	ggcccaaggg	gcctcccag	tagtccagga	1440
aatatcggcc	ctgctggaaa	agaaggccct	gttggaactt	caggtattga	tggacgtcct	1500
ggccctattg	gcccagcagg	tgcaagagga	gaacctggca	atattggatt	tccaggacca	1560
aaggggtcaa	caggcgatcc	tggaaaaaat	ggagataagg	gtcatgctgg	attggcaggc	1620
gcaaggggag	ctcctggtcc	agatggaaac	aacggcgcac	agggtccacc	tggccctcag	1680
ggtgttcaag	gcggaaaagg	cgaacaaggc	ccagctggac	caccaggctt	tcaaggcttg	1740
ccaggaccaa	gtggtccagc	aggtgaagtt	ggcaagccag	gcgagcgtgg	acttcatggc	1800
gagtttgagc	tccctggacc	agcaggacca	agggtgaaa	gaggccctcc	tggagagagt	1860
ggcgctgctg	gaccaacagg	ccaatcgggt	agtagaggtc	ctagtggacc	tccaggccca	1920
gatggaaata	agggtgaacc	aggagttgtg	ggcgctgttg	gaacagctgg	tccttcaggga	1980
ccatcaggac	tcccaggcga	gagaggcgct	gctggcattc	ctggaggaaa	agggtaaaaa	2040
ggcgaacctg	gcctccgtgg	cgaatcggga	aatcctggac	gtgatggtgc	tcgtggtgca	2100
cacggcgctg	tgggcgctcc	aggccctgct	ggtgctactg	gtgatagagg	agaggctggc	2160
gcagctggcc	cagcaggctc	tgctggccca	aggggtagtc	ctggtgaaag	aggcgaaagt	2220
ggacctgctg	gccctaaccg	ctttgctggc	cctgctggag	cagcagggtca	acctggcgct	2280
aaaggtgaaa	ggggcggaag	ggggccaaaa	ggtgaaaatg	gcgttgtggg	accaactggt	2340
ccagtgggag	cagctggacc	tgctgggtcc	aatggaccac	caggaccagc	aggtagtaga	2400
ggagatggtg	gacctccagg	aatgacaggt	tttccagggt	ctgctggtag	aacaggacct	2460
cctgggtcct	gtggtatttc	tgggtccacca	ggaccaccag	gtcctgctgg	aaaagaaggga	2520
ttgaggggtc	cacgtggtga	tcaaggacca	gtgggcagaa	ctggtgaagt	tggcgagctg	2580
ggaccacctg	gttttctggt	agaaaagggc	ccttctggag	aggcagggaac	agctggtcct	2640
cctgggtacac	ctggacctca	aggacttttg	ggtgcacctg	gtattctcgg	attgccaggga	2700
agtaggggag	aacgtggact	tcctggcgct	gcaggagcag	ttggagaacc	tggccctctc	2760
ggaatcgag	gcccaccagg	cgaagaggga	ccaccaggag	ctgttggatc	accaggcgct	2820
aatggtgcac	ctggcgaggc	tggctgtgat	ggaaaccacg	gaaatgatgg	cccaccaggga	2880
agagatggtc	aacctggaca	caaaggcgag	aggggctacc	caggaaatat	tggcccagtt	2940
ggtgctgctg	gcgcaccagg	cccacacggt	ccagttggac	cagcaggaaa	acacggtaat	3000
cgtggcgaaa	caggcccttc	aggcccagtg	ggacctgctg	gtgctgttgg	cccaagaggga	3060
ccatctggac	ctcaaggcat	tagaggcgat	aaggagagag	ctggcgaaaa	aggacctaga	3120
ggcttgcttg	gttttaaaag	acacaacggt	ctccaaggac	ttccaggtat	cgctggtcat	3180
catggagatc	agggtgctcc	tggatcagtg	ggtccagcag	gtcctagagg	cccagcaggc	3240
ttcgagtata	atgttgaggg	cgttacttct	aaagagatgg	caactcagct	cgcttttatg	3300
agattgctcg	ctaactacgc	atccaaaaac	atcacttata	actgcaaaaa	ttccattgca	3360
tatatggatg	aggagacagg	aaatttgaag	aaagcagtta	ttctccaagg	tagtaacgat	3420
gttgagcttg	tggctgaggg	aaatagtaga	ttcacttaca	cagttttggt	ggatggatgc	3480

ES 2 565 185 T3

```
tcaaagaaaa ctaatgagtg gggcaagaca atcattgagt acaagacaaa taagccttct 3540
aggctcccat ttctcgatat tgcacctctt gatatcggag gagctgatca cgagtttttt 3600
gttgatatcg gacctgtttg ttttaag 3627
```

<210> 14

<211> 45

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Señal transitoria vacuolar que se origina de una tiol proteasa vacuolar vegetal

10 <400> 14

```
Met Ala His Ala Arg Val Leu Leu Leu Ala Leu Ala Val Leu Ala Thr
1          5          10          15
```

```
Ala Ala Val Ala Val Ala Ser Ser Ser Ser Phe Ala Asp Ser Asn Pro
          20          25          30
```

```
Ile Arg Pro Val Thr Asp Arg Ala Ala Ser Thr Leu Ala
          35          40          45
```

REIVINDICACIONES

1. Procolágeno humano para su uso en la promoción de la curación de heridas, en el que dicho procolágeno comprende:
5 (i) dos cadenas de colágeno de tipo I α 1 que tienen cada una, una secuencia como se expone en la SEQ ID N°: 1; y
(ii) una cadena de colágeno de tipo I α 2 que tiene una secuencia como se expone en la SEQ ID N°: 2.
2. Un artículo de fabricación que comprende un material de envasado que contiene, como principios activos,
10 procolágeno humano y un agente para la promoción de la curación de heridas, en el que dicho procolágeno comprende:
(i) dos cadenas de colágeno de tipo I α 1 que tienen cada una, una secuencia como se expone en la SEQ ID N°: 1; y
15 (ii) una cadena de colágeno de tipo I α 2 que tiene una secuencia como se expone en la SEQ ID N°: 2.
3. El artículo de fabricación de la reivindicación 2, en el que dicho material de envasado comprende al menos dos recipientes individuales que contienen por separado dicho procolágeno humano y dicho agente para la promoción de la curación de heridas.
- 20 4. El artículo de fabricación de la reivindicación 2, que comprende adicionalmente instrucciones para su uso en la promoción de la curación de heridas.
5. El procolágeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, o artículo de fabricación de la reivindicación 2, en el que dicho procolágeno se produce en células vegetales.
25 6. El procolágeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, o artículo de fabricación de la reivindicación 2, en el que dicho procolágeno es degradable por una colagenasa.
7. El procolágeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha herida está relacionada con una afección fibrótica seleccionada de entre el grupo que consiste en esclerodermia sistémica o localizada, fibrosis hepática, cirrosis alcohólica, cirrosis biliar, hepatitis, enfermedad veno-oclusiva, fibrosis intersticial idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar aguda, síndrome de distrés respiratorio agudo, fibrosis perimuscular, fibrosis pericentral, dermatofibroma, fibrosis renal, nefropatía diabética, glomerulonefritis, queloides, cicatrices hipertróficas, adherencias en las articulaciones, artrosis, mielofibrosis, cicatrices corneales, fibrosis quística, fibrosis muscular, distrofia muscular de Duchenne, estenosis esofágica, cicatrices retroabdominales, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, alteraciones ateroscleróticas, hipertensión pulmonar, angiopatía de arterias y venas, aneurismas de grandes vasos o que son inducidos o iniciados por la revisión de cicatrices, cirugías plásticas, glaucoma, fibrosis de cataratas, cicatrices corneales, enfermedad del injerto contra el hospedador, cirugía de tendones, atrapamiento nervioso, contractura de Dupuytren, adherencias OB / GIN, adherencias pélvicas, fibrosis peridural, enfermedades de la glándula tiroides o paratiroides, enfermedad metastásica ósea, mieloma múltiple y reestenosis.
30 35 40 8. El procolágeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha herida está causada por diabetes.
- 45 9. El procolágeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha herida se elige de entre el grupo que consiste en una úlcera, una quemadura y una herida quirúrgica.
10. El procolágeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, o artículo de fabricación de la reivindicación 2, en el que dicho procolágeno comprende procolágeno monomérico.
50

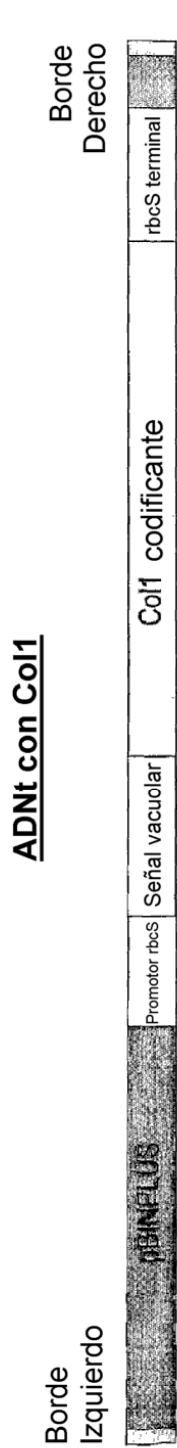


FIG. 1A

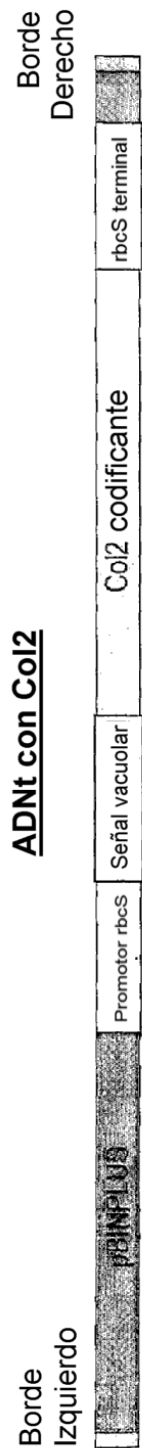


FIG. 1B



FIG. 1C



FIG. 1D

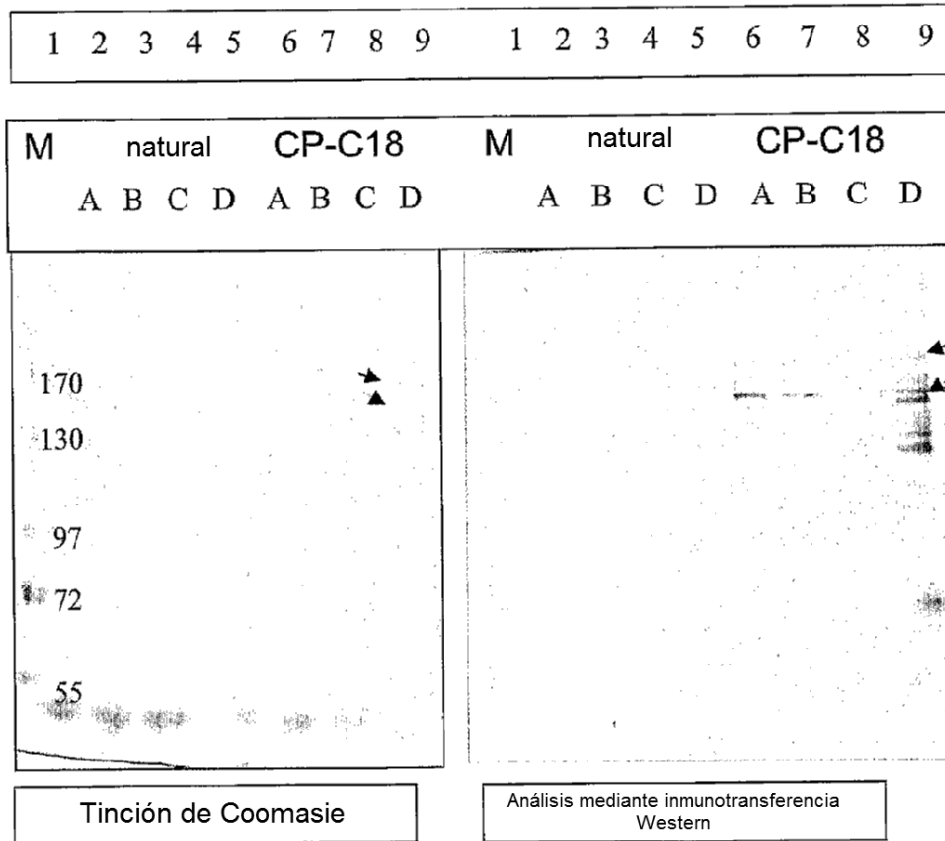


FIG. 2A

FIG. 2B

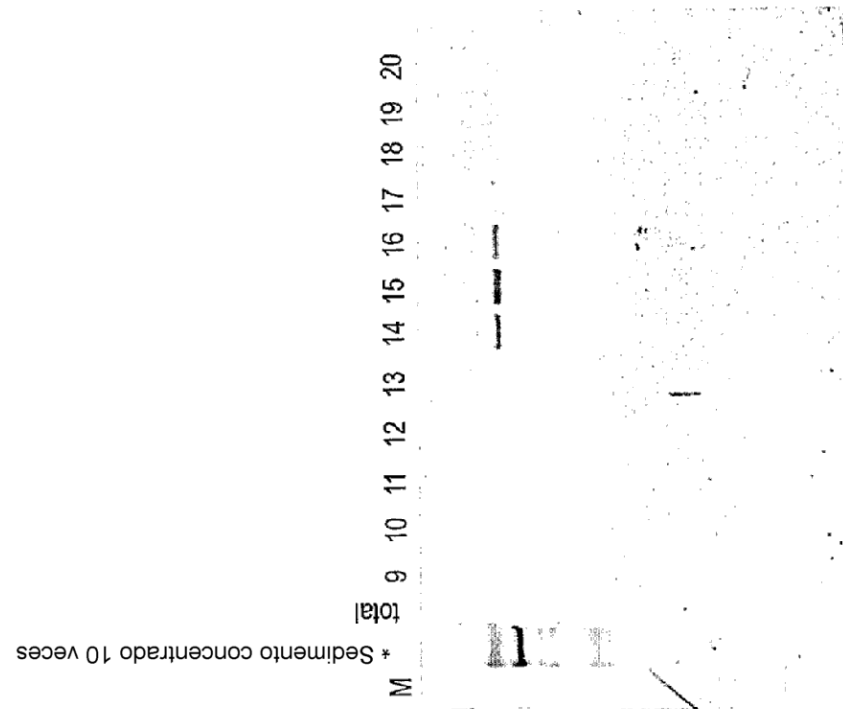


FIG. 3A

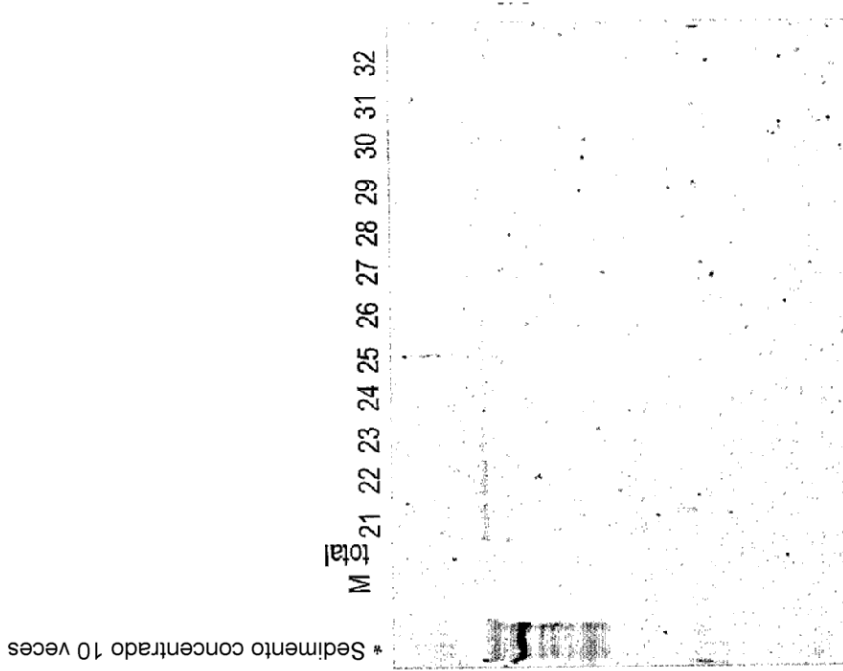
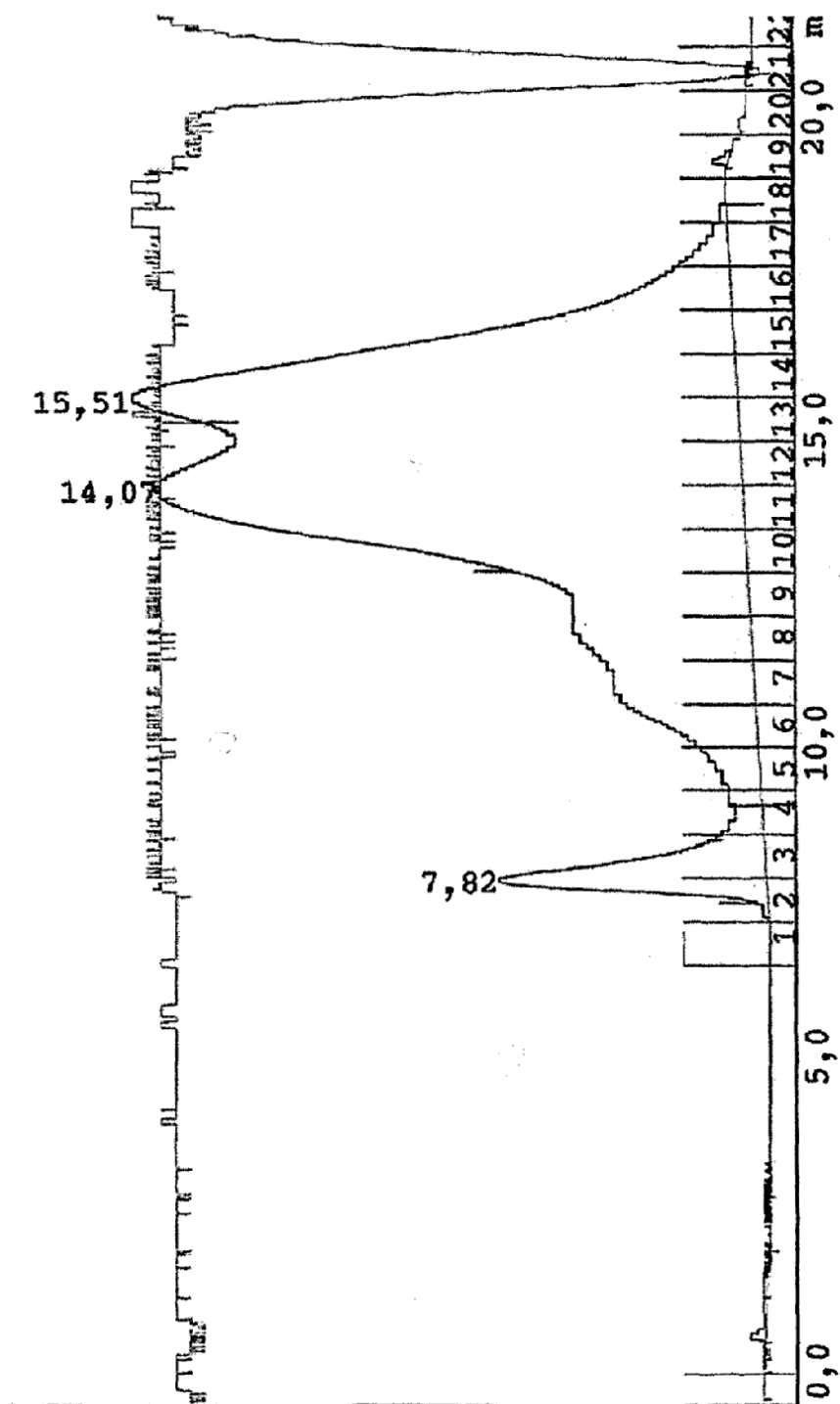


FIG. 3B

FIG. 4



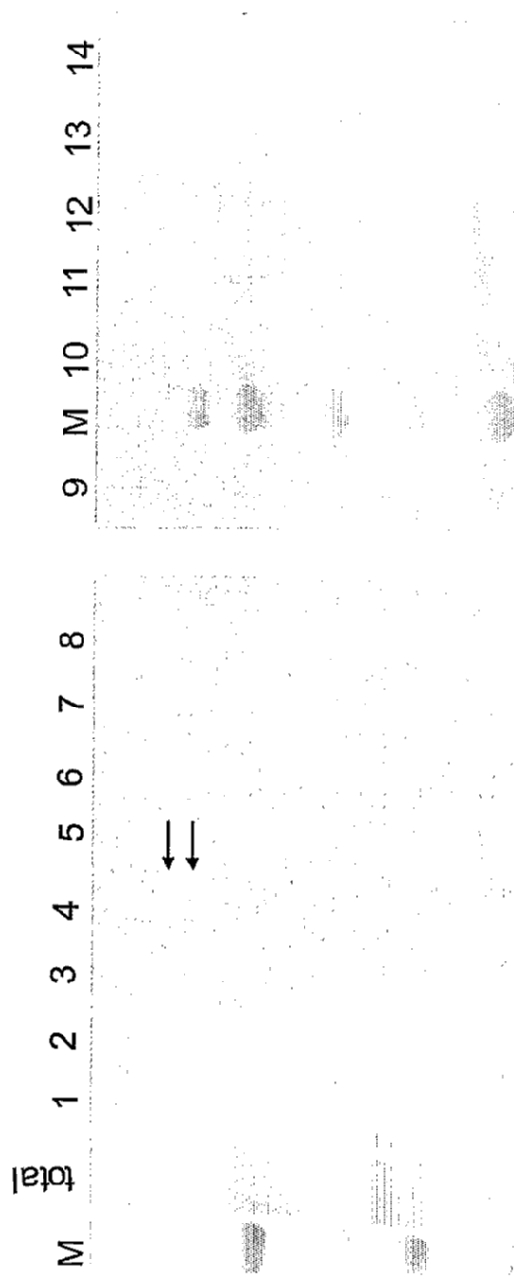


FIG. 5B

FIG. 5A

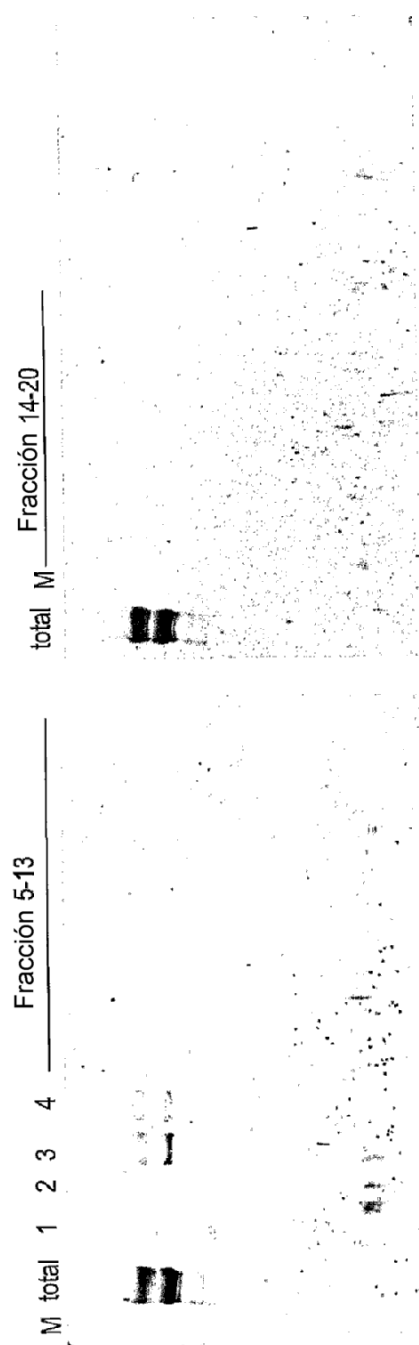


FIG. 6B

FIG. 6A

FIGs. 7A - 7B



FIG. 7B

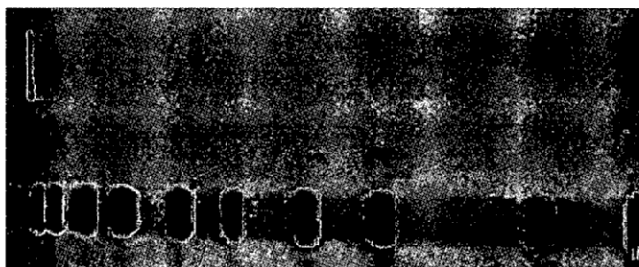


FIG. 7A

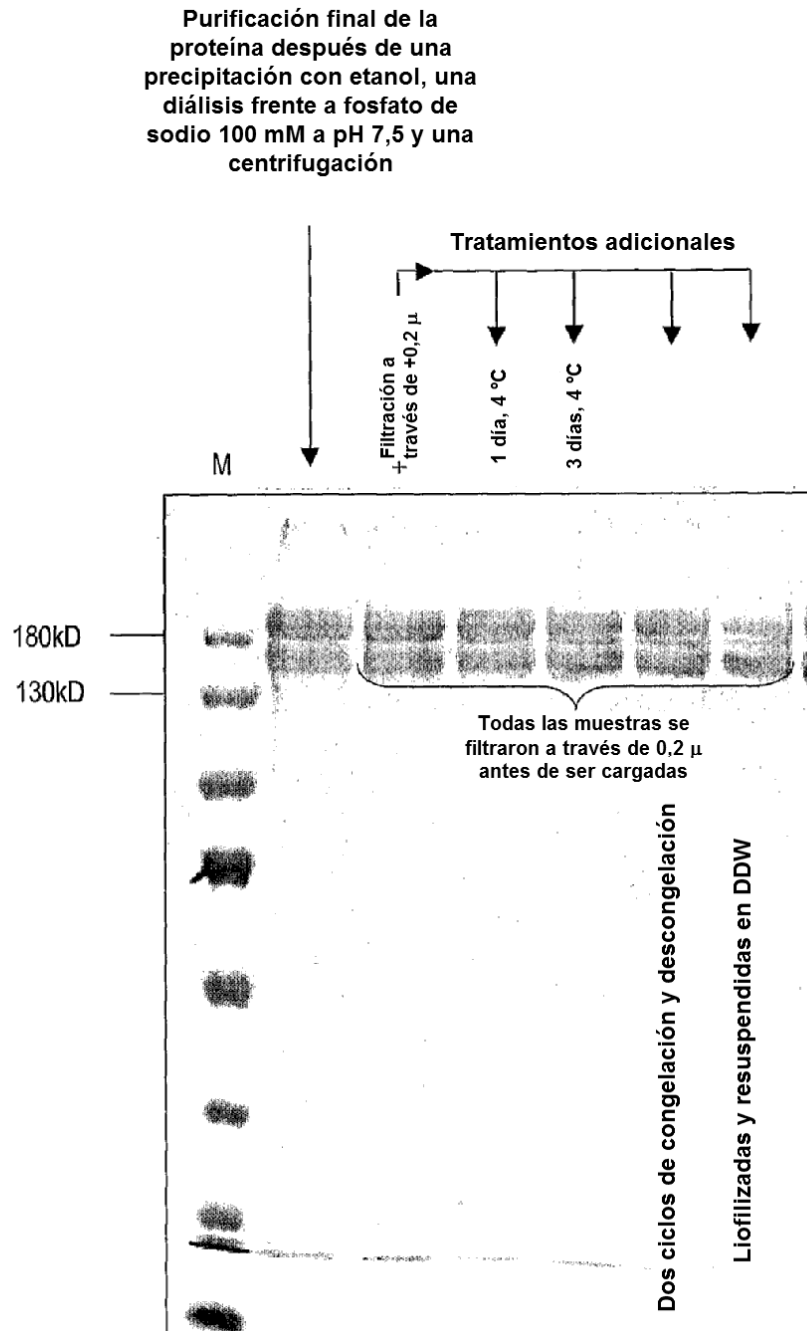


FIG. 8