

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 363**

51 Int. Cl.:
C07K 14/745 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07022109 .8**
96 Fecha de presentación: **14.11.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1935902**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.06.2008**

54 Título: **REACTIVO PARA MEDIR EL TIEMPO DE COAGULACIÓN Y PROCEDIMIENTO PARA FABRICAR EL REACTIVO.**

30 Prioridad:
14.11.2006 JP 2006308061

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.12.2011

73 Titular/es:
SYSMEX CORPORATION
1-5-1, WAKINOHAMA-KAIGANDORI, CHUO-KU
KOBE-SHI, HYOGO 651-0073, JP

72 Inventor/es:
Okuda, Masahiro;
Taniguchi, Tomokuni y
Yuki Masayuki

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 371 363 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

Reactivo para medir el tiempo de coagulación y procedimiento para fabricar el reactivo.

5 Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a un reactivo para la prueba de coagulación usada al investigar el sistema de coagulación extrínseco de la sangre y a un procedimiento para fabricar el reactivo.

2. Descripción de la técnica relacionada

15 La tromboplastina es un complejo entre una proteína denominada factor tisular y un fosfolípido. La tromboplastina está implicada en la coagulación de la sangre. Por tanto, la tromboplastina se ha usado en varias pruebas de coagulación. Por ejemplo, un reactivo para una prueba de tromboplastina para el análisis completo de la capacidad de coagulación de los factores II, VII y X (o los factores II, VII, IX y X) en sangre contiene tromboplastina de tejido cerebral bovino, fibrinógeno, factor V, calcio y fosfolípido.

20 La tromboplastina de tejido cerebral bovino como componente mayoritario del reactivo para la prueba de trombos es un complejo de fosfolípido añadido a una proteína denominada factor tisular. El factor tisular es una proteína que consiste en 257 aminoácidos en total, como se muestra en la Fig. 3 en Yuko Takayenoki y col.: "cDNA and amino acid sequences of bovine tissue factor", Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 181, 1991, páginas 1145-1150. El factor tisular consiste en un dominio extracelular (dominio soluble) desde el extremo N al aminoácido 213, un dominio transmembrana desde el aminoácido 214 al aminoácido 236 y un dominio intracelular desde el aminoácido 237 al aminoácido 257.

25 Convencionalmente, la tromboplastina que tiene dicha constitución se ha producido extrayendo tromboplastina de un cerebro bovino como material de partida con polvo de acetona o solución fisiológica salina.

30 Un cerebro bovino usado como material de partida es uno muy afectado por la encefalopatía espongiiforme bovina (BSE). Por tanto, recientemente se ha producido una demanda de un procedimiento de fabricación que no use un cerebro bovino como material de partida.

35 Existen informes sobre la fabricación, usando técnicas de ingeniería genética, de un factor tisular recombinante que tiene actividad como composición de un reactivo de medición. Ejemplos de dichos informes incluyen los documentos WO 93/07492, WO 98/48283, y un texto de Cheryl L Brucato y col. ("Expression of recombinant rabbit tissue factor in *Pichia pastoris*, and its application in a prothrombin time reagent", Protein Expression and Purification, Vol. 26, 2002, páginas 386-393).

40 Específicamente, en el documento WO 93/07492 ant., un factor tisular humano recombinante se expresa en *Escherichia coli*. A continuación, el factor tisular humano recombinante se purifica mediante cromatografía de afinidad con un anticuerpo monoclonal inmovilizado frente al factor tisular humano. Después, el factor tisular humano recombinante purificado se aplica a un reactivo de protrombina.

45 En el texto de Cheryl L Brucato y col., un factor tisular recombinante de conejo (rTF) se expresa en levaduras. Después se usa una marca de histidina para purificar en rTF y el rTF resultante se aplica a un reactivo del tiempo de protrombina. En este texto, se da a conocer que el factor tisular de conejo expresado es un factor tisular de longitud completa que consiste en un dominio intracelular, un dominio transmembrana y un dominio extracelular.

50 En el documento WO 98/48283, un factor tisular recombinante de conejo de longitud completa constituido por un dominio extracelular, un dominio unido a lípido y un dominio intracelular se expresa en levaduras. Después, para purificar el factor tisular recombinante de conejo se usa una marca de histidina que enriquece específicamente el factor tisular recombinante. A continuación, el factor tisular recombinante de conejo purificado se aplica a un reactivo del tiempo de protrombina.

55 Los documentos WO 2006/096345 y US2006/0046309 describen los reactivos de tromboplastina que comprenden un factor tisular recombinante y un fosfolípido, en los que el factor tisular recombinante se purifica antes de su incorporación en el reactivo.

60 Como se ha descrito anteriormente, se usa un factor tisular recombinante purificado mediante cromatografía etc. con el fin de prevenir la reducción de la actividad de coagulación de un reactivo o la reducción de la precisión de la medición causadas por contaminación del reactivo con impurezas derivadas del huésped. No obstante, para la purificación del factor tisular recombinante es necesario construir un sistema para separar de y eliminar forma eficiente las impurezas derivadas del huésped. Cuando el factor tisular recombinante se produce en grandes cantidades, la etapa de purificación requiere un tiempo trabajo y costes considerables y, por tanto, existe un problema de productividad del factor tisular recombinante.

65

En el procedimiento de purificación con cromatografía de afinidad con, por ejemplo, un anticuerpo específico, el uso del anticuerpo específico da lugar a mayores costes en la producción masiva.

Por ejemplo, para el factor tisular recombinante de conejo, en la práctica se ha usado el procedimiento de purificación con cromatografía de afinidad con una marca de histidina como procedimiento de purificación adaptado a la producción masiva. No obstante, la relación entre una marca de histidina y el factor tisular recombinante puede afectar a la actividad de coagulación, dependiendo del tipo de huésped o del tipo de factor tisular. Por tanto, en este procedimiento de purificación se corta la marca de histidina después de la purificación. La adición de esta etapa de eliminación de la marca cortándola conduce a un incremento de los costes de producción.

En función de la estructura estérica del factor tisular, el factor tisular puede no purificarse satisfactoriamente, incluso con cromatografía con una marca de histidina.

A partir de lo anterior, debería construirse un sistema de producción que pueda satisfacer la productividad con respecto a los costes y la cantidad de producción sin afectar a la actividad de coagulación, para la producción del factor tisular mediante técnicas de ingeniería genética. Por tanto, se desea proporcionar un reactivo para medir el tiempo de coagulación usando un factor tisular obtenido mediante el sistema de producción construido.

Sumario de la invención

El alcance de la presente invención sólo se define con las reivindicaciones adjuntas y no se ve afectado en ninguna medida por las afirmaciones de este sumario.

En un primer aspecto de la presente invención hay un reactivo para medir el tiempo de coagulación, que comprende: Un complejo de un fosfolípido y un factor tisular recombinante obtenido usando un insecto o una célula cultivada de insecto como huésped; y un componente soluble derivado del insecto o de la célula de insecto cultivada.

En un segundo aspecto de la presente invención, un procedimiento para fabricar un reactivo para medir el tiempo de coagulación, que comprende las etapas de: Infectar un insecto o una célula cultivada de insecto con un baculovirus recombinante obtenido integrando el ADNc del factor tisular en ADN de baculovirus; expresar un factor tisular recombinante codificado por el ADNc en el insecto o célula cultivada de insecto; preparar una composición soluble que contiene el factor tisular recombinante eliminando los materiales insolubles de una solución que contiene materiales rotos obtenidos rompiendo el insecto o la célula cultivada de insecto que ha expresado el factor tisular recombinante; y formar un complejo del factor tisular recombinante y un fosfolípido mezclando la composición soluble con el fosfolípido.

Descripción breve de las figuras

La Fig. 1 muestra los resultados de SDS-PAGE de una solución SW que contiene factor tisular recombinante bovino.

La Fig. 2 muestra los resultados de una SDS-PAGE de una solución SF que contiene factor tisular recombinante bovino.

La Figura 3 es un gráfico que muestra la relación entre la actividad de un reactivo control I y la actividad de un reactivo SW.

La Figura 4 es un gráfico que muestra la relación entre la actividad de un reactivo control I y la actividad de un reactivo SF.

La Figura 5 es un gráfico que muestra la relación entre la proporción de dilución del plasma y el tiempo de coagulación en la medición usando un reactivo para la prueba de sensibilidad PIVKA preparada en el Ejemplo 4.

Descripción de las realizaciones preferidas

El reactivo para medir el tiempo de coagulación en una realización de la invención comprende un complejo de un fosfolípido y un factor tisular recombinante obtenido usando un insecto o una célula cultivada de insecto como huésped; y un componente soluble derivado del insecto o de la célula de insecto cultivada.

El reactivo para medir el tiempo de coagulación contiene un factor tisular recombinante producido mediante técnicas de ingeniería genética y contiene además componentes solubles derivados de un insecto o una célula de insecto cultivada usada como huésped. No obstante, el reactivo puede mostrar actividad de coagulación y sensibilidad comparable a las de los reactivos convencionales para medir el tiempo de coagulación que contienen tromboplastina nativa.

El reactivo para medir el tiempo de coagulación usa un factor tisular recombinante en lugar de tromboplastina nativa, de modo que se elimina la necesidad de tratar en el mismo lugar con el cerebro con BSE etc. y, por tanto, es seguro. Además, el procedimiento para fabricar el reactivo para medir el tiempo de coagulación puede simplificar una etapa para purificar el factor tisular recombinante y, por tanto, es excelente en términos de productividad y se puede conseguir una reducción de los costes de producción.

Factor tisular recombinante y complejo de fosfolípido del factor tisular

En primer lugar se describen un factor tisular recombinante en el reactivo para medir el tiempo de coagulación y un complejo del factor tisular recombinante y un fosfolípido (en lo sucesivo en el presente documento también denominado complejo rTF-PL).

El factor tisular recombinante se obtiene mediante técnicas de ingeniería genética con un insecto o una célula de insecto cultivada como huésped. El factor tisular recombinante incluye un factor tisular recombinante bovino, un factor tisular recombinante de conejo y un factor tisular recombinante humano obtenidos mediante dichas técnicas de ingeniería genética.

El factor tisular nativo se conjuga con un fosfolípido, activando de este modo el factor VII en sangre humana. Por tanto, el factor tisular recombinante tiene, preferentemente, al menos un dominio soluble y un dominio transmembrana del factor tisular nativo. El dominio soluble del factor tisular recombinante es un dominio necesario para la interacción con el factor VII y el dominio transmembrana es un dominio necesario para la formación de un complejo con fosfolípido.

El factor tisular recombinante es, más preferentemente, uno que tiene un dominio soluble, un dominio transmembrana y un dominio intracelular en un intervalo tal que la capacidad del factor tisular para formar un complejo con fosfolípido y activar el factor VIII no se deteriora. Dicho factor tisular recombinante bovino es, por ejemplo, un factor tisular que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N° 1 o una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1 mediante sustitución, adición o delección de uno o más aminoácidos y que forma un complejo con fosfolípidos para activar el factor VII. Específicamente, es preferible un factor tisular recombinante que tiene una homología de secuencia de al menos el 95 % con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N° 1, es más preferible un factor tisular recombinante que tiene una homología de secuencia de al menos el 97 % y es lo más preferible un factor tisular recombinante que tiene una homología de secuencia de al menos el 99 %.

La SEC ID N° 1 muestra una secuencia de aminoácidos de factor tisular bovino normal mostrado en la Figura 3 en la literatura de Yuko Takayenoki y col. ant. Es decir, en la SEC ID N° 1 una región desde el aminoácido 1 al aminoácido 213 corresponde a un dominio soluble (dominio extracelular), una región desde el aminoácido 214 al aminoácido 236 corresponde a un dominio transmembrana y una región desde el aminoácido 237 al aminoácido 257 corresponde a un dominio intracelular.

El factor tisular recombinante como se ha descrito anteriormente se obtiene mediante técnicas de ingeniería genética con un insecto o una célula de insecto cultivada como huésped. Esto se describirá con mayor detalle más adelante.

El complejo rTF-PL tiene un fosfolípido unido a un dominio transmembrana del factor tisular recombinante y tiene una actividad de coagulación de la sangre del mismo nivel que la de la tromboplastina nativa (factor tisular nativo de tipo complejo con fosfolípido). Dicho complejo se puede producir mezclando el factor tisular recombinante con un fosfolípido usando un procedimiento conocido. Por ejemplo, el complejo se puede producir mediante procedimientos descritos en los documentos WO 93/07492, WO 98/48283 y en la literatura mencionada anteriormente de Cheryl L Brucato y col.

El fosfolípido usado en la formación del complejo es, en general, preferentemente, un fosfolípido que contiene un ácido graso de C12 a C22. El ácido graso puede ser un ácido graso saturado o insaturado. Ejemplos de fosfolípidos preferidos son, específicamente, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol y fosfatidilserina. Estos fosfolípidos pueden ser productos naturales o productos sintéticos. Estos fosfolípidos pueden ser unos que tengan diferentes clases de ácidos grasos. Antes de usar en la formación del complejo, se pueden mezclar dos o más de estos fosfolípidos en función de los estados y características deseados.

Reactivo para medir el tiempo de coagulación

El reactivo para medir el tiempo de coagulación en una realización de la presente invención contiene componentes solubles derivados de un insecto o una célula de insecto cultivada usada como huésped en la obtención del complejo rTF-PL o el factor tisular recombinante.

El factor tisular recombinante contenido en el reactivo para medir el tiempo de coagulación se obtiene mediante técnicas de ingeniería genética con un insecto o una célula de insecto cultivada como huésped. Los componentes solubles en un insecto o una célula de insecto cultivada como huésped se extraerán junto con el factor tisular recombinante del huésped y, por tanto, los componentes solubles están contenidos, en última instancia, junto con el factor tisular recombinante en el reactivo para medir el tiempo de coagulación.

El tipo de insecto usado como huésped no está limitado. Como insecto usado como huésped, preferentemente se usa un insecto lepidóptero. El insecto lepidóptero es, preferentemente, un gusano de seda (nombre científico:

Bombyx mori).

La célula de insecto cultivada usada como huésped incluye Sf9, Sf21 y HiFive, entre los que preferentemente se usa Sf9.

5 Cuando el factor tisular recombinante se extrae del huésped, el insecto o la célula de insecto cultivada como huésped se rompen en agua o una solución adecuada, tal como un tampón. Mediante filtración o centrifugación se retiran los materiales insolubles de la solución que contiene los materiales rotos obtenidos mediante la rotura. Los componentes solubles derivados del insecto o la célula de insecto cultivada son los componentes que pueden estar contenidos en un filtrado obtenido eliminando mediante filtración los materiales insolubles de la solución que contiene los materiales deshechos del insecto o la célula de insecto cultivada, o son los componentes que pueden estar contenidos en un sobrenadante obtenido eliminando mediante centrifugación los materiales insolubles de la solución que contiene los materiales deshechos del insecto o la célula de insecto cultivada. Ejemplos de componentes solubles incluyen componentes disueltos en un fluido corporal del insecto o componentes disueltos en el citosol de la célula de insecto cultivada. Ejemplos específicos incluyen proteínas solubles que constituyen el insecto o la célula de insecto cultivada, cadenas de azúcar hidrosolubles y proteínas solubles producidas por el insecto o la célula de insecto cultivada.

20 El reactivo para medir el tiempo de coagulación contiene el complejo rTF-PL anterior y los componentes solubles anteriores del insecto o la célula de insecto cultivada. Además, el reactivo puede contener adecuadamente un factor de coagulación, un ion de calcio, un fosfolípido etc. dependiendo del tipo de reactivo para medir el tiempo de coagulación (es decir, el tipo de factor de coagulación que se va a analizar).

25 Por ejemplo, cuando el reactivo es un reactivo para una prueba de trombos que es una prueba para analizar exhaustivamente la capacidad de coagulación de los factores II, VII y X (o los factores II, VII, IX y X), el reactivo contiene el complejo factor tisular bovino-fosfolípido y los componentes solubles del insecto o la célula de insecto cultivada. Preferentemente, el reactivo contiene además los factores I y V y un ion calcio como otros componentes. En lugar de los factores I y V a añadir, se puede usar plasma del cual se han eliminado los factores II, VII y X (o los factores II, VII, IX y X) Como plasma, preferentemente se usa plasma adsorbido en sulfato de bario obtenido adsorbiendo plasma (preferentemente plasma bovino) con sulfato de bario.

30 El plasma adsorbido en sulfato de bario se puede preparar añadiendo sulfato de bario al plasma (preferentemente plasma bovino), mezclando y eliminando el sulfato de bario. El reactivo para la prueba de trombo también se denomina "reactivo de prueba de trombo" o "reactivo II-VII-X".

35 Cuando el reactivo es un reactivo para una prueba de hepaplastina que es una prueba para analizar exhaustivamente la capacidad de coagulación de los factores II, VII y X, el reactivo contiene el complejo factor tisular recombinante de conejo-fosfolípido y los componentes solubles del insecto o la célula de insecto cultivada. Preferentemente, el reactivo contiene además los factores I y V y un ion calcio como otros componentes. En lugar de los factores I y V a añadir, se puede usar el plasma como se ha descrito anteriormente del cual se han eliminado los factores II, VII y X (o los factores II, VII, IX y X)

40 Cuando el reactivo es un reactivo del tiempo de protrombina, el reactivo contiene el complejo factor tisular recombinante de conejo-fosfolípido o el complejo factor tisular recombinante humano-fosfolípido y los componentes solubles del insecto o la célula de insecto cultivada. Preferentemente, el reactivo contiene además un ion calcio como otro componente.

Normalmente, la fuente del ion calcio se selecciona de cloruro cálcico, lactato cálcico y gluconato cálcico.

50 En caso necesario, el reactivo puede contener un tampón seleccionado del grupo que consiste en HEPES, TRIPS, MOPS, PIPES, BISTRIS y glicina de modo que el pH alcance de 5 a 9 y la concentración final alcance de aproximadamente 10 a 100 mM.

55 El reactivo para medir el tiempo de coagulación que tiene la composición tal como se ha descrito anteriormente contiene componentes solubles derivados de un insecto o la célula de insecto cultivada. No obstante, el reactivo para medir el tiempo de coagulación tiene una actividad de coagulación comparable a la de un reactivo que usa tromboplastina nativa. Cuando el reactivo medir el tiempo de coagulación es un reactivo para la prueba de trombo que contiene el complejo factor tisular recombinante bovino-fosfolípido, el reactivo medir el tiempo de coagulación tiene una sensibilidad a PIVKA (proteína inducida en ausencia de vitamina K o con antagonistas de vitamina K) tal que es comparable a la de un reactivo para la prueba de trombo que contiene tromboplastina nativa. Por tanto, el reactivo medir el tiempo de coagulación también se puede usar como reactivo usado para monitorizar el efecto terapéutico de la warfarina o similares.

60 El término "PIVKA" se refiere genéricamente a precursores sin actividad normal del factor de coagulación. PIVKA aparece en sangre en el déficit de vitamina K o en presencia de antagonistas de vitamina K. Entre los factores de coagulación sanguínea, los factores II, VII, IX y X, por ejemplo, se sintetizan en el hígado. En la etapa final de su

síntesis, la vitamina K es necesaria. Se deduce que, en el déficit de vitamina K o en el momento de la administración de inhibidores de la vitamina K, tales como warfarina, estos factores aparecerán en la sangre en forma de precursores sin actividad normal del factor de coagulación. Se ha dado a conocer que el factor tisular bovino es muy sensible a PIVKA, el factor tisular de conejo blanco y el factor tisular humano tienen una sensibilidad baja (véase Hemker y col., "Kinetic aspects of the interaction of blood clotting enzymes, III. Demonstration of an inhibitor of prothrombin conversion in vitamin K deficiency," *Thromb Diath Haemorrh*, Vol. 19, páginas 346-363, 1968); y Denson KW., Reed S.V., Haddon ME, "Validity of the INR system for patients with liver impairment," *Thromb Haemost*, Vol. 73, página 162, 1995). Por este motivo, en la actualidad el reactivo para la prueba de trombo que contiene factor tisular bovino se usa para vigilar el efecto terapéutico de la warfarina o similares. Una prueba que usa el reactivo para la prueba de trombo que contiene factor tisular bovino también se denomina prueba de trombos.

Procedimiento para fabricar el reactivo para medir el tiempo de coagulación

El procedimiento para fabricar un reactivo para medir el tiempo de coagulación comprende las etapas de: infectar un insecto o una célula cultivada de insecto con un baculovirus recombinante obtenido integrando el ADNc del factor tisular en ADN de baculovirus; expresar un factor tisular recombinante codificado por el ADNc en el insecto o célula cultivada de insecto; eliminar los materiales insolubles de una solución que contiene materiales desechos obtenidos rompiendo el insecto o la célula cultivada de insecto que ha expresado el factor tisular recombinante, de modo que se prepara una composición que contiene el factor tisular recombinante; y mezclar la composición soluble con un fosfolípido, de modo que se forma un complejo del factor tisular recombinante y el fosfolípido.

El ADNc del factor tisular usado en el procedimiento de fabricación es ADNc para un factor tisular usado en el reactivo objetivo para medir el tiempo de coagulación. El ADNc del factor tisular tiene al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio soluble y una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana. Preferentemente, el ADNc del factor tisular tiene una secuencia de nucleótidos capaz de codificar los dominios soluble, transmembrana e intracelular del factor tisular. Por ejemplo, en el caso del factor tisular bovino, es preferible usar una secuencia de nucleótidos capaz de codificar la secuencia de aminoácidos (AAB20755) representado por la SEC ID N° 2 o una secuencia de nucleótidos capaz de codificar una secuencia de aminoácidos derivada de esta secuencia de aminoácidos mediante sustitución, adición o delección de uno o más aminoácidos. Específicamente, la secuencia de nucleótidos es, preferentemente, una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 95 % con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N° 2, más preferentemente, una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 97% con la misma, lo más preferentemente secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 99 % con la misma. Más específicamente se puede usar el ADNc del factor tisular bovino disponible en la biblioteca de ADNc etc. de Clontech Laboratories, Inc. o Stratagene Corporation.

Dicho ADNc está integrado en el ADN de baculovirus para preparar un baculovirus recombinante.

El baculovirus tiene un ADN bicatenario cíclico como gen. El baculovirus es un virus patogénico para insectos. El baculovirus incluye nucleopoliedrovirus (NPV) y geanolovirus (GN). El baculovirus usado es, preferentemente, NPV. El NPV es un virus que, en una célula inyectada, sintetiza una proteína denominada poliedrina. Un gen que codifica esta proteína poliedrina no es necesario para el crecimiento de baculovirus. El factor tisular objetivo se puede sintetizar en células infectadas insertando, posteriormente después de un promotor del gen de poliedrina, el ADNc del factor tisular objetivo en lugar del gen de la poliedrina.

Preferentemente se usa un baculovirus que se ha convertido de forma artificial en deficiente en el gen de cisteína proteasa para eliminar la influencia de la proteólisis por la cisteína proteasa producida por el virus.

Un baculovirus recombinante en el que se introdujo el ADNc del factor tisular se puede crear mediante tecnología recombinante conocida. Por ejemplo, el ADNc del factor tisular se inserta en un vector de baculotransferencia. Una célula de insecto se cotransfecta con el vector de transferencia resultante y un ADN de baculovirus. En la célula de insecto se produce recombinación homóloga, de modo que se puede crear un baculovirus recombinante que tiene el ADNc del factor tisular integrado en el ADN del baculovirus. Cuando se usa *Escherichia coli* DH1 0 Bac (Gibco BRL) que contiene baculovirus se puede crear un baculovirus recombinante transfectado *E. coli* DH1 0 Bac con un vector de transferencia en el que se insertó el ADNc del factor tisular.

Después, se infecta un insecto o célula de insecto cultivada huésped se infecta con el baculovirus recombinante preparado de este modo.

Cuando el huésped es un insecto, el tipo de insecto no está particularmente limitado. Como insecto usado como huésped, preferentemente se usa un insecto lepidóptero. Entre los insectos lepidópteros se prefiere particularmente un gusano de seda (*Bombyx mori*). El tipo de gusano de seda no está particularmente restringido. Como gusano de seda, preferentemente se usa un gusano de seda en estado de pupa exarada. El gusano de seda de estado de pupa exarada es un gusano de seda cuyo gen implicado en la formación del capullo estaba mutado. Por tanto, el gusano de seda en estado de pupa exarada no forma un capullo tras el estado de pupa. Ejemplos conocidos de dicho

- gusano de seda de estado de pupa exarada incluye gusanos de seda de cepa Nd, cepa Ndb, cepa Nd-s y cepa Nd-t. Preferentemente, se usan pupas de dichos gusanos de seda. Las pupas tienen una actividad de serina proteasa significativamente menor para descomponer su alimento (hojas de morera), que se produce en los tractos alimentarios de las larvas del gusano de seda, que los gusanos de seda. Por tanto, en las pupas, se puede evitar la descomposición de la proteína expresada en el gusano de seda. Las pupas de gusano de seda son más sensibles a los baculovirus que las larvas del gusano de seda. Por tanto, el virus se puede multiplicar fácilmente en las pupas de gusano de seda para expresar una cantidad grande del factor tisular.
- 5
- Cuando el huésped es una célula de insecto cultivada se pueden usar células cultivadas establecidas, tales como Sf9, Sf21 y HiFi. Entre estas células se prefiere la Sf9.
- 10
- Cuando se usa una célula de insecto cultivada, el factor tisular como producto de proteína expresada se puede secretar fuera de las células o se puede acumular en las células.
- 15
- Como procedimiento de infección se puede usar un procedimiento conocido. Por ejemplo, cuando el huésped es un insecto, es posible usar un procedimiento de inyección para inyectar un fluido viral en un insecto o un procedimiento de microinoculación para inocular en un insecto un microvolumen de fluido viral aplicado sobre una aguja. Como alternativa, las células de insecto cultivadas se transfeccionan con el baculovirus recombinante, las células de insecto cultivadas resultantes se cultivan durante un periodo predeterminado para multiplicar el baculovirus recombinante un en un insecto se inocula el baculovirus recombinante multiplicado, de modo que el insecto se puede infectar con el virus. Cuando una célula de insecto cultivada se usa como huésped, la célula de insecto cultivada se cultiva durante un periodo predeterminado en una solución de cultivo que contiene el fluido del virus, de modo que la célula de insecto cultivada se puede infectar con el virus.
- 20
- Cuando el huésped es un insecto, el insecto infectado se cría durante de 5 a 10 días. Durante la cría, el ADNc insertado en el baculovirus recombinante se expresa en el huésped y el factor tisular objetivo se produce en el insecto. El factor tisular producido se acumula en el insecto. Se piensa que el factor tisular recombinante producido en el insecto ha sufrido un procesamiento postraduccional a través del cual se corta el N-terminal. El factor tisular recombinante bovino procesado de este modo y acumulado en el insecto es, por ejemplo, el representado por la SEC ID N° 1. Después de criar durante un periodo predeterminado, el factor tisular producido se extrae del huésped.
- 25
- Cuando el huésped es una célula de insecto cultivada, la célula de insecto cultivada se cultiva junto con el fluido viral durante de 2 a 7 días. Durante el cultivo, el ADNc insertado en el baculovirus recombinante se expresa en el huésped y el factor tisular objetivo se produce en la célula de insecto cultivada. El factor tisular producido se acumula en la célula de insecto cultivada o se secreta al medio. Se piensa que el factor tisular recombinante acumulado en la célula de insecto cultivada, similar al factor tisular recombinante acumulado en el insecto, ha sufrido un procesamiento postraduccional a través del cual se corta el N-terminal. El factor tisular recombinante bovino procesado de este modo y acumulado en célula de insecto cultivada es, por ejemplo, el representado por la SEC ID N° 1. Después del cultivo durante un periodo predeterminado, el factor tisular producido se extrae de las células cultivadas o del medio.
- 30
- Cuando se usa un insecto como huésped, el factor tisular se puede extraer del insecto mediante el procedimiento siguiente. En primer lugar se altera el insecto que ha expresado el factor tisular recombinante. Los materiales insolubles se eliminan de la solución resultante que contiene materiales deshechos. De este modo se pueden recoger los componentes solubles que contienen el factor tisular recombinante.
- 35
- El insecto se puede triturar mecánicamente con un mezclador, un homogeneizador, un batidor o mediante ultrasonidos. El tratamiento no mecánico con un tensioactivo o similar se puede combinar con el tratamiento mecánico. La rotura del insecto se lleva a cabo en, preferentemente, agua o en una solución adecuada, tal como un tampón. En lo sucesivo en el presente documento, dicha solución se denomina "solución para el tratamiento de rotura". La solución para tratamiento de rotura incluye, por ejemplo, agua, un tampón tal como tampón fosfato y tampón Tris, y un tampón que contiene un tensioactivo.
- 40
- La eliminación de materiales insolubles de la solución que contienen materiales deshechos se puede llevar a cabo mediante filtración, centrifugación o una combinación adecuada de ambos.
- 45
- Cuando se usa una célula de insecto cultivada como huésped, el factor tisular se puede extraer de la célula de insecto cultivada o del medio mediante el procedimiento siguiente. En primer lugar se rompe la célula cultivada que ha expresado el factor tisular recombinante. Los materiales insolubles se eliminan de la solución resultante que contiene materiales deshechos. De este modo se pueden recoger los componentes solubles que contienen el factor tisular recombinante.
- 50
- La célula cultivada se puede triturar mecánicamente con, por ejemplo, un homogeneizador o mediante ultrasonidos. Como alternativa, la célula cultivada se puede romper no mecánicamente (lisar) con un tensioactivo o similar. El tratamiento mecánico se puede combinar con un tratamiento no mecánico. La rotura de la célula cultivada, similar a la rotura del insecto como huésped, se lleva a cabo en, preferentemente, una solución adecuada para tratamiento de
- 55
- 60
- 65

rotura. La eliminación de materiales insolubles de la solución que contienen materiales deshechos se puede llevar a cabo mediante filtración, centrifugación o una combinación adecuada de ambos.

5 La solución que contiene material deshecho obtenido rompiendo el insecto o la célula de insecto cultivada contiene una composición soluble que contiene el factor tisular recombinante. La composición soluble contiene el factor tisular recombinante y componentes solubles derivados del insecto o de la célula de insecto cultivada como huésped. La solución que contiene el material deshecho también contiene el baculovirus usado en la transfección génica, además de la composición soluble. Un tensioactivo también es útil en la inactivación del virus y, por tanto, se usa preferentemente en la extracción del factor tisular recombinante. El tensioactivo puede ser un tensioactivo no iónico, catiónico o aniónico. Desde un punto de vista virucida, el tensioactivo que se va a usar es, preferentemente, un tensioactivo no iónico. La adición del tensioactivo no iónico también es útil en la solubilización del factor tisular recombinante.

15 Como se ha descrito anteriormente, la solución para el tratamiento de rotura es una solución usada en la rotura de un insecto o una célula de insecto cultivada como huésped. La solución para tratamiento de rotura incluye, por ejemplo, agua, un tampón tal como tampón fosfato y tampón Tris, y un tampón que contiene un tensioactivo. Rompiendo el insecto o la célula de insecto cultivada en la solución para el tratamiento de rotura, el factor tisular recombinante producido y los componentes solubles derivados del insecto o la célula de insecto cultivada se disuelven en la solución para el tratamiento de rotura.

20 Como se usa en el presente documento, los componentes solubles derivados de un insecto o una célula de insecto cultivada son componentes solubles en la solución para el tratamiento de rotura. Se deduce que, incluso después de eliminar mediante filtración o centrifugación los materiales insolubles de la solución que contiene materiales desechos, un filtrado obtenido mediante filtración o un sobrenadante obtenido mediante centrifugación pueden contener los componentes solubles. Dichos componentes solubles derivados de un insecto o una célula de insecto cultivada incluyen, por ejemplo, componentes disueltos en un fluido corporal del insecto o en el citosol de la célula de insecto cultivada. Ejemplos específicos incluyen proteínas solubles que constituyen el insecto o la célula de insecto cultivada, cadenas de azúcar hidrosolubles y proteínas solubles producidas por el insecto o la célula de insecto cultivada.

30 Por otro lado, los materiales insolubles son materiales insolubles en la solución para tratamiento de rotura. Ejemplos específicos incluyen materiales sólidos de capas cuticulares y membranas celulares rotas, lipoproteínas, lípidos y proteínas insolubles.

35 De este modo, los materiales insolubles se eliminan de la solución que contiene material desecho, de modo que se obtiene una solución sin materiales insolubles. Ejemplos específicos de la solución sin materiales insolubles incluyen un filtrado obtenido mediante filtración de la solución que contiene material desecho y un sobrenadante obtenido centrifugando la solución que contiene material desecho. A continuación, dicha solución sin materiales insolubles se puede usar como solución que contiene el factor tisular recombinante (en lo sucesivo en el presente documento denominado "solución que contiene rTF").

45 Después de la eliminación de los materiales insolubles, la solución sin materiales insolubles se puede dializar contra un tampón, a pH de 6 a 7, tal como HEPES, como solución externa. La solución sin componentes insolubles obtenida tras la diálisis se puede usar como solución que contiene rTF.

La formación de un complejo rTF-PL se puede llevar a cabo del modo habitual (véase *Methods Enzymol.*, 222, pág. 173, 1993 etc.). Particularmente, el complejo se forma, preferentemente, mezclando la solución que contiene rTF con una solución de fosfolípido en presencia de níquel.

50 Se puede llevar a cabo una etapa de formación del complejo rTF-PL tras la eliminación de materiales insolubles mediante filtración, centrifugación o similares. Cuando la solución sin componentes insolubles se va a dializar, la etapa de formación del complejo se puede llevar a cabo antes o después de la diálisis. Cuando se usa precipitación por saturación, la etapa de formación del complejo también se puede llevar a cabo antes o después de la diálisis.

55 La solución de fosfolípido contiene un fosfolípido usado en la formación del complejo. El fosfolípido usado es, preferentemente, un fosfolípido que tiene ácido grasos de C12 a C22 o ácidos grasos insaturados. Específicamente, se pueden usar los fosfolípidos ilustrados anteriormente para el complejo rTF-PL. La proporción molar de la solución que contiene rTF y la solución de fosfolípido está, preferentemente, en el intervalo de aproximadamente 1/10 a 1/2X 10⁷, más preferentemente en el intervalo de 1/3000 a 1/15000.

60 Como níquel se usa una solución acuosa de una sal de níquel, tal como cloruro de níquel o sulfato de níquel, o una solución que contiene una sal de níquel disuelta en un tampón.

65 La solución que contiene rTF, la solución de fosfolípido y la solución de sal de níquel como se ha descrito anteriormente se mezclan y se hacen reaccionar en agitación durante aproximadamente de 1 a 2 horas, de modo que se puede formar un complejo rTF-PL.

Si el reactivo para medir el tiempo de coagulación que se va a producir contiene un ion calcio, la fuente de ion calcio, tal como cloruro cálcico, lactato cálcico o gluconato cálcico, se añade en el procedimiento de fabricación.

5 Si el reactivo para medir el tiempo de coagulación que se va a producir es un reactivo para una prueba de trombos, los factores I y V se añaden en el procedimiento de fabricación. En lugar de los factores I y V a añadir, se puede usar plasma del cual se han eliminado los factores II, VII y X (o plasma del que se han eliminado los factores II, VII, IX y X) Como plasma, se puede usar plasma adsorbido en sulfato de bario obtenido adsorbido plasma (preferentemente plasma bovino) con sulfato de bario. El procedimiento de preparación de plasma adsorbido sobre sulfato de bario no está particularmente limitado. Por ejemplo, se puede preparar plasma adsorbido sobre sulfato de bario mediante un procedimiento de Owren y col. descrito por Charles y col. : "One-stage Prothrombin Time Techniques", Thrombosis and Bleeding Disorders Theory and Method, 1971, pp. 92-97).

10 En el procedimiento de fabricación se puede añadir un tampón seleccionado del grupo que consiste en HEPES, TRIPS, MOPS, PIPES, BISTRIS y glicina de modo que el pH alcance de 5 a 9 y la concentración final alcance de aproximadamente 10 a 100 mM.

20 Los factores I y V (o plasma adsorbido sobre sulfato de bario etc.), se puede añadir una fuente de ion calcio, un tampón etc., que se añaden según sea necesario, antes o después de la formación del complejo rTH-PL. El orden de adición de los factores I y V, la fuente de ion calcio, el tampón etc., no está particularmente limitado.

El reactivo para medir el tiempo de coagulación producido de este modo contiene el complejo rTH-PL y componentes esenciales para el reactivo para medir el tiempo de coagulación. Específicamente, los componentes esenciales para el reactivo para medir el tiempo de coagulación incluyen un ion calcio en el caso del reactivo del tiempo de protrombina. Los componentes esenciales para el reactivo para la prueba de trombos o para el reactivo para la prueba de hepaplastina incluyen calcio, factor I y factor V. Se puede usar plasma adsorbido en sulfato de bario en lugar de los factores I y V. Los componentes solubles derivados del huésped usado en la producción del factor tisular recombinante están contenidos en el reactivo para medir el tiempo de coagulación producido mediante el procedimiento de fabricación. Los presentes inventores han descubierto que los componentes solubles del huésped (el insecto o las células de insecto cultivadas) no ejercen ninguna influencia sobre la reacción de coagulación de la sangre en la prueba. Sobre la base de este hallazgo, es posible proporcionar un reactivo para medir el tiempo de coagulación que carece sustancialmente de problemas, incluso si el factor tisular recombinante producido mediante técnicas de ingeniería genética no se purifica en un grado alto mediante cromatografía etc. en la etapa de extracción del factor tisular recombinante. Se deduce que, de acuerdo con el procedimiento para fabricar el reactivo para medir el tiempo de coagulación se simplifica la etapa para purificar el factor tisular recombinante producido mediante técnicas de ingeniería genética, alcanzando de este modo una reducción de los costes de producción.

Ejemplos

40 Producción de factor tisular recombinante bovino con el gusano de seda como huésped

Se obtuvo una biblioteca de ADNc de cerebro bovino (Clontech Laboratories, Inc.) y sobre la base del procedimiento descrito en la literatura de Yuko Takayenoki y col. ant., mediante PCR se amplificó un gen de factor tisular bovino. Se clonó un gen de longitud completa del factor tisular bovino que codifica un dominio soluble y un dominio transmembrana del factor tisular bovino. En la amplificación por PCR, como cebador directo se usó un cebador con un sitio de escisión BgIII (5' -agatctatggcgaccccccaacgggcc) y como cebador inverso se usó un cebador con un sitio de escisión EcoRI (5'-acttaagaatacgtcgcaactcgccgc). El gen clonado se pudo confirmar que era un ADN que codificaba una proteína representada por la SEC ID N° 2 analizando su secuencia de nucleótidos con un secuenciador (tipo 4200, L1-COR Inc.).

50 El ADNc clonado se insertó en un sitio de clonación de un virus defectivo en cisteína proteasa pYNG (Katakura Industries Co., Ltd.) para dar un baculovirus recombinante. Se estableció un sistema de expresión en baculovirus para expresar factor tisular bovino usando el baculovirus recombinante.

55 Pupas de gusanos de seda se infectaron con el baculovirus recombinante y, después, se dejaron durante 7 días a 5 °C de modo que las pupas quedaron completamente infectadas por el virus.

60 Tras la infección, se rompieron las pupas de gusano de seda en un tampón con un homogeneizador. Una solución obtenida mediante la rotura se filtró y se centrifugó para eliminar los materiales sólidos. En el procedimiento desde la inserción del ADNc del factor tisular bovino en baculovirus hasta la eliminación de materiales sólidos se usó el servicio "Superworm" disponible en Katakura Industries Co., Ltd.

65 La solución de la que se habían eliminado los materiales sólidos se obtuvo de Katakura Industries Co., Ltd. Esta solución se homogeneizó después con un homogeneizador (como One Corporation, 10 golpes a un número de revoluciones de 5000 rpm) y se centrifugó (3000 x g, 8 °C, 10 minutos). Después se obtuvo el sobrenadante y se añadieron 2 partes en volumen de 10 % del tensioactivo NP-40 (Calbiochem Inc.) a 8 partes en volumen del

sobrenadante. La concentración final del tensioactivo NP-40 en la mezcla resultante fue del 2 %. Después, la mezcla se incubó a 30 °C durante 3 horas, de modo que se inactiva el baculovirus y solubiliza el factor tisular recombinante bovino.

5 La inactivación del baculovirus se confirmó analizando el título del virus de la mezcla observando la presencia o ausencia de infección viral bajo un microscopio de acuerdo con el procedimiento de Reed-Muench (Reed, L. J. y Muench, H.: Amer. J. Hyg., 27, 493 (1938)).

10 La mezcla se centrifugó (3000 x g, 8 °C, 30 minutos) para obtener un sobrenadante del cual se había eliminado las fracciones de lipoproteínas y lípidos. Después, el sobrenadante resultante se introdujo en un tubo de celulosa para diálisis (Sanko Junyaku Co., Ltd.) y se dializó contra HEPES 20 mM, a pH 7,2, que contiene cloruro sódico 150 mM. Tras la diálisis, se obtuvo la solución en el tubo de diálisis. La solución obtenida se usó como solución SW que contiene rTF. La solución SW que contiene rTF contiene el factor tisular recombinante bovino y componentes solubles derivados de gusano de seda.

15 Producción de factor tisular recombinante bovino con Sf9 como huésped

20 Se obtuvo una biblioteca de ADNc de cerebro bovino (Stratagene Corporation) y sobre la base del procedimiento descrito en la literatura de Yuko Takayenoki y col. ant., mediante PCR se amplificó un gen de factor tisular bovino. Se clonó un gen de longitud completa del factor tisular bovino que codifica un dominio soluble y un dominio transmembrana del factor tisular bovino. En la amplificación por PCR, como cebador directo se usó un cebador con un sitio de escisión BgmHI (5'-ggatccatggcgcaccccaacgggcccg) y como cebador inverso se usó un cebador con un sitio de escisión XhoI (5'-ctcgagttatgcagcgttgagcggcgtg). El gen clonado se pudo confirmar que era un ADN que codificaba una proteína representada por la SEC ID N° 2 analizando su secuencia de nucleótidos con un secuenciador de ADN 4200 L (LI-COR Inc.).

30 El ADNc clonado se digirió con BamHI y XhoI y después se insertó en un vector de transferencia pFast Bac (GIBCO BRL). *Escherichia coli* OH1 0 Bac que contiene ADN genómico de baculovirus se transfeccionó con pFast Bac. Por último se obtiene el baculovirus en el que se ha introducido el ADNc del factor tisular bovino. La célula de insecto cultivada Sf9 se transfeccionó con el baculovirus recombinante y después se cultivó durante 72 horas, para dar el virus P1. Después, otra Sf9 se infectó con el virus P1 y, a continuación, se cultivó durante 4 días en medio Grace (Invitrogen Corporation) que contiene 10 % de FBS, de modo que se obtuvo el virus P2. Otra Sf9 se infectó con el virus P2 resultante y la Sf9 infectada se cultivó en medio sin suero Sf-90011 (Invitrogen Corporation). Después del cultivo se recogió la Sf9. Del Sf9 recogido se extrajo un factor tisular recombinante bovino con un tampón Tris, a Ph 7,5, que contiene 1 % de CHAPS, de modo que se prepara una solución SF que contiene rTF. La solución SF que contiene rTF contiene el factor tisular recombinante bovino y componentes solubles derivados de la célula Sf9.

SDS-PAGE de las soluciones que contienen rTF

40 La solución SW que contiene rTF y la solución SF que contiene rTF obtenidas mediante el procedimiento de preparación descrito con anterioridad se sometieron a SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico),

45 A 10 µl de la solución SW que contiene rTF se añadieron 10 µl de un tampón de muestra de SDS, a pH 7,5, que contiene Tris 200 nM, glicina 72 mM y 0,02 % de SDS. La mezcla resultante se llevó a ebullición a 100 °C durante 5 minutos para preparar una muestra para SDS (muestra s.f. para SDS).

50 En un pocillo de gradiente de 5 a 10 % de gel de poliacrilamida se introdujeron 10 µl de la muestra SW resultante para SDS y se sometió a electroforesis a 50V durante 3 horas en una cámara de electroforesis (Mini Protein II Electrophoresis Unit, Nippon Bio-Rad Laboratories K.K.). Tras la electroforesis, el gel de poliacrilamida se tiñó usando un kit de tinción de plata (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.). Los resultados se muestran en la Figura 1. En el perfil de electroforesis de la Figura 1, la calle 1 es un marcador de peso molecular (Precision Plus, Nippon Bio-Rad Laboratories K.K.), y la calle 2 es la muestra SW para SDS. La posición en la que apareció una banda del factor tisular recombinante bovino (posición con un peso molecular de aproximadamente 40 kDa) se indicó con una flecha.

55 A 10 µl de la solución SF que contiene el factor tisular recombinante bovino rTF se añadieron 10 µl de un tampón de muestra de 2xSDS, a pH 7,5, que contiene Tris 200 nM, glicina 72 mM y 0,02 % de SDS. La mezcla resultante se llevó a ebullición a 100 °C durante 5 minutos para preparar una muestra para SDS (muestra SF para SDS).

60 En un pocillo de gradiente de 5 a 10 % de gel de poliacrilamida se introdujeron 10 µl de la muestra SF resultante para SDS y se sometió a electroforesis a 100V durante 1 hora en una cámara de electroforesis (Mini Protein II Electrophoresis Unit, Nippon Bio-Rad Laboratories K.K.). Tras la electroforesis, el gel de poliacrilamida se tiñó usando un kit de tinción CCB (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Los resultados se muestran en la Figura 2. En el perfil de electroforesis de la Figura 2, la calle 1 es un marcador de peso molecular (Precision Plus, Nippon Bio-Rad Laboratories K.K.), y la calle 2 es la muestra SF para SDS. La posición en la que apareció una banda del factor tisular recombinante bovino (posición con un peso molecular de aproximadamente 40 kDa) se indicó con una flecha.

65

A partir de los resultados de las Figuras 1 y 2, se descubrió que la solución SW que contiene rTF y la solución SF que contiene rTF no sólo contienen los factores tisulares recombinantes bovinos sino también un número muy grande de proteínas derivadas de los huéspedes.

- 5 A partir de los resultados de la figura 1 se puede pensar que la pureza del factor tisular recombinante bovino en la solución SW que contiene rTF es de aproximadamente del 5 al 10 %.

A partir de los resultados de la figura 2 se puede pensar que la pureza del factor tisular recombinante bovino en la solución SF que contiene rTF es de aproximadamente del 1 al 5%.

10 Preparación del complejo rTF-PL

0,4 g de lecitina de soja base (Nisshin Oil Mills, Ltd.) se disolvió en 0,25 % de desoxicolato sódico DOC (20 ml). La lecitina de soja base se disolvió por completo a temperatura ambiente con un rotador y se obtuvo la mezcla. 0,1 g de 1,2-oleil-sn-glicero-3-fosfoetanolaimna (DOPE) y 0,3 g de 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (DOPS) (ambos disponibles en Avanti polar lipid. Inc.) se suspendieron en la mezcla para preparar una solución de fosfolípidos.

A 37,5 ml de la solución de fosfolípidos se añadieron 5 ml de solución de cloruro de níquel 0,5M, 5,0 ml de tampón HEPES 10 mM, a pH 7,3M y 2,5 ml de la solución que contiene rTF anterior (la solución SW que contiene rTF o la solución SF que contiene rTF). Por tanto, la mezcla se agitó durante 30 segundos con un agitador vórtex. Después de agitar, la mezcla se hizo reaccionar a 37 °C durante 15 minutos en un dispositivo de ultrasonidos BRANSON #221 de tipo O a 37 °C durante 1 hora. La mezcla se transfirió a una membrana de diálisis (tubo de celulosa para diálisis Sanko Junyaku Co., Ltd.) y se dializó 3 veces contra HEPES 10 mM, a pH 7,3, que contiene cloruro sódico 0,15 M. Tras la diálisis, se obtuvo la solución en el tubo de diálisis. La solución obtenida se usó como una solución que contiene el complejo rTF-PL (una solución SW que contiene el complejo rTF-PL o una solución SF que contiene el complejo rTF-PL). La solución SW que contiene el complejo rTF-PL contiene los componentes solubles derivados de gusano de seda y el complejo de factor tisular recombinante bovino y fosfolípido. La solución SF que contiene el complejo rTF-PL contiene los componentes solubles derivados de la célula Sf9 y el complejo de factor tisular recombinante bovino y fosfolípido.

30 Preparación de reactivo para la prueba de trombos

(1) Preparación de plasma adsorbido en sulfato de bario

A plasma bovino suplementado con ácido cítrico se añadió sulfato de bario en una cantidad de 30 % p/v a base de plasma bovino y solución salina fisiológica en una cantidad de 20 % v/v a base del plasma bovino y la mezcla se agitó durante 60 minutos con un rotador.

La mezcla se centrifugó a 5000 rpm, a 4 °C durante 15 minutos y después se obtuvo un sobrenadante. A este sobrenadante se añadió sulfato de bario poco a poco en una cantidad de 30 % p/v en base al sobrenadante. De este modo, los factores II, VII, IX y X en plasma se adsorbieron sobre sulfato de bario. Después, la mezcla se centrifugó para obtener un sobrenadante. El sobrenadante se introdujo en un tubo de diálisis (tubo de celulosa para diálisis Sanko Junyaku Co., Ltd.) y se dializó a de 2 a 8 °C contra solución fisiológica salina como solución externa. Tras la diálisis, se obtuvo la solución en el tubo de diálisis se filtró a través de un filtro de 0,45 µm.

El filtrado resultante se usó como plasma adsorbido en sulfato de bario para preparar los siguientes reactivos.

(2) Preparación de reactivos para la prueba de trombos

La solución que contiene el complejo rTF-PL y el plasma adsorbido en sulfato de bario preparados como se ha descrito anteriormente y el tampón HEPES 40 Mm, a Ph 7,3, que contiene lactato cálcico 4 mM se mezclaron en agitación en una proporción de 1: 2: 1 para preparar un reactivo para la prueba de trombos. Un reactivo para la prueba de trombos, preparado a partir de la solución SW que contiene el complejo rTF-PL, se usó como reactivo SW. Un reactivo para la prueba de trombos, preparado a partir de la solución SF que contiene el complejo rTF-PL, se usó como reactivo SF.

55 **Ejemplo 1**

Influencia de los componentes solubles derivados de gusano de seda sobre la actividad de coagulación

De acuerdo con el procedimiento de preparación descrito anteriormente se preparó el reactivo SW por triplicado (SW-1, SW-2 y SW-3).

De acuerdo con el procedimiento de preparación descrito anteriormente, se preparó un reactivo SW para la prueba de trombos a partir de pupas de gusano de seda no infectadas por baculovirus. Este reactivo se usó como reactivo SW (no infectado). El reactivo SW (no infectado) contiene componentes solubles derivados del gusano de seda, pero no contiene el factor tisular recombinante bovino y componentes solubles derivados de baculovirus.

Por separado, las pupas de gusano de seda se infectaron con baculovirus en el que no se había integrado el ADNc del factor tisular bovino y a partir de las pupas de gusano de seda infectadas se preparó un reactivo SW para la prueba de trombos de acuerdo con el procedimiento de preparación descrito anteriormente. Este reactivo se usó como reactivo SW (sin ADNc). El reactivo SW (sin ADNc) contiene componentes solubles derivados del gusano de seda y del baculovirus, pero no contiene el factor tisular recombinante bovino.

Esos 5 reactivos (SW-1, SW-2, SW-3, SW (no infectado) y SW (sin ADNc) se usaron para medir el tiempo de coagulación de plasma normal con un analizador de coagulación de sangre completamente automático Coagrex 800 (Shimadzu Corporation). Por separado, los 5 reactivos se diluyeron 2, 4 y 8 veces con solución fisiológica salina, respectivamente. Estos reactivos diluidos se usaron para medir el tiempo de coagulación del plasma normal del mismo modo que anteriormente. Como plasma normal se usó Coagutrol N (Sysmex Corporation). Los resultados del tiempo de coagulación (Segundos) obtenido con cada reactivo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

	Tiempo de coagulación (segundos)			
	Dilución por 1	Dilución por 2	Dilución por 4	Dilución por 8
SW (no infectado)	ND	ND	ND	ND
SW (sin ADNc)	ND	ND	ND	ND
SW-1 (0,27 mg/ml)	31,3	35,7	45,1	53,8
SW-2 (0,41 mg/ml)	30,4	33,6	40,8	48,8
SW-3 (0,46 mg/ml)	32,3	39,6	47,4	55,1

En la Tabla 1, el tiempo de coagulación no se detectó cuando se usó el reactivo SW (no infectado) o el reactivo SW (sin ADNc). Por otro lado, el tiempo de coagulación se detectó cuando se usó el reactivo SW-1SW-2 or SW-3. A partir de este resultado se descubrió que los componentes solubles derivados de gusano de seda y de baculovirus contenidos en el reactivo no inducen reacción de coagulación de la sangre.

Cuando se usó el reactivo SW-1SW-2 o SW-3, el tiempo de coagulación se prolongó a medida que se aumentó la proporción de dilución. Cuando la proporción de dilución del reactivo se aumenta, la concentración de factor tisular recombinante bovino en el reactivo disminuye. En consecuencia, se podía confirmar que existe una correlación entre el cambio de concentración del factor tisular recombinante bovino en el reactivo y el tiempo de coagulación.

A partir de lo anterior se descubrió que los componentes solubles derivados de gusano de seda y de baculovirus contenidos en el reactivo no ejerce ninguna influencia sobre la reacción de coagulación de la sangre. Por tanto, se descubrió que la purificación del factor tisular recombinante para eliminar estos componentes solubles no es necesaria para la preparación del reactivo para medir el tiempo de coagulación. Además, se puede pensar que cuando se usan células de insecto cultivadas, como Sf9, como huésped, los componentes solubles del huésped tampoco ejercen ninguna influencia sobre la reacción de coagulación de la sangre.

Ejemplo 2

Sensibilidad del reactivo SW y el reactivo SF

Los reactivos SW y SF preparados mediante el procedimiento descrito anteriormente se usaron para medir el tiempo de coagulación y el índice internacional estándar (valor ISI) de cuatro calibradores AK (AK-Aa, AK-Bb, AK-Cc y AK-Dd, todos ellos fabricados por Immuno Inc. , Austria) con un analizador de la coagulación de la sangre completamente automático Coagrex 800 (Shimadzu Corporation). Los calibradores AK son aquéllos con valores de INR indicados determinados anteriormente en OQUASTA Surveillance.

Como reactivo control I se usó un reactivo para prueba de trombos comercial (Fukugou-Inshi T "Kokusai", Sysmex Corporation) de valor ISI calculado conocido para medir el tiempo de coagulación y los valores ISI de los calibradores AK del mismo modo que se ha descrito anteriormente. El reactivo comercial es un reactivo para la prueba de trombos que contiene tromboplastina de cerebro bovino nativa como complejo factor tisular bovino-fosfolípido.

Como reactivo control II se preparó un reactivo para prueba de trombos que contenía el factor tisular recombinante bovino purificado. El reactivo control II se usó para medir el tiempo de coagulación (Segundos) y los valores ISI para los calibradores AK del mismo modo que anteriormente. El reactivo control II se preparó del mismo modo que el reactivo SW, a excepción de que el fraccionamiento con sulfato amónico se llevó a cabo en la etapa de preparar el reactivo SW, de modo que se proporciona una pureza de aproximadamente el 95 % o mayor para el factor tisular recombinante bovino contenido en la solución SW que contiene rTF. El reactivo SW, el reactivo SF y el reactivo control II se prepararon de modo tal de que se usó el tiempo de coagulación similar al del reactivo control I cuando

ES 2 371 363 T3

se midió con Coagutrol N (Sysmex Corporation).

El tiempo de coagulación (segundos) y el valor ISI obtenidos usando cada reactivo se muestran en la Tabla 2.

5

Tabla 2

	Tiempo de coagulación (segundos)			
	Reactivo SW:	Reactivo SF	Reactivo control I	Reactivo control II
AK-A	35	39,1	34,1	33,9
AK-B	59,9	64,2	55,3	56,4
AK-C	106,1	106,6	88,6	95,4
AK-R	110,5	112	90,4	100,6
AK-D	177,8	179,3	133,5	156,9
Valor ISI	0,99	0,97	0,91	0,9

10

A partir de los resultados de la tabla 2, se podría confirmar que para los calibradores AK-Aa a AK-Dd, los reactivos SW y SF exhiben tiempo de coagulación y sensibilidad similares a los de los reactivos control I y II. A partir de este resultado se descubrió que los reactivos SW y SF exhiben tiempo de coagulación y sensibilidad similares a los obtenidos mediante el reactivo convencional usando tromboplastina de cerebro bovino nativa y el reactivo que contiene el factor tisular bovino recombinante purificado.

15

Ejemplo 3

Correlación de la actividad de coagulación entre el reactivo SW o SF y los reactivos control

20

Los mismos reactivos (reactivo SW, reactivo SF, reactivo control I y reactivo control II) que se usaron en el ejemplo 2 se usaron para medir la actividad de coagulación (%) de plasmas (N= 20) de pacientes que habían recibido warfarina, con un analizador de la coagulación de la sangre completamente automático Coagrex 800 (Shimadzu Corporation). Se preparó una curva de coagulación para determinar la actividad (%) usando Coagutrol N (Sysmex Corporation). Como plasma de pacientes que habían recibido warfarina se usó Multi-Coumadin Set (George King Biomedical Inc.)

25

La actividad (%) obtenida con cada reactivo se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Nº de muestra	Actividad de coagulación (%)			
	Reactivo SW:	Reactivo SF	Reactivo control I	Reactivo control II
1	12,1	11,9	12,1	9,7
2	22,7	24,6	23,8	24,9
3	32,8	34,4	33,6	34,6
4	14,3	14,3	14,5	10,8
5	75,3	79,9	74,7	76,9
6	38	37,8	37,8	37,4
7	42,5	39,4	40,3	44,2
8	100,2	104,3	98,3	108
9	128	123,1	129,9	120,9
10	95,5	98,5	95,7	100,5
11	7,2	6,8	6,6	7
12	14,7	15	15	14,3
13	9,5	9,6	9,6	10,1
14	13,7	14,1	13,9	12,7
15	128	123,1	129,9	131,8
16	95,5	98,5	95,7	99,5
17	6,9	6,9	6,8	7,1

Nº de muestra	Actividad de coagulación (%)			
	Reactivo SW:	Reactivo SF	Reactivo control I	Reactivo control II
18	14,7	15	15	14,2
19	9,5	9,6	9,6	9,7
20	13,7	14,1	13,9	13

5 A partir de los resultados de la tabla 3, se podría confirmar que, para cada muestra de plasma, los reactivos SW y SF muestran una actividad similar a la obtenida con los reactivos control I y II. A partir de este resultado se descubrió que los reactivos SW y SF muestran una actividad similar a la obtenida mediante el reactivo convencional usando tromboplastina de cerebro bovino nativa y el reactivo que contiene el factor tisular bovino recombinante purificado.

10 La correlación entre la actividad obtenida mediante el reactivo control I y la actividad mediante el reactivo SW para cada muestra de sangre se muestra en la Figura 3. La correlación entre la actividad obtenida mediante el reactivo control I y la actividad mediante el reactivo SF para cada muestra de sangre se muestra en la Figura 4. En la Figura 3, la actividad (%) determinada mediante el reactivo control I se muestra en el eje de abscisas y la actividad (%) determinada mediante el reactivo SW se muestra en el eje de ordenadas. En la Figura 4, la actividad (%) determinada mediante el reactivo control I se muestra en el eje de abscisas y la actividad (%) determinada mediante el reactivo SF se muestra en el eje de ordenadas.

15 Como se es evidente en las Figuras 3 y 4, se descubrió que tanto la actividad (%) determinada mediante el reactivo SW y la actividad (%) determinada mediante el reactivo SF presentan una correlación elevada con la actividad (%) determinada mediante el reactivo control I. A partir de este resultado se descubrió que la actividad mediante los reactivos SW y SF en este ejemplo es comparable con la del reactivo convencional usando tromboplastina de cerebro bovino nativa.

20

Ejemplo 4

Sensibilidad a PIVKA del reactivo para la prueba de trombos

25 La solución SW que contiene rTF se usó para analizar la sensibilidad de la misma a PIVKA.

Específicamente, el reactivo SW para la prueba de trombos y la solución de cloruro cálcico 20 mM se mezclaron en cantidades iguales. La mezcla resultante se mezcló con plasma adsorbido humano para preparar un reactivo para la prueba de sensibilidad de PIVKA.

30

35 Por separado, se usaron una solución de tromboplastina derivada de cerebro bovino y una solución de tromboplastina derivada de cerebro de conejo se usaron para preparar los reactivos control para la prueba de sensibilidad a PIVKA del mismo modo que se ha descrito anteriormente. La solución de tromboplastina derivada de cerebro bovino contenía tromboplastina extraída de un cerebro bovino. La solución de tromboplastina derivada de cerebro de conejo contenía tromboplastina extraída de un cerebro de conejo.

40 Los reactivos preparados para la prueba de sensibilidad a PIVKA se usaron para medir el tiempo de coagulación de plasma normal y 3 plasmas de pacientes que habían recibido warfarina, con un analizador de la coagulación de la sangre completamente automático Coagrex 800 (Shimadzu Corporation).

45

Como plasma normal se usó Coagutrol N (Sysmex Corporation) y se usaron diluciones del mismo con solución fisiológica salina. Para preparar dichas diluciones, Coagutrol N se diluyó 3, 5 y 7 veces, respectivamente.

45 Como plasmas de pacientes que habían recibido warfarina se usó Multi-Coumadin Set (Georoge King Biomedical Inc.) y se usaron diluciones del mismo con solución fisiológica salina. Para preparar dichas diluciones, los plasmas se diluyeron 2, 5 y 3 veces, respectivamente.

Los resultados se muestran en la figura 5.

50 La Figura 5a muestra los resultados obtenidos usando la solución SW que contiene rTF. La figura 5B muestra los resultados obtenidos usando la solución de tromboplastina derivada de cerebro bovino. La Figura 5C muestra los resultados obtenidos usando la solución de tromboplastina derivada de cerebro de conejo. En la Figura 5, el tiempo de coagulación (segundos) se muestra en el eje de ordenadas y la proporción de dilución del plasma muestra en el eje de abscisas. La sensibilidad a PIVKA se analizó de acuerdo con el procedimiento de Hemker y Denson.

55

de acuerdo con el procedimiento de Hemker y Denson, una línea recta que indicaba el plasma normal se comparó con una línea recta que indicaba el plasma de los pacientes. Cuando se usó la solución de tromboplastina derivada de cerebro bovino (Fig. 5B), se observó inhibición de la coagulación (línea discontinua) por PIVKA en el plasma de

pacientes que habían recibido warfarina. Por otro lado, cuando se usó la solución de tromboplastina derivada de cerebro de conejo (Fig. 5C), no se observó inhibición de la coagulación (línea discontinua). En consecuencia, se puede decir que la tromboplastina bovina nativa es sensible a PIVKA, mientras que la tromboplastina de conejo nativa tiene una sensibilidad baja a PIVKA. Estos resultados eran compatibles con los del informe de Hemker y Denson.

Cuando se usó el reactivo SW para la prueba de trombos (Fig. 5A), se obtuvieron resultados similares a los de la solución de tromboplastina derivada de cerebro bovino (Fig. 5B). A partir de estos resultados se pudo confirmar que el complejo de factor tisular recombinante bovino y fosfolípido en el reactivo en este ejemplo muestra propiedades similares a las de la tromboplastina bovina nativa. Además se descubrió que los componentes solubles derivados de gusano de seda contenidos en el reactivo SW para la prueba de trombos no ejerce ninguna influencia sobre la sensibilidad a PIVKA.

A partir de los resultados de los Ejemplos anteriores se descubrió que los reactivos anteriores para medir el tiempo de coagulación, aunque contienen componentes solubles derivados de un insecto o una célula de insecto cultivada, muestran sensibilidad y actividad de coagulación en el mismo nivel que los de los reactivos convencionales para medir el tiempo de coagulación. A partir de este resultado se descubrió que el reactivo anterior para medir el tiempo de coagulación se puede usar como sustituto del reactivo convencional para medir el tiempo de coagulación. Además, el factor tisular recombinante usado en el reactivo anterior para medir el tiempo de coagulación puede simplificar el procedimiento de purificación de modo que, en comparación con los procedimientos para medir el tiempo de coagulación usando el factor tisular recombinante convencional, puede aumentar la productividad y reducir los costes de producción.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Sysmex Corporation
 <120> Reactivo para medir el tiempo de coagulación
 5 <130> 1-2006-069EP
 <150> JP 2006-308061
 <151> 2006-11-14
 <160> 2
 <170> Patentin versión 3,1
 10 <210> 1
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> Bos taurus
 <400> 1
 15

Thr Asp Val Val Val Ala Tyr Asn Ile Thr Trp Lys Ser Thr Asn Phe
 1 5 10 15

Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Ile Asn His Val Tyr Thr
 20 25 30

Val Gln Ile Ser Pro Arg Leu Gly Asn Trp Lys Asn Lys Cys Phe Tyr
 35 40 45

Thr Thr Asn Thr Glu Cys Asp Val Thr Asp Glu Ile Val Lys Asn Val
 50 55 60

Arg Glu Thr Tyr Leu Ala Arg Val Leu Ser Tyr Pro Ala Asp Thr Ser
 65 70 75 80

Ser Ser Thr Val Glu Pro Pro Phe Thr Asn Ser Pro Glu Phe Thr Pro
 85 90 95

Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr Ile Gln Ser Phe Glu Gln
 100 105 110

Val Gly Thr Lys Leu Asn Val Thr Val Gln Asp Ala Arg Thr Leu Val
 115 120 125

Arg Ala Asn Ser Ala Phe Leu Ser Leu Arg Asp Val Phe Gly Lys Asp
 130 135 140

Leu Asn Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ala Ser Ser Thr Gly Lys Lys
 145 150 155 160

ES 2 371 363 T3

Lys Ala Thr Thr Asn Thr Asn Gly Phe Leu Ile Asp Val Asp Lys Gly
165 170 175

Glu Asn Tyr Cys Phe His Val Gln Ala Val Ile Leu Ser Arg Arg Val
180 185 190

Asn Gln Lys Ser Pro Glu Ser Pro Ile Lys Cys Thr Ser His Glu Lys
195 200 205

Val Leu Ser Thr Glu Leu Phe Phe Ile Ile Gly Thr Val Met Leu Val
210 215 220

Ile Ile Ile Phe Ile Val Val Leu Ser Val Ser Leu His Lys Cys Arg
225 230 235 240

Lys Val Arg Ala Glu Arg Ser Gly Lys Glu Asn Thr Pro Leu Asn Ala
245 250 255

Ala

- 5 <210> 2
- <211> 292
- <212> PRT
- <213> Bos taurus
- <400> 2

Met Ala Thr Pro Asn Gly Pro Arg Val Pro Cys Pro Gln Ala Ala Val
1 5 10 15

Ala Arg Ala Leu Leu Phe Gly Leu Val Leu Ile Gln Gly Ala Gly Val
20 25 30

Ala Gly Thr Thr Asp Val Val Val Ala Tyr Asn Ile Thr Trp Lys Ser
35 40 45

Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Ile Asn His
50 55 60

Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Pro Arg Leu Gly Asn Trp Lys Asn Lys
65 70 75 80

Cys Phe Tyr Thr Thr Asn Thr Glu Cys Asp Val Thr Asp Glu Ile Val
85 90 95

Lys Asn Val Arg Glu Thr Tyr Leu Ala Arg Val Leu Ser Tyr Pro Ala

ES 2 371 363 T3

100 105 110
Asp Thr Ser Ser Ser Thr Val Glu Pro Pro Phe Thr Asn Ser Pro Glu
115 120 125
Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr Ile Gln Ser
130 135 140
Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Leu Asn Val Thr Val Gln Asp Ala Arg
145 150 155 160
Thr Leu Val Arg Ala Asn Ser Ala Phe Leu Ser Leu Arg Asp Val Phe
165 170 175
Gly Lys Asp Leu Asn Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ala Ser Ser Thr
180 185 190
Gly Lys Lys Lys Ala Thr Thr Asn Thr Asn Gly Phe Leu Ile Asp Val
195 200 205
Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe His Val Gln Ala Val Ile Leu Ser
210 215 220
Arg Arg Val Asn Gln Lys Ser Pro Glu Ser Pro Ile Lys Cys Thr Ser
225 230 235 240
His Glu Lys Val Leu Ser Thr Glu Leu Phe Phe Ile Ile Gly Thr Val
245 250 255
Met Leu Val Ile Ile Ile Phe Ile Val Val Leu Ser Val Ser Leu His
260 265 270
Lys Cys Arg Lys Val Arg Ala Glu Arg Ser Gly Lys Glu Asn Thr Pro
275 280 285
Leu Asn Ala Ala
290

REIVINDICACIONES

1. Un reactivo para medir el tiempo de coagulación, que comprende:
- 5 un complejo de un fosfolípido y un factor tisular recombinante obtenido usando un insecto o una célula cultivada de insecto como huésped; y
un componente soluble derivado del insecto o de la célula de insecto cultivada.
2. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el factor tisular recombinante es un factor tisular recombinante bovino que tiene un dominio soluble y un dominio transmembrana.
- 10 3. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el factor tisular recombinante tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N° 1 o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de secuencia de al menos el 95 % con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N° 1.
- 15 4. El reactivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el insecto es un insecto lepidóptero.
- 20 5. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el insecto lepidóptero es un gusano de seda.
6. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el componente soluble derivado del insecto o la célula de insecto cultivada comprende una proteína soluble derivada del insecto o la célula de insecto cultivada.
- 25 7. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el reactivo para medir el tiempo de coagulación es un reactivo para la prueba de trombos, un reactivo para la prueba de hepaplastina o un reactivo del tiempo de protrombina.
- 30 8. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en el factor I, factor V, plasma adsorbido sobre sulfato de bario y un ion calcio.
9. Un procedimiento para fabricar un reactivo para medir el tiempo de coagulación comprende las etapas de:
- 35 infectar un insecto o una célula cultivada de insecto con un baculovirus recombinante obtenido integrando el ADNc del factor tisular en ADN de baculovirus; expresar un factor tisular recombinante codificado por el ADNc en el insecto o célula cultivada de insecto; preparar una composición soluble que contiene el factor tisular recombinante eliminando los materiales insolubles de una solución que contiene materiales rotos obtenidos rompiendo el insecto o la célula cultivada de insecto que ha expresado el factor tisular recombinante; y formar un complejo del factor tisular recombinante y un fosfolípido mezclando la composición soluble con el fosfolípido.
- 40 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el ADNc codifica un dominio soluble y un dominio transmembrana del factor tisular bovino.
- 45 11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el ADNc codifica el factor tisular recombinante bovino que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N° 2 o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de secuencia de al menos el 95 % con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N° 2.
- 50 12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la solución que contiene materiales desechos comprende un tensioactivo.

Fig.1

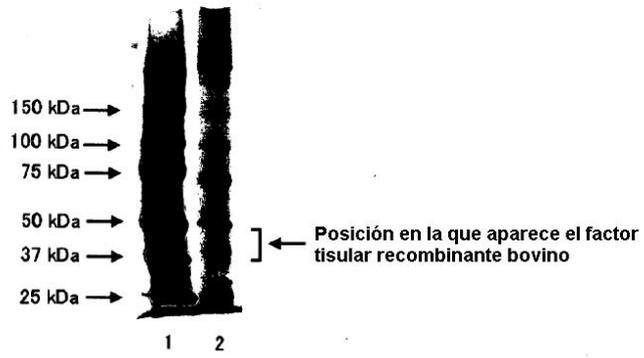


Fig.2

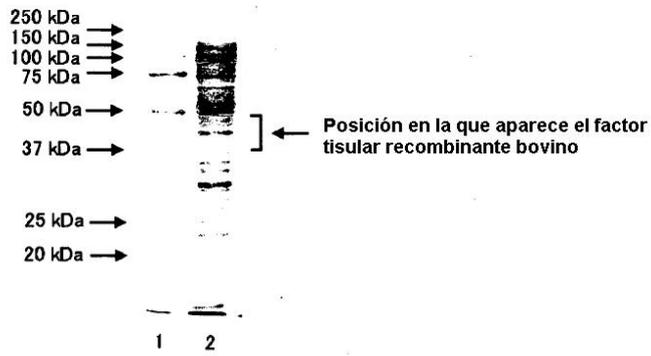


Fig.3

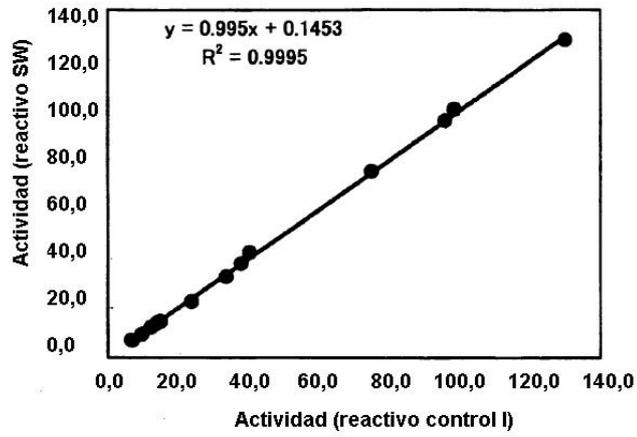


Fig.4

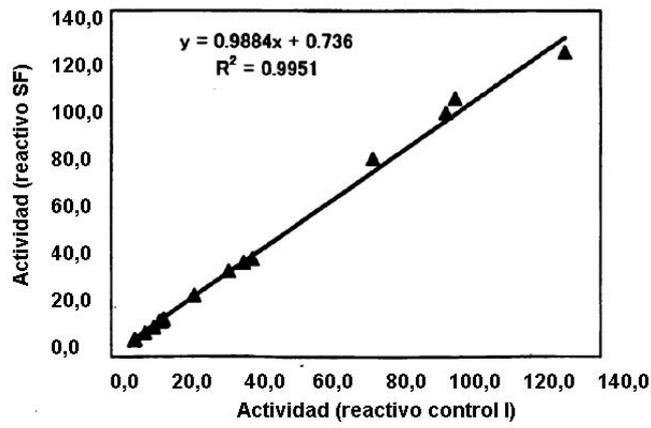


Fig. 5A

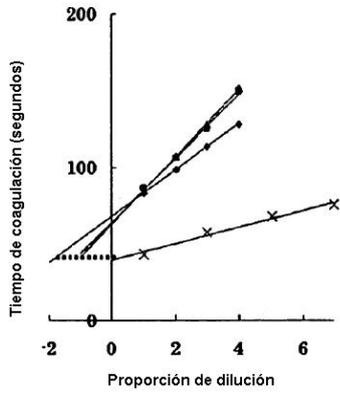


Fig. 5B

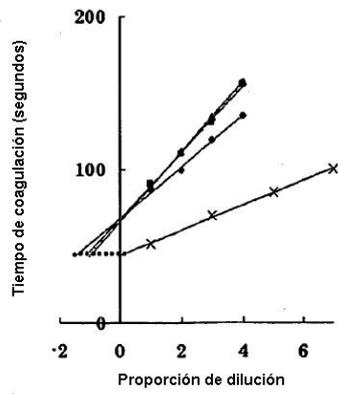


Fig.5C

