

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 242**

51 Int. Cl.:

C07K 14/71 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/67 (2006.01)

C12N 15/79 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2010 E 10740573 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 2459721**

54 Título: **Sistema mejorado de expresión de pentraxina 3 larga humana y sus usos**

30 Prioridad:

29.07.2009 EP 09166759

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

02.12.2013

73 Titular/es:

**SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE
RIUNITE S.P.A. (100.0%)
Viale Shakespeare 47
00144 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**SASSANO, MARICA;
ESPOSITO, ADELAIDE;
RIVIECCIO, VINCENZO y
CASSANI, GIOVANNI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 432 242 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

Sistema mejorado de expresión de pentraxina 3 larga humana y sus usos

CAMPO DEL INVENTO

5 El presente invento se refiere a un sistema celular derivado de seres humanos, capaz de expresar altos niveles de la proteína pentraxina 3 humana (hPTX3), a unos métodos y al material usado.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

La pentraxina 3 larga humana, PTX3 o hPTX3 (número de acceso en el GeneBank BD 131701) es una glicoproteína multimérica que se compone de ocho subunidades engarzadas por puentes de disulfuro.

10 Los autores del presente invento ya han diseñado un sistema de expresión para la producción de la PTX3 en el linaje de células humanas HEK293F. Este sistema está basado en un plásmido que contiene el gen de resistencia a neomicina, en donde el gen de PTX3 está puesto bajo el control de una secuencia del promotor de ubiquitina C humana. Dicho sistema evita la formación potencial de una PTX3 quimérica derivada de una producción endógena de PTX3 por un linaje de células de origen no humano. El clon aislado mejor productor, denominado 2F12, se seleccionó entre los que se habían obtenido. Se obtuvo una producción de aproximadamente 20 mg/l de PTX3, que
15 no era suficiente para las necesidades de producción a escala comercial.

Con la meta de aumentar los niveles de expresión de PTX3, los autores del presente invento han construido un plásmido en el que el gen de PTX3 estaba bajo el control de promotor de CMV. El plásmido se usó para volver a transfectar el clon 2F12 que expresa la PTX3. El nivel de productividad detectado en los nuevos transfectomas aislados era más alto que lo esperado, a saber alrededor de 80 mg/l.

20 DESCRIPCIÓN DEL INVENTO

Se obtuvo un clon de origen humano que expresaba altos niveles de la PTX3 humana usando una estrategia experimental que incluía las siguientes etapas:

- a) la construcción de unas casetes de expresión de plásmidos que son portadoras de la PTX3 humana bajo el control de un promotor de CMV (citomegalovirus);
- 25 b) la inserción de la casete de resistencia a higromicina en dicho plásmido, con el fin de seleccionar unos transfectomas estables que se originan a partir de una transfección renovada del clon G418 resistente que expresa la PTX3;
- c) la modificación de la identidad y de los niveles de las proteínas recombinantes expresadas;
- d) la caracterización bioquímica de la hPTX3 recombinante.

30 El contenido del documento de solicitud de patente internacional PCT/EP2009/050937 se incorpora a la presente memoria descriptiva por su referencia.

Es un objeto del invento el uso de un vector de expresión eucariótico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína pentraxina PTX3 larga humana bajo el control de un promotor efectivo y de una secuencia de nucleótidos que comprende un marcador seleccionable, que tiene esencialmente la secuencia de SEQ ID 1, para
35 transformar a una célula anfitriona humana recombinante que ya es capaz de expresar la proteína pentraxina PTX3 larga humana, en donde la célula anfitriona humana recombinante es el clon 293F/PTX3/2F12 recombinante depositado en la ECACC con el nº 08011001. En un aspecto particular, el vector está linealizado.

Otro objeto del invento es una célula humana recombinante transformada que es capaz de expresar la proteína pentraxina PTX3 larga humana que es el clon 293F/PTX3/2F12 recombinante depositado en la ECACC bajo el nº
40 08011001, transformado adicionalmente por uso del vector que más arriba se ha descrito. En una forma preferida de realización, la célula humana recombinante transformada es el clon MS24PTX recombinante depositado en la Health Protection Agency, Culture Collections Centre For Emergency Preparedness and Response Salisbury UK [Agencia de Protección de la Salud, Centro de Colecciones de Cultivo para Preparación y Respuesta de Emergencia], Salisbury, Reino Unido, con el nº 09072902.

45 Otro aspecto del invento es el uso de la célula recombinante humana transformada, que más arriba se ha descrito, para la producción de la proteína pentraxina PTX3 larga humana.

Otro objeto del invento es un procedimiento para la producción de la proteína pentraxina PTX3 larga humana recombinante que comprende:

a) transfectar una célula humana recombinante que ya expresa la proteína pentraxina PTX3 larga humana recombinante, con un plásmido seleccionable en el que el gen de la pentraxina larga humana está puesto bajo el control del promotor de CMV;

b) seleccionar y cultivar la célula humana recombinante transfectada;

5 c) purificar la proteína pentraxina PTX3 larga humana a partir del medio de cultivo de la célula humana recombinante transfectada,

en donde la célula humana recombinante que ya expresa la proteína PTX3 pentraxina larga humana recombinante es el clon 293F/PTX3/2F12 depositado en la ECACC bajo el nº 08011001. De manera preferible, la célula humana recombinante transfectada es el clon MS24PTX recombinante depositado en la Health Protection Agency, Culture Collections Centre For Emergency Preparedness and Response Salisbury UK Salisbury, Reino Unido, con el nº 09072902.

10

En una forma preferida de realización, la etapa de purificación incluye por lo menos una de las siguientes etapas: una cromatografía de intercambio aniónico, una cromatografía con hidroxipatito o una cromatografía de exclusión por tamaños.

15 El invento será ilustrado ahora por medio de unos Ejemplos no limitadores, refiriéndose en particular a las siguientes figuras:

Figura 1: mapa y características principales del pSASSI-hPTX3

Figura 2: crecimiento, viabilidad y productividad en un matraz de agitación de (A) el clon MS24PTX y (B) el clon 293F/PTX3/2F12.

20 **Figura 3:** caracterización por el gradiente de SDS-PAGE 4-15% (A) y de cromatografía de exclusión por tamaños (B) de la PTX3 humana recombinante purificada a partir del clon MS24PTX.

Figura 4: capacidad de fijación de FGF2 del clon de hPTX3 293F/PTX3/2F12 y del clon de hPTX3 MS24PTX.

Figura 5: mapa y características principales de pSC1-hPTX3.

25 EJEMPLOS

Ejemplo 1: clon 293F/PTX3/2F12

Construcción del plásmido pSC1-PTX3

1. Construcción del pSG/Ub

1.1 Preparación de la secuencia del promotor de ubiquitina C humana

30 El promotor de ubiquitina C humana se toma a partir del plásmido pUB/Bsd (de Invitrogen, nº de catálogo V512-20), por amplificación con una PCR (= acrónimo de Polymerase Chain Reaction = reacción en cadena de la polimerasa). Como una parte de la estrategia de clonación, se introducen en ambos extremos unas secuencias de reconocimiento por endonucleasas de restricción. Se construyen un sitio BsaAI en el cebador de amplificación situado secuencia arriba y un sitio EcoRI en el cebador situado secuencia abajo. La región amplificada corresponde a los nucleótidos 1.941 hasta 3.161 en la secuencia de pUB/Bsd.

35

Los oligonucleótidos se designan de la siguiente manera:

5'p UbC: longitud: 26mero (SEQ ID 3) ATATCACGTG ATC TGG CCT CCG CGC C

3'p UbC: longitud: 23mero (SEQ ID 4) GGAATTC GGT CCG GTC TAA CAA A

40 El protocolo para la amplificación es el siguiente: 1 ng/µl de un ADN plasmídico, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 400 nM de cada cebador, 1X del tampón suministrado y 0,04 u/ml de la polimerasa de ADN de Taq (de Sigma Genosys); perfil de temperaturas: 3 min. a 94°C, 30 veces (30 s (segundos) a 94°C, 30 s a 46°C, 2 min. a 72°C), 5 min. a 72°C, enfriamiento a 4°C hasta el uso ulterior.

45 El producto de la amplificación (con un tamaño de 1.238 pb = pares de bases) se purifica mediante una columna de centrifugación con una membrana de sílice (NucleoSpin, de Machery-Nagel GmbH & Co.), se liga en el vector pGEM-T (de Promega nº de catálogo A1360) y se transforma en el seno de la cepa anfitriona de E.coli HB2151 (de Pharmacia Biotech). Los transformantes se seleccionan por el crecimiento en un medio LB suplementado con 50 mg/l de ampicilina.

ES 2 432 242 T3

Los ADN plasmídicos, aislados a partir de las colonias resistentes a la ampicilina, se comprueban mediante un análisis por restricción con las enzimas *SmaI* más *SacI* (se esperan unos fragmentos de ~ 3.650 y 600 pb).

5 Los plásmidos que muestran el modelo de restricción correcto se comprueban adicionalmente mediante un análisis de la secuencia del inserto entero y subsiguientemente se digieren con las enzimas de restricción *EcoRI* (de Sigma-Genosys) y *BsaAI* (de New England Biolabs).

El promotor de ubiquitina C humana se purifica mediante una separación en un gel de agarosa y una elución en una columna de centrifugación con una membrana de sílice.

1.2 Preparación del fragmento del vector pSG5

10 El plásmido pSG5 (con un tamaño de 4.076 pb, de Stratagene) se cortó con las enzimas de restricción *EcoRI* (de Sigma-Genosys) y *BsaAI* (de New England Biolabs); los fragmentos resultantes tenían una longitud de 1.432 y 2.644 pb respectivamente. El fragmento de 2.644 pb, que contenía la estructura de pSG5, se preparó y purificó mediante una electroforesis en un gel de agarosa más una columna de centrifugación con una membrana de sílice.

1.3 Preparación de pSG/Ub

15 Los fragmentos de ADN preparados en las etapas 1.1 y 1.2 se ligaron usando la ligasa de ADN de T4 (de Promega) y se transformaron en el seno de células de *E. coli* HB2151. Los transformantes se seleccionaron por el crecimiento en un medio LB suplementado con 50 mg/l de ampicilina.

El ADN plasmídico, aislado a partir de colonias resistentes a la ampicilina, se comprobó mediante un análisis por restricción con las enzimas *EcoRI* más *SacII* (se esperan: unos fragmentos de 2.670 y 1.192 pb). El ADN plasmídico, con el modelo de restricción esperado, se designó como pSG/Ub.

20 2. Construcción de pSC1

2.1 Preparación de la casete de resistencia a neomicina (NeoR)

25 La Casete de Resistencia a Neomicina (NeoR) se tomó a partir del plásmido pcADN3 (con un tamaño de 5.446 pb, de Invitrogen), amplificándolo por una PCR. Como una parte de la estrategia de clonación, unas secuencias de reconocimiento por la endonucleasa de restricción *AflIII* se introdujeron en ambos extremos. La región amplificada corresponde a los nucleótidos 1.788 hasta 3.252 en la secuencia de pcADN3 e incluye el promotor y el origen de replicación de SV40 y el ORF (marco de lectura abierto) de resistencia a neomicina, y la señal de PolyA de SV40.

Los oligonucleótidos se designan de la siguiente manera:

5'NeoR (SEQ ID 5) ATATACATG TCC CCA GGC AGG CAG AA

3'NeoR (SEQ ID 6) ATATACAT GTAT ACA GAC ATG ATA AG

30 El protocolo para la amplificación fue el siguiente: 1 ng/μl de un ADN plasmídico, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 400 nM de cada cebador, 1X del tampón suministrado, 0,04 u/μl de la polimerasa de ADN de Taq (de Sigma Genosys); perfil de temperaturas: 3 min. a 94°C, 30 veces (30 s a 94°C, 30 s a 46°C, 2 min. a 72°C), 5 min. a 72°C, enfriando a 4°C hasta el uso ulterior.

35 El producto de la amplificación (con un tamaño de 1.484 pb) se purificó por medio de una columna de centrifugación con una membrana de sílice, se ligó en el vector pGEM-T-Easy (de Promega nº de catálogo A1360) y se transformó en el seno de la cepa anfitriona de *E. coli* HB2151. Los transformantes se seleccionan mediante el crecimiento sobre un medio LB, suplementado con 50 mg/l de ampicilina. Se comprueban los ADN plasmídicos aislados a partir de las colonias resistentes a la ampicilina mediante un análisis por restricción con *SmaI* más *SacI* (se esperan: unos fragmentos de ~ 1.200 y 3.300 pb).

40 Los plásmidos que mostraban el modelo de restricción correcto se comprobaron ulteriormente mediante un análisis de las secuencias del inserto entero y subsiguientemente se digirieron con la enzima de restricción *AflIII* (de New England Biolabs). La casete NeoR (1.471 pb) se purificó por medio de una separación en un gel de agarosa y de una elución en una columna de centrifugación con una membrana de sílice.

2.2 Preparación del fragmento de vector pSG/Ub

45 El plásmido pSG/Ub, preparado en la etapa 1.3, se linealizó por digestión con *AflIII* y se purificó en una columna de centrifugación con una membrana de sílice.

2.3 Preparación de pSC1

50 Unos fragmentos de ADN preparados como en las etapas 2.1 y 2.2 se ligaron usando una ligasa de ADN de T4 (de Promega) y se transformaron en el seno de la cepa de *E. coli* JM109 (de New England Biolabs). Los transformantes se seleccionaron por el crecimiento sobre un medio LB, suplementado con 50 mg/l de ampicilina.

Unas colonias resistentes a ciertos antibióticos se analizaron preliminarmente mediante una amplificación por PCR con los oligonucleótidos 5'NeoR y 3'NeoR, como se han descrito con anterioridad, y subsiguientemente, los plásmidos purificados se comprobaron mediante un análisis por restricción. Para esta finalidad, se usaron las enzimas SmaI (posición 602, secuencia de NeoR interna) y SacII (posición 4.142, secuencia de UbC interna). El ADN plasmídico, con el modelo de restricción esperado, (fragmentos de 3.540 y 1.793 pb), se designó como pSC1.

3. Construcción de pSC1-PTX3

3.1 Preparación de la secuencia de codificación de hPTX3

La secuencia de hPTX3 (número de acceso al GeneBank BD 131701) se tomó del pSG5-PTX3 (documento de solicitud de patente internacional WO 99/32516 "composiciones farmacéuticas que contienen la pentraxina PTX3 larga) mediante una digestión con BamHI (de Roche Applied Science). El fragmento de PTX3 humana (con un tamaño de 1.463 pb) se purificó mediante una electroforesis en un gel de agarosa y en una columna de centrifugación con una membrana de sílice.

3.2 Preparación del fragmento de vector pSC1

El vector pSC1 se linealizó mediante una digestión con BamHI y se purificó sobre una columna de centrifugación con una membrana de sílice.

3.3 Construcción y verificación sobre pSC1-PTX3

Los fragmentos de ADN preparados en las etapas 3.2 y 3.3 se ligaron usando la ligasa de ADN de T4 (de Roche Applied Science) y se transformaron en el seno de la cepa de E. coli JM109. Los transformantes se seleccionaron por el crecimiento sobre un medio LB, suplementado con 50 mg/l de ampicilina y se escrutaron preliminarmente por una PCR con dos oligonucleótidos complementarios con la secuencia de PTX3.

Las secuencias de oligonucleótidos son:

5'PTX (SEQ ID 7) GTGAGAACTCGGATGATTATGAT

3'PTX (SEQ ID 8) TGAAACATACTGAGCTCCTCCAT

En un volumen final de 10 µl, los reactivos para la amplificación fueron: 1 µl de una colonia hervida (1 colonia en 50 ml de agua), 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 320 nM de cada cebador, 0,06 % de formamida, 1X del tampón suministrado y 0,08 u/µl de la polimerasa de ADN de Taq (de Sigma Genosys); perfil de temperaturas: 3 min. a 96°C, 30 veces (30 s a 94°C, 30 s a 58°C, 2 min. a 72°C), 5 min. a 72°C, enfriando a 4°C hasta el uso ulterior.

Unos plásmidos purificados a partir de unas colonias positivas para el escrutinio por PCR, se digirieron con la enzima de restricción Sall (de Roche Applied Science) con el fin de comprobar la orientación del inserto de hPTX3. Un plásmido con el modelo de restricción esperado (6.619 y 177 pb) se secuenció en las regiones que codifican el promotor de UbC, la casete de NeoR y la hPTX3 y se identificó como pSC1-PTX3.

El nuevo plásmido (pSC1-PTX3) se construyó luego con la secuencia de ADNc de PTX3 puesta bajo el control de un promotor de ubiquitina y con un gen de resistencia a neomicina puesto bajo el control del promotor de SV40. Todas las otras características y el mapa del plásmido se representan en la Figura 1.

La secuencia completa de pSC1-PTX3 es como sigue (SEQ ID 2). La secuencia de pSC1-hPTX3 se representa comenzando a partir del primer sitio de EcoRI (figura 5). La secuencia que se deriva del pSG5 que contiene el ADNc de PTX3 está subrayada. El codón de partida (ATG) y el codón de terminación están puestos en letra negra

pSC1-PTX3 (SEQ ID 2)

AATTCGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCTCAAACTCAGCTCACTTGAGAGTCTCCTCCCAGCTGTGGAA
 AGAACTTTGCGTCTCTCCAGCAATGCATCTCCTTGCGATTCTGTTTGTGCTCTCTGGTCTGCAGTGTGGCCGAGA
 ACTCGGATGATTATGATCTCATGTATGTGAATTGGACAACGAAATAGACAATGGACTCCATCCCACTGAGGACCCC
 ACGCCGTGCCGACTGCCGTCAGGAGCACTCGGAATGGGACAAGCTCTTCATCATGCTGGAGAACTCGCAGATGAGAGA
 GCGCATGCTGCTGCAAGCCACGGACGACGCTCCTGCGGGGCGAGCTGCAGAGGCTCGGGGAGGAGCTGGGCCGGCTCG
 CGGAAAGCCTGGCGAGGCCGTGCGCGCCGGGGCTCCCGCAGAGGCCAGGCTGACCAGTGCCTGGACGAGCTGCTG
 CAGGCGACCCGCGACGCGGGCCGAGGCTGGCGCGTATGGAGGGCGCGGAGGCGCAGCGCCAGAGGAGGCGGGGGCG
 CGCCCTGGCCGCGGTGCTAGAGGAGCTGCGCGCAGACGCGAGCCGACCTGCACGCGGTGCAGGGCTGGGCTGCCCGGA
 GCTGGCTGCCGCGAGGTTGTGAAAACAGCTATTTTATTCCAATGCCTTCCAAGAAGATTTTGGAAAGCGTGCATCCA
 GTGAGACCAATGAGGCTTGAGTCTTTAGTGCCTGCATTTGGGTCAAAGCCACAGATGTATTAACAAAACCATCCT

GTTTTCTATGGCACAAAGAGGAATCCATATGAAATCCAGCTGTATCTCAGCTACCAATCCATAGTGTGGTGG
GTGGAGAGGAGAACAACTGGTTGCTGAAGCCATGGTTTCCCTGGGAAGGTGGACCCACCTGTGCGGCACCTGGAA
TCAGAGGAAGGGCTCACATCCTTGTGGGTAAATGGTGAAC TGCGGGCTACCACTGTTGAGATGGCCACAGTCAAT
TGTTCCCTGAGGGAGGAATCCTGCAGATTGGCCAAGAAAAGAAATGGCTGCTGTGTGGTGGTGGCTTTGATGAAACAT
TAGCCTTCTCTGGGAGACTCACAGGCTTCAATATCTGGGATAGTGTCTTAGCAATGAAGAGATAAGAGAGACCGGA
GGAGCAGAGTCTTGTACATCCGGGGGAATATTGTGGTGGGGAGTCACAGAGATCCAGCCACATGGAGGAGCTCA
GTATGTTTCATAAAATGTTGTGAAACTCCACTTGAAGCCAAAGAAAGAAACTCACACTTAAACACATGCCAGTTGGG
AAGGTCGAAAACCTCAGTGCATAATAGGAACACTTGAGACTAATGAAAGAGAGAGTTGAGACCAATCTTATTTGTA
CTGGCCAAATACTGAATAAACAGTTGAAGGAAAGACATTGGAAAAAGCTTATCGATACCGTCCGACCTCGAGGGGGG
CCCGGGATCCAGATCTTATTAAGCAGAACTTGTATTATGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCA
CAAATTCACAAATAAAGCATTFTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCAT
GTCTGGTCGACTCTAGACTCTTCCGCTTCTCCGCTCAGTCTGACTCGCTGCGCTCGGTCTCGGCTCGGGCAGCGGT
ATCAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTCCCAGGCA
GGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGAAAGTCCCAGGCTCCCAGGACGAGC
AAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGTCCCAGGCTTACTCCGCCCCAAGTCCCAGGCTTACTC
CGCCAGTTCCGCCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGCCGAGGCCGCTCTGCC
TCTGAGCTATCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCAGGAGCTGTAT
ATCCATTTCCGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTCCGATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTT
CTCCGCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATCCGCGGTG
TTCCGCTGTGAGCGAGGGGCGCCGTTCTTTGTCAAGACCGACTTCCGCTCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CGAGGCAGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCTTCTTGGCAGCTGTGCTGACGTTGCTACTGAAGCGG
GAAGGGACTGGCTGCTATTGGCGAAGTCCCGGGCAGGATCTCCTGTATCTCACCTGCTCCTGCCGAGAAAGTA
TCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACA
TCGCATCGAGCGAGCAGTACTCGGATGGAAGCCGCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGG
TCGCGCCAGCCGAAGTTCGCGCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCCAGCGGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGA
GCCTGCTTGGCGAATATCATGGTGAATAATGGCGCTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGA
CCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGCTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCAATGGGCTGACCGCTTCTCG
TGCTTACGGTATCGCCGCTCCGATTCCGACGCGCATCGCTTCTATCGCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGA
CTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCAGGATTTCCGATTCCACCGCCGCTTCTAT
GAAAGTTTGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACCGCGCTGGATGATCCTCCAGCGGGGATCTCATGCTGGAGTT
CTTCGCCCACCCAACTTGTATTATGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCAAAATTTCAAAATA
AAGCATTFTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACATGTG
AGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTGTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTG
ACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCC
CTGGAAGCTCCCTCGTCCGCTCTCCTGTTCCGACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTTCCCTTCCGG
AAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGTTAGGTGCTGCTCCGTTCCGTTCCGTTCCG
TGACGAACCCCCGTTCCAGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAAACCGTAAAGCAC
GACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTT
GAAGTGGTGGCCTAACTACCGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTCG
GAAAAAGAGTTGGTAGCTCTGATCCGGCAAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAG
ATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCTTTGATCTTTCTACGGGCTGACGCTCAGTGAAGCAAAAA
CTCACGTTAAGGGATTTTGGTATGAGATTAATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATGAAATGAAAT
TTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCA
GCGATCTGTCTATTTCTGTTATCCATAGTTGCTGACTCCCCGCTGCTGATAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACC
ATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCAGCTCACCAGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAG
CCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTTGCGGGAAAGCT
AGAGTAAGTATTCGCCAGTTAATAGTTGCGCAAGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCT
GTTTGGTATGGCTTCACTCAGTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAG
CGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAAGTGGCGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCA
CTGCATAATCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGGTACTCAACCAAGTCACTCTG
AGAATAGTGTATGCGCGCAGGAGTTGCTCTTGGCCGGCTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTT
TAAAAGTGTCTCATCTTGAAGAACTCTTCCGGGGCAAAACTCTCAAGGATCTTACCAGTGTGAGATCCAGTTCCG
ATGTAACCCACTCGTGCACCAACTGATCTTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACG
AAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACAGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTTCAATATT
ATTGAAGCATTTATCAGGTTATTGCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGG
GTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCTAAGAAACCATTTATATCATGACATTAACCTATAAAAA
TAGGCTATCACGAGGCCCTTTCGCTCGCGCTTTCGGTATGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCG
GAGACGTTACAGCTTGTGTGAAGCGGATGCCGGAGCAGACAGCCGTCAGGCGCGTCCGCGGTGTAATCCCG
GTGTCCGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGAAATCCCG
ACAGATCGTAAAGGAGAAAATACCGCATCAGGAAATGTAACGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTT
GTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATA

GGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAAC
 CGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGATCTGGCCTCCGCGCCGGGTTTTGGCGCCCCCGGGGCGCCCCCTC
 CTCACGGCGAGCGTGCACAGTACAGCGAAGGGCGCAGCGAGCGTCTGATCCTTCCGCCCCGACGCTCAGGACAGC
 GGCCCGCTGCTCAATAAGACTCGGCCTTAGAACCCCAAGTATCAGCAGAAGGACATTTTAGGACGGGACTTGGGTGACT
 CTAGGGCACTGGTTTTCTTTCCAGAGAGCGGAACAGGGCAGGAAAAGTAGTCCCTTCTCGGCGATTCTGCGGAGGGA
 TCTCCGTGGGGCGGTGAACGCCGATGATTATATAAGGACGCGCCGGGTGTGGCACAGCTAGTTCGGTTCGACGCCGG
 ATTTGGGTTCGCGTCTTGTGTTGTGGATCGCTGTGATCGTCACTTGGTGAGTAGCGGGTGTGTTGGTTCGCGGGC
 TTTCGTGGCCGCCGGCCGCTCGGTGGGACGGAAGCGTGTGGAGAGACCGCAAGGGCTGTAGTCTGGGTCCGCGAG
 CAAGTTGCCCCGAACTGGGGGTGGGGGGAGCGCAGCAAAATGGCGGCTGTTCCCGAGTCTTGAATGGAAGACGCT
 TGTGAGGGCGGGTGTGAGGTCGTTGAAACAAGGTGGGGGGCATGGTGGGCGGCAAGAACCAAGTCTTGAGGCCCT
 GCCTAATGCGGAAAGCTTTATTCGGGTGAGATGGGCTGGGGCACCATCTGGGGACCCTGACGTGAAGTTTGTAC
 TGACTGGAGAACTCGGTTTGTGCTGCTGTTGCGGGGGCGGCAGTTATGGCGGTGCCGTTGGGCAGTGCACCCGTACCT
 TTGGGAGCGCGCCCTCGTGTGTCGTGACGTCACCCGTTCTGTTGGCTTATAATGCAGGGTGGGGCCACCTGCCG
 GTAGGTGTGCGGTAGGCTTTTCTCCGTCGCAGGACGCAGGGTTCGGGCCTAGGGTAGGCTCCTGAATCGACAGGC
 GCCGGACCTCTGGTGAGGGGAGGGATAAGTGAAGCGTCAGTTTCTTTGGTTCGGTTTTATGTACCTATCTTTAAGT
 AGCTGAAGCTCCGTTTTGAACTATGCGCTCGGGGTGGCGAGTGTGTTTTGTGAAGTTTTTAGGCACCTTTTGA
 ATGTAATCATTGGGTCAATATGTAATTTTCAGTGTAGACTAGTAAATTTGTCGGCTAAATTTGCGCCGTTTTTGGC
 TTTTTGTTAGACCGACCG

Un linaje de células humanas (HEK293F) ha sido escogido por su capacidad para crecer en una suspensión y en un medio exento de suero y proteínas (Florian M Wurm "Producción de agentes terapéuticos de proteínas recombinantes en células de mamífero cultivadas" Nature Biotechnology 22 (11): 1393-1398, 2004, Yan SC y colaboradores, "Caracterización y nueva purificación de la proteína C humana recombinante procedente de tres linajes de células de mamíferos" Biotechnology (N.Y.) 8 de Julio de 1990 (7) : 655-61. "Uso de unos linajes de células para la producción de vacunas del virus de la influenza, una apreciación de consideraciones técnicas, de producción y regulación" Initiative for Vaccine Research, World Health Organization [Iniciativa para la investigación de vacunas, Organización Mundial de la salud], Ginebra, Suiza (10 de Abril de 2007). Para transfectar el HEK293F, el plásmido pSC1-PTX3 se usó o bien en una forma lineal (digerida con PvuI) o en una forma circular. El mejor rendimiento de transfección se obtuvo con el plásmido linealizado; la selección de clones se hizo sobre la base de la productividad y de la capacidad de crecimiento. Después de varias rondas de subclonación se seleccionó el clon 2F12.

El clon humano 2F12, que expresa la hPTX3, ha sido depositado en la ECACC (European Collection of Cell Cultures, Health Protection Agency [Colección Europea de Cultivo de Células, Agencia de Protección de la Salud], Porton Down, Wiltshire SP4 0JG, Reino Unido) el 10 de Enero de 2008, de acuerdo con las condiciones del tratado de Budapest bajo el número de depósito 08011001. Los detalles experimentales se describen más abajo.

3.4 Células 293F recombinantes generadas a partir de pSC1-PTX3.

Transfección y subclonación

10⁶ células/ml de 293F (de Invitrogen nº de catálogo R790- 07) se sembraron en un matraz de centrifugación con una capacidad de 125 ml en un volumen final del medio Freestyle de 28 ml en el día de la transfección. El pSC1/PTX3 se dejó luego adsorberse en el reactivo 293fectin (de GIBCO/ Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Dicho brevemente, en dos tubos separados, 30 µg de pSC1-PTX3 circular o de PvuI linealizado se diluyeron en 1 ml de Optimem (de GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y 40 µl de 293fectin (de Invitrogen) diluido hasta 1 ml con Optimem. Ambas soluciones se incubaron durante 5 minutos a la temperatura ambiente, luego se mezclaron (con un volumen final de 2 ml) y se incubaron durante 30 minutos en las mismas condiciones. Un cóctel de ADN y un lípido se añadió a las células y se incubó a 37°C, con CO₂ al 5 % con agitación (120 rpm = revoluciones por minuto). Después de una cultivación durante 36 horas, el medio se cambió a un medio de selección (200 ml del medio Freestyle + 500 µg/ml de G418) y las células transfectadas se sembraron en diez placas de 96 pocillos, con una capacidad de 200 µl/pocillo. Después de 15 días, las agrupaciones de células productoras más altas se determinaron por un ELISA y se amplificaron en 24 pocillos, en 6 pocillos y en el matraz T25.

Las agrupaciones de células recombinantes obtenidas se subclonaron a razón de 1 célula por pocillo en placas de 96 pocillos en 50 % de un medio fresco (de nueva aportación) y 50 % de un medio acondicionado.

35

Ejemplo 2: clon MS24PTXConstrucción del plásmido pSASSI-hPTX31. Construcción de pCEPlight Δ

5 El plásmido pCEP4 (de Invitrogen nº de catálogo V044-50), en el que previamente se había clonado una cadena ligera de anticuerpo, que había perdido una porción del sitio de clonación múltiple y del sitio de restricción con BamHI, se cortó con las enzimas de restricción EcoRV y ClaI (de Roche Applied Science); la digestión permitió obtener un plásmido sin el origen de replicación del virus de Epstein-Barr (oriP) y el antígeno nuclear (codificado por el gen de EBNA-1) que permite una replicación extracromosomal. Los resultantes fragmentos tenían unas longitudes de 6.910 y 4.281 pb respectivamente. El fragmento de 6.910 pb, que contenía la estructura del pCEP, se purificó mediante una electroforesis en un gel más una columna de centrifugación con una membrana de sílice. Puesto que la ClaI genera un extremo cohesivo, el fragmento se rellenó, usando la polimerasa de ADN de T4 (de Roche Applied Science) con el siguiente protocolo: 150 ng del fragmento purificado de ClaI/EcoRV (38 μ l), 5 μ l de 10x tampón de la polimerasa de ADN de T4, 4 μ l de una mezcla de dNTP's 2,5 mM, 3 μ l de la polimerasa de ADN de T4 (1 U/ μ l). Después de 15 minutos a 37°C, la reacción se detuvo a 70°C durante 5 minutos y luego sobre hielo. El fragmento se purificó sobre una columna de centrifugación con una membrana de sílice y se ligó consigo mismo durante una noche a la temperatura ambiente, usando la ligasa de ADN de T4 (de Promega). Unas células competentes TOP10 (de Invitrogen) se transformaron con la mezcla de ligación y los transformantes se seleccionaron por el crecimiento sobre unas placas LB suplementadas con 100 mg/l de ampicilina.

El ADN plasmídico, aislado a partir de colonias resistentes a la ampicilina, se designó como pCEPlight Δ .

20 2. Preparación del fragmento de vector que contiene la resistencia a higromicina y el promotor de CMV.

La casete de resistencia a higromicina conjuntamente con el intensificador/promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) se tomo a partir del pCEPlight Δ amplificándolo por una PCR. Como una parte de la estrategia de clonación, la secuencia de reconocimiento para la endonucleasa de restricción BamHI se introdujo en el oligonucleótido reanillándolo con el extremo 3' del promotor de CMV.

25 La región amplificada con un tamaño de aproximadamente 5.500 pb, incluía el promotor de CMV, el gen de higromicina puesto bajo el control del promotor de TK, conjuntamente con la señal de PolyA de TK.

Los oligonucleótidos se designan de la siguiente manera:

oligo CMV (SEQ ID 9) 5'GAGAACTGTAACGTTGGATCCAGCTGG 3'
oligo H (SEQ ID 10) 5'GTGTACAAAGGATCCAGACATGATAAG 3'

30 El protocolo para la amplificación era el siguiente: 2 ng de pCEPlight Δ , 200 nM de cada cebador, 0,2 mM de dNTP's, 1X del tampón suministrado, 1,5 μ l de DMSO, 0,5 μ l de la polimerasa de ADN de Taq (de Phusion), volumen final 50 μ l; perfil de temperaturas: 1 min. a 98°C, 35 veces (10 s a 98°C, 30 s a 55°C, 3 min. a 72°C), 10 min. a 72°C, enfriando a 4°C hasta el uso ulterior.

35 El producto de la amplificación (con un tamaño de ~5.500 pb) se purificó mediante una electroforesis en un gel de agarosa más una columna de centrifugación con una membrana de sílice. El fragmento purificado se ligó consigo mismo y se usó para transformar unas células competentes TOP10 (de Invitrogen). El ADN plasmídico, aislado a partir de colonias resistentes a la ampicilina, se comprobó mediante un análisis por restricción y de la secuencia y se designó como pCEP Δ Bam.

3. Preparación del gen hPTX3

40 La secuencia de hPTX3 (número de acceso al GeneBank BD 131701) se tomó a partir de pSC1-PTX3 tal como se indica anteriormente mediante una digestión con BamHI (de Roche Applied Science). El fragmento de PTX3 humana (con un tamaño de 1.463 pb) se purificó mediante una electroforesis en un gel de agarosa y una columna de centrifugación con una membrana de sílice.

4. Preparación de pCEP Δ Bam-hPTX3

45 El vector pCEP Δ Bam se linealizó por digestión con BamHI y se purificó sobre una columna de centrifugación con una membrana de sílice. El pCEP Δ Bam linealizado y el fragmento de ADN correspondiente al gen de hPTX3 preparado en la etapa 3 se ligaron usando la ligasa de ADN de T4 (de Roche Applied Science) y se usaron para transformar una célula de E. coli TOP10. Los transformantes se seleccionaron por el crecimiento sobre un medio de LB, suplementado con 100 mg/l de ampicilina y se escrutaron preliminarmente mediante un análisis por restricción para evaluar la orientación del fragmento PTX3.

50

5. Preparación de la señal de poliadenilación de SV40

La señal de PolyA de SV40 se tomó a partir del plásmido pCEPΔlight amplificándolo por una PCR. Como una parte de la estrategia de clonación, las secuencias de reconocimiento para las endonucleasas de restricción HindIII y XhoI se introdujeron junto a los extremos de los fragmentos, respectivamente.

5 Los oligonucleótidos se designaron como sigue:

PCEPSVH (SEQ ID 11) 5'AAGCTTAGACATGATAAGATACATTG 3'
 PCEPSVX (SEQ ID 12) 5'CTCGAGAGTCGACCGGTCATGGCTGC 3'

10 El protocolo para la amplificación era el siguiente: 1 ng de pCEPΔlight, 200 nM de cada cebador, 0, 2 mM de dNTP's, 1X del tampón suministrado, 2 μl de MgCl₂ 50 mM, 0,5 μl de la polimerasa de ADN de Taq (de Invitrogen), volumen final 50 μl; perfil de temperaturas: 1 min. a 94°C, 30 veces (30 s a 94°C, 1 min. a 55°C, 1 min. a 72°C), 15 min. a 72°C, enfriando a 4°C hasta el uso ulterior.

El producto de la amplificación (~420 pb) se purificó mediante una electroforesis en un gel de agarosa más una columna de centrifugación con una membrana de sílice.

6. Preparación de pSASSI-hPTX3

15 Unos fragmentos purificados correspondientes a la señal de PolyA de SV40 y al pCEPABam-hPTX3, se digirieron con las enzimas de restricción HindIII/XhoI y se ligaron usando la ligasa de ADN de T4 (de Promega). La mezcla de ligación se usó para transformar unas células competentes TOP10 (de Invitrogen) y los transformantes se seleccionaron por el crecimiento sobre placas de LB que contenían 100 mg/l de ampicilina.

El ADN plasmídico aislado a partir de colonias resistentes a la ampicilina, se comprobó por un análisis por restricción y de las secuencias y el plásmido se designó como pSASSI-hPTX3.

20 La secuencia completa de pSASSI-HPTX3 es como sigue (SEQ ID 1). La secuencia de pSASSI-hPTX3 es representada comenzando a partir del sitio de BamHI (figura 1). La secuencia de hPTX3 está en letras minúsculas. El codón de partida (atg) y el codón de terminación (taa) están en letras negritas.

pSASSI-HPTX3 (SEQ ID 1).

```

GGATCCCCCG GGCTGCAGGA ATTCCGGCTC AAACCTCAGCT CACTTGAGAG TCTCCTCCCG      60
CCAGCTGTGG AAAGAACTTT GCGTCTCTCC AGCAATGCAT CTCCTTGCGA TTCTGTTTTG      120
TGCTCTCTGG TCTGCAGTGT TGGCCGAGAA CTCGGATGAT TATGATCTCA TGTATGTGAA      180
TTTGGACAAC GAAATAGACA ATGGACTCCA TCCCACTGAG GACCCACGC CGTGCGACTG      240
CGGTCAGGAG CACTCGGAAT GGGACAAGCT CTTCATCATG CTGGAGAACT CGCAGATGAG      300
AGAGCGCATG CTGCTGCAAG CCACGGACGA CGTCCTGCGG GGCGAGCTGC AGAGGCTGCG      360
GGAGGAGCTG GGCCGGCTCG CGGAAAGCCT GGCGAGGCCG TGCGCGCCGG GGGCTCCCGC      420
AGAGGCCAGG CTGACCAGTG CTCTGGACGA GCTGCTGCAG GCGACCCGCG ACGCGGGCCG      480
CAGGCTGGCG CGTATGGAGG GCGCGGAGGC GCAGCGCCA GAGGAGGCGG GGC GCGCCCT      540
GGCCGCGGTG CTAGAGGAGC TGCGGCAGAC GCGAGCCGAC CTGCACGCGG TGCAGGGCTG      600
GGCTGCCCGG AGCTGGCTGC CGGCAGGTTG TGAAACAGCT ATTTTATTCC CAATGCGTTC      660
CAAGAAGATT TTTGGAAGCG TGCATCCAGT GAGACCAATG AGGCTTGAGT CTTTTAGTGC      720
CTGCATTTGG GTCAAAGCCA CAGATGTATT AAACAAAACC ATCCTGTTTT CCTATGGCAC      780
AAAGAGGAAT CCATATGAAA TCCAGCTGTA TCTCAGCTAC CAATCCATAG TGTTTGTGGT      840
GGGTGGAGAG GAGAACAAC TGTTTGCTGA AGCCATGGTT TCCCTGGGAA GGTGGACCCA      900
CCTGTGCGGC ACCTGGAATT CAGAGGAAGG GCTCACATCC TTGTGGGTAA ATGGTGAAC      960
GGCGGCTACC ACTGTTGAGA TGGCCACAGG TCACATTGTT CCTGAGGGAG GAATCCTGCA      1020
GATTGGCCAA GAAAAGAATG GCTGCTGTGT GGGTGGTGGC TTTGATGAAA CATTAGCCTT      1080
CTCTGGGAGA CTCACAGGCT TCAATATCTG GGATAGTGTT CTTAGCAATG AAGAGATAAG      1140
AGAGACCGGA GGAGCAGAGT CTTGTCACAT CCGGGGGAAT ATTGTTGGGT GGGGAGTCAC      1200
    
```

ES 2 432 242 T3

AGAGATCCAG	CCACATGGAG	GAGCTCAGTA	TGTTTCATAA	ATGTTGTGAA	ACTCCACTTG	1260
AAGCCAAAGA	AAGAAACTCA	CACTTAAAAC	ACATGCCAGT	TGGGAAGGTC	TGAAAACCTCA	1320
GTGCATAATA	GGAACACTTG	AGACTAATGA	AAGAGAGAGT	TGAGACCAAT	CTTTATTTGT	1380
ACTGGCCAAA	TACTGAATAA	ACAGTTGAAG	GAAAGACATT	GGAAAAAGCT	TAGACATGAT	1440
AAGATACATT	GATGAGTTTG	GACAAACCAC	AACTAGAATG	CAGTGAAAAA	AATGCTTTAT	1500
TTGTGAAATT	TGTGATGCTA	TTGCTTTATT	TGTAACCATT	ATAAGCTGCA	ATAAACCAAGT	1560
TAACAACAAC	AATTGCATTC	ATTTTATGTT	TCAGGTTTCC	GGGGAGGTGT	GGGAGGTTTT	1620
TTAAAGCAAG	TAAAACCTCT	ACAAATGTGG	TATGGCTGAT	TATGATCCGG	CTGCCTCGCG	1680
CGTTTCGGTG	ATGACGGTGA	AAACCTCTGA	CACATGCAGC	TCCCGGAGAC	GGTCACAGCT	1740
TGTCTGTAAG	CGGATGCCGG	GAGCAGACAA	GCCCGTCAGG	GCGCGTCAGC	GGGTGTTGGC	1800
GGGTGTCGGG	GCGCAGCCAT	GACCGGTCGA	CTCTCGAGGG	GGGGCCCGGG	GATCCAACGT	1860
TACAGTTCTC	CAGTGCATGT	AATCCCTTCA	GTTGGTTGGT	ACAACTTGCC	AACTGGGCCC	1920
TGTTCCACAT	GTGACACGGG	GGGGGACCAA	ACACAAAGGG	GTTCTCTGAC	TGTAGTTGAC	1980
ATCCTTATAA	ATGGATGTGC	ACATTTGCCA	ACACTGAGTG	GCTTTCATCC	TGGAGCAGAC	2040
TTTGAGTCT	GTGGACTGCA	ACACAACATT	GCCTTTATGT	GTAACCTTG	GCTGAAGCTC	2100
TTACACCAAT	GCTGGGGGAC	ATGTACCTCC	CAGGGGCCCA	GGAAGACTAC	GGGAGGCTAC	2160
ACCAACGTCA	ATCAGAGGGG	CCTGTGTAGC	TACCGATAAG	CGGACCCTCA	AGAGGGCATT	2220
AGCAATAGTG	TTTATAAGGC	CCCCTTGTTA	ACCCTAAACG	GGTAGCATAT	GCTTCCCAGG	2280
TAGTAGTATA	TACTATCCAG	ACTAACCTTA	ATTCATAGC	ATATGTTACC	CAACGGGAAG	2340
CATATGCTAT	CGAATTAGGG	TTAGTAAAAG	GGTCCTAAGG	AACAGCGATC	GATGATAAGC	2400
TGTCAAACAT	GAGAATTCTT	GAAGACGAAA	GGGCCTCGTG	ATACGCCTAT	TTTTATAGGT	2460
TAATGTCATG	ATAATAATGG	TTCTTAGAC	GTCAGGTGGC	ACTTTTCGGG	GAAATGTGCG	2520
CGGAACCCCT	ATTTGTTTTAT	TTTTCTAAAT	ACATTCAAAT	ATGTATCCGC	TCATGAGACA	2580
ATAACCTGA	TAAATGCTTC	AATAATATTG	AAAAAGGAAG	AGTATGAGTA	TTCAACATTT	2640
CCGTGTCGCC	CTTATTCCTT	TTTTTGCGGC	ATTTTGCCTT	CCTGTTTTTG	CTCACCAGA	2700
AACGCTGGTG	AAAGTAAAAG	ATGCTGAAGA	TCAGTTGGGT	GCACGAGTGG	GTTACATCGA	2760
ACTGGATCTC	AACAGCGGTA	AGATCCTTGA	GAGTTTTTCGC	CCCGAAGAAC	GTTTTCCAAT	2820
GATGAGCACT	TTTAAAGTTC	TGCTATGTGG	CGCGGTATTA	TCCCGTGTTG	ACGCCGGGCA	2880
AGAGCAACTC	GGTCGCCGCA	TACACTATTC	TCAGAATGAC	TTGGTTGAGT	ACTCACCAGT	2940
CACAGAAAAG	CATCTTACGG	ATGGCATGAC	AGTAAGAGAA	TTATGCAGTG	CTGCCATAAC	3000
CATGAGTGAT	AACACTGCGG	CCAACTTACT	TCTGACAACG	ATCGGAGGAC	CGAAGGAGCT	3060
AACCGCTTTT	TTGCACAACA	TGGGGATCA	TGTAACTCGC	CTTGATCGTT	GGGAACCGGA	3120
GCTGAATGAA	GCCATACCAA	ACGACGAGCG	TGACACCACG	ATGCCTGCAG	CAATGGCAAC	3180
AACGTTGCGC	AAACTATTAA	CTGGCGAACT	ACTTACTCTA	GCTTCCCAGC	AACAATTAAT	3240
AGACTGGATG	GAGGCGGATA	AAGTTGCAGG	ACCACTTCTG	CGCTCGGCCC	TTCCGGCTGG	3300
CTGGTTTATT	GCTGATAAAT	CTGGAGCCGG	TGAGCGTGGG	TCTCGCGGTA	TCATTGCAGC	3360
ACTGGGGCCA	GATGGTAAGC	CCTCCCGTAT	CGTAGTTATC	TACACGACGG	GGAGTCAGGC	3420
AACTATGGAT	GAACGAAATA	GACAGATCGC	TGAGATAGGT	GCCTCACTGA	TTAAGCATTG	3480
GTAACGTGCA	GACCAAGTTT	ACTCATATAT	ACTTTAGATT	GATTTAAAAC	TTTATTTTAA	3540
ATTTAAAAGG	ATCTAGGTGA	AGATCCTTTT	TGATAATCTC	ATGACCAAAA	TCCCTTAACG	3600
TGAGTTTTCG	TTCCACTGAG	CGTCAGACCC	CGTAGAAAAG	ATCAAAGGAT	CTTCTTGAGA	3660

ES 2 432 242 T3

TCCTTTTTTT CTGCGCGTAA TCTGCTGCTT GCAAACAAAA AAACCACCGC TACCAGCGGT	3720
GGTTTGTGTTG CCGGATCAAG AGCTACCAAC TCTTTTTCCG AAGGTAAGT GCTTCAGCAG	3780
AGCGCAGATA CCAAATACTG TCCTTCTAGT GTAGCCGTAG TTAGGCCACC ACTTCAAGAA	3840
CTCTGTAGCA CCGCCTACAT ACCTCGCTCT GCTAATCTG TTACCAGTGG CTGCTGCCAG	3900
TGGCGATAAG TCGTGTCTTA CCGGGTTGGA CTCAAGACGA TAGTTACCGG ATAAGGCGCA	3960
GCGGTCGGGC TGAACGGGGG GTTCGTGCAC ACAGCCCAGC TTGGAGCGAA CGACCTACAC	4020
CGAACTGAGA TACCTACAGC GTGAGCTATG AGAAAGCGCC ACGCTTCCCG AAGGGAGAAA	4080
GGCGGACAGG TATCCGGTAA GCGGCAGGGT CGGAACAGGA GAGCGCACGA GGGAGCTTCC	4140
AGGGGGAAAC GCCTGGTATC TTTATAGTCC TGTCGGGTTT CGCCACCTCT GACTTGAGCG	4200
TCGATTTTTG TGATGCTCGT CAGGGGGGCG GAGCCTATGG AAAAAACGCCA GCAACGCGGC	4260
CTTTTTACGG TTCTTGGCCT TTTGCTGCGC CGCGTGCAGC TGCTGGAGAT GCGGCACGCG	4320
ATGGATATGT TCTGCCAAGG GTTGGTTTTG GCATTACAG TTCTCCGCAA GAATTGATTG	4380
GCTCCAATC TTGGAGTGGT GAATCCGTTA GCGAGGTGCC GCCGGCTTCC ATTCAGGTCG	4440
AGGTGGCCCG GCTCCATGCA CCGCGACGCA ACGCGGGGAG GCAGACAAGG TATAGGGCGG	4500
CGCCTACAAT CCATGCCAAC CCGTTCATG TGCTCGCCGA GCGGCATAA ATCGCCGTGA	4560
CGATCAGCGG TCCAGTGATC GAAGTTAGGC TGATAAGAGC CGCGAGCGAT CTTGAAGCT	4620
GTCCCTGATG GTCGTCTCT ACCTGCCTGG ACAGCATGGC CTGCAACGCG GGCATCCCGA	4680
TGCCGCCGGA AGCGAGAAGA ATCATAATGG GGAAGGCCAT CCAGCCTCGC GTCGCGAACG	4740
GCGAACGCCA GCAAGACGTA GCCCAGCGCG TCGGCCGCCA TGCCCTGCTT CATCCCCGTG	4800
GCCCCTTGCT CGCGTTTGCT GCGGGTGTCC CCGGAAGAAA TATATTTGCA TGCTTTTAGT	4860
TCTATGATGA CACAAACCCC GCCCAGCGTC TTGTCATTGG CGAATTCGAA CACGAGATG	4920
CAGTCGGGGC GCGCGGGTCC CAGGTCCACT TCGCATATTA AGGTGACGCG TGTGGCCTCG	4980
AACACCGAGC GACCCTGCAG CGACCCGCTT AACAGCGTCA ACAGCGTGCC GCAGATCCCG	5040
GGCAATGAGA TATGAAAAAG CCTGAACTCA CCGCGACGTC TGTCGAGAAG TTTCTGATCG	5100
AAAAGTTCGA CAGCGTCTCC GACCTGATGC AGCTCTCGGA GGGCGAAGAA TCTCGTGCTT	5160
TCAGCTTCGA TGTAGGAGGG CGTGGATATG TCCTGCGGGT AAATAGCTGC GCCGATGGTT	5220
TCTACAAAGA TCGTTATGTT TATCGGCACT TTGCATCGGC CGCGCTCCCG ATTCCGGAAG	5280
TGCTTGACAT TGGGGAATTC AGCGAGAGCC TGACCTATTG CATCTCCCGC CGTGCACAGG	5340
GTGTCACGTT GCAAGACCTG CCTGAAACCG AACTGCCCGC TGTTCTGCAG CCGGTCGCGG	5400
AGGCCATGGA TCGATCGCT GCGGCCGATC TTAGCCAGAC GAGCGGGTTC GGCCCATTCG	5460
GACCGAAGG AATCGGTCAA TACTACTACAT GCGGTGATTT CATATGCGCG ATTGCTGATC	5520
CCCATGTGTA TCACTGGCAA ACTGTGATGG ACGACACCGT CAGTGCCTCC GTCGCGCAGG	5580
CTCTCGATGA GCTGATGCTT TGGGCCGAGG ACTGCCCCGA AGTCCGGCAC CTCGTGCACG	5640
CGGATTTCCG CTCCAACAAT GTCCTGACGG ACAATGGCCG CATAACAGCG GTCATTGACT	5700
GGAGCGAGGC GATGTTCCGG GATTCCCAAT ACGAGTTCGC CAACATCTTC TTCTGGAGGC	5760
CGTGGTTGGC TTGTATGGAG CAGCAGACGC GCTACTTCGA GCGGAGGCAT CCGGAGCTTG	5820
CAGGATCGCC GCGGCTCCGG GCGTATATGC TCCGCATTGG TCTTGACCAA CTCTATCAGA	5880
GCTTGGTTGA CGGCAATTC GATGATGCAG CTTGGGCGCA GGGTCGATGC GACGCAATCG	5940
TCCGATCCGG AGCCGGGACT GTCGGGCGTA CACAAATCGC CCGCAGAAGC GCGGCCGTCT	6000
GGACCGATGG CTGTGTAGAA GACTCGCCG ATAGTGAAAA CCGACGCCCC AGCACTCGTC	6060
CGAGGGCAAA GGAATAGGGG AGATGGGGGA GGCTAACTGA AACACGGAAG GAGACAATAC	6120

CGGAAGGAAC CCGCGCTATG ACGGCAATAA AAAGACAGAA TAAAACGCAC GGGTGTGGG	6180
TCGTTTGTTT ATAAACGCGG GGTTTCGGTCC CAGGGCTGGC ACTCTGTCGA TACCCCACCG	6240
AGACCCCATT GGGGCCAATA CGCCCGCGTT TCTTCCTTTT CCCCACCCCA CCCCCAAGT	6300
TCGGGTGAAG GCCCAGGGCT CGCAGCCAAC GTCGGGGCGG CAGGCCCTGC CATAGCCACT	6360
GGCCCCGTGG GTTAGGGACG GGGTCCCCCA TGGGGAATGG TTTATGGTTC GTGGGGGTTA	6420
TTATTTTGGG CGTTGCGTGG GGTCGGTCC ACGACTGGAC TGAGCAGACA GACCCATGGT	6480
TTTTGGATGG CCTGGGCATG GACCGCATGT ACTGGCGCGA CACGAACACC GGGCGTCTGT	6540
GGCTGCCAAA CACCCCCGAC CCCCAAAAC CACCGCGCGG ATTTCTGGCG TGCCAAGCTA	6600
GTCGACCAAT TCTCATGTTT GACAGCTTAT CATCGCAGAT CCGGGCAACG TTGTTGCCAT	6660
TGCTGCAGGC GCAGAACTGG TAGGTATGGA AGATCTATAC ATTGAATCAA TATTGGCAAT	6720
TAGCCATATT AGTCATTGGT TATATAGCAT AAATCAATAT TGGCTATTGG CCATTGCATA	6780
CGTTGTATCT ATATCATAAT ATGTACATTT ATATTGGCTC ATGTCCAATA TGACCCCCAT	6840
GTTGACATTG ATTATTGACT AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA	6900
GCCCATATAT GGAGTTCCGC GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCCCCT GGCTGACCGC	6960
CCAACGACCC CCGCCCATTG ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG	7020
GGACTTTCCA TTGACGTCAA TGGGTGGAGT ATTTACGGTA AACTGCCCAC TTGGCAGTAC	7080
ATCAAGTGTA TCATATGCCA AGTCCGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCC	7140
CCTGGCATTG TGCCCAGTAC ATGACCTTAC GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG	7200
TATTAGTCAT CGCTATTACC ATGGTGATGC GGTTTTGGCA GTACACCAAT GGGCGTGGAT	7260
AGCGGTTTGA CTCACGGGGA TTTCCAAGTC TCCACCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT	7320
TTTGGCACCA AAATCAACGG GACTTTCCAA AATGTCGTAA TAACCCCGCC CCGTTGACGC	7380
AAATGGGCGG TAGGCGTGTA CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTCGT TTAGTGAACC	7440
GTCAGATCTC TAGAAGCTGG GTACCAGCT	7469

Ejemplo 3

Clon MS24PTX recombinante generado por transfección de pSASSI-hPTX3

1. Transfección y subclonación

5 10⁶ células/ml de 293F/PTX3/2F12 se sembraron en un matraz de centrifugación con una capacidad de 125 ml en un volumen de 28 ml del medio Freestyle final en el día de la transfección. El plásmido pSASSI-hPTX3 se dejó luego adsorberse en el reactivo 293fectin (de GIBCO/Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

10 Dicho brevemente, 30 µg del pSASSI-hPTX3 Nrul linealizado se diluyeron en 1 ml de Optimem GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y 40 µl de 293fectin (de Invitrogen) diluido hasta 1 ml con Optimem. Ambas soluciones se incubaron durante 5 minutos a la temperatura ambiente y luego se mezclaron (con un volumen final de 2 ml) y se incubaron durante 30 minutos en las mismas condiciones. Un cóctel de ADN y un lípido se añadió a las células y se incubó a 37°C, con CO₂ al 5 % con agitación (120 rpm). Después de una cultivación durante 36 horas, el medio se cambió a un medio de selección (200 ml del medio Freestyle + 200 µg/ml de higromicina) y las células transfectadas se sembraron en placas de 96 pocillos, a razón de 200 µl/pocillo. Después de 15 días las agrupaciones de células productoras más altas se determinaron por un ELISA y se amplificaron en 24 pocillos, en 6 pocillos y en el matraz T25.

15 Las agrupaciones de células recombinantes se subclonaron con una 1 célula por pocillo en placas de 96 pocillos, en 50 % de un medio fresco y 50 % de un medio acondicionado.

2. Detección por un ELISA de la hPTX3 recombinante

20 La PTX3 purificada o la PTX3 secretada en el material sobrenadante de cultivo se valoraron usando un ELISA en emparedado. Para detectar la PTX3, unas placas de microtitulación Nunc Maxisorb de 96 pocillos (de Nunc, Roskilde, Dinamarca) se revistieron durante una noche, a 4°C, con 700 ng/ml del anticuerpo monoclonal de rata

MNB4 anti-PTX3 humana (de Alexis™ Biochemicals, Lausen, Suiza) en 15 mM de un tampón de carbonato de sodio, de pH 9,6. Los pocillos se lavaron con una PBS (acrónimo de Phosphate Buffered Saline = solución salina tamponada con fosfato) más 0,05 % de Tween-20 (PBS-Tw, solución de lavado) y se bloquearon con 300 µl de PBS-Tw que contenían 5 % de leche seca, durante 2 horas a la temperatura ambiente.

- 5 Los materiales sobrenadantes de células o la PTX3 humana recombinante purificada se añadieron a los pocillos, se diluyeron en una solución de lavado más 1 % de un BSA. Una curva patrón, establecida con una PTX3 humana recombinante purificada procedente de células CHO, que variaba entre 0 y 100 ng/ml, se estableció por cuantificación. Después de una incubación durante 1 hora a 37°C, se detectó la PTX3 fijada usando un anticuerpo anti-PTX3 de conejo policlonal conjugado con biotina, seguido por una incubación con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano rústico (de Sigma-Aldrich, EE.UU.). Finalmente se añadió ácido 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico (de Sigma Chemical Co. EE.UU.) para el revelado del color y se determinó la densidad óptica a 405 nm usando un lector de microplacas modelo 3550 EIA (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.).

Ejemplo 4

Comparación del crecimiento, de la viabilidad y de la productividad de los clones 293F/PTX3/2F12 y MS24PTX

- 15 Unas células que se derivaban de los dos clones se sembraron con una densidad de 1.000.000 de células/ml (viabilidad ≥ 90 %) en 500 ml en un medio FreeStyle 293 en unos matraces de centrifugación con una capacidad de 1 litro. El crecimiento, la viabilidad y la productividad se vigilaron durante aproximadamente 1 semana hasta que las células comenzaron a morir.

- 20 La Figura 2 muestra el crecimiento, la viabilidad y la productividad de los clones MS24PTX (panel A) y 293F/PTX3/2F12 (panel B) en las mismas condiciones de siembra y crecimiento. Como se muestra en la figura, con la transfección renovada del clon 293F/PTX3/2F12 que expresa la PTX3 con un nuevo plásmido en el que la PTX3 está puesta bajo el control del promotor de CMV (clon MS24PTX), los autores fueron capaces de obtener un aumento aproximadamente 4 veces mayor en la productividad de PTX3.

Ejemplo 5

- 25 Purificación de la PTX3 humana recombinante a partir del clon MS24PTX

- El material sobrenadante de cultivo procedente del clon MS24PTX, que había crecido en un matraz de centrifugación, se cargó sobre una columna empaquetada con Q-Sepharose™ Fast Flow (de GE Healthcare, Reino Unido). El material retenido se eluyó usando un gradiente no lineal. La fracción que contenía la PTX3 se aplicó directamente a una columna empaquetada con hidroxipatito cerámico (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.). El material retenido se eluyó aumentando la concentración de fosfato de una manera no lineal. La fracción que contenía la PTX3 se concentró y se cambió de tampón sobre una membrana de ultrafiltración (Pellicon-Biomax 100, Millipore) y luego se caracterizó por una cromatografía de exclusión por tamaños sobre Biosep SEC S4000 (de Phenomenex) y por una SDS-PAGE (Figura 3).

Ejemplo 6

- 35 Fijación de h-PTX3 a FGF2

- La fijación de una hPTX3 recombinante purificada a la FGF2 se comprobó en un sistema de ELISA. Una placa de 96 pocillos (Falcon 3912) se revistió con 2 µg/ml de FGF2 (de Calbiochem) en una PBS y se incubó durante una noche a 4°C. Los pocillos se lavaron con una PBS más 0,1 % de Triton X-100 (PBS-Tr, solución de lavado) y se bloquearon con 200 µl de PBS-Tr que contenía 3 % de un BSA (bloqueo de PBS-B y una solución diluyente) durante 2 horas a la temperatura ambiente. Después de haber lavado, la fijación se realizó añadiendo 100 µl de unas muestras, diluidas en PBS-B en unas concentraciones de la PTX3 que variaban entre 0 y 120 ng/ml, e incubando la placa a 37°C durante 1 hora. Después de un lavado, las placas se incubaron con 100 µl/pocillo de 100 ng/ml de un anticuerpo policlonal anti-PTX3 de conejo (durante 1 hora a 37°C), se lavaron de nuevo y se incubaron con 100 µl de IgG anti-conejo de cabra marcada con peroxidasa de rábano rústico (1:1.000 en un PBS-B; 1 hora a 37°C).
- 45 Después de haber lavado se añadieron 100 µl de un substrato cromogénico de 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina (TMB) (de Sigma-Aldrich) y después de 10-15 min, la reacción se detuvo añadiendo 100 µl de HCl 1 M y la absorbencia se determinó usando un lector de microplacas Microplate Reader Modelo 3550 EIA (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) (Figura 4).

ES 2 432 242 T3

Listado de Secuencias

<110> TECNOGEN SpA SASSANO, Marica ESPOSITO, Adelaide RIVIECCIO, Vincenzo CASSANI, Giovanni

5 <120> IMPROVED HUMAN LONG PENTRAXIN 3 EXPRESSION SYSTEM AND USES THEREOF

<130> PCT 109660

<150> EP09 166 759.2

10 <151> 29-07-2009

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

15

<210> 1

<211> 7469

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> plásmido recombinante pSASSI-HPTX3

<400> 1

25

```

ggatcccccg ggctgcagga attccggctc aaactcagct cacttgagag tctcctcccg      60
ccagctgtgg aaagaacttt gcgctctctcc agcaatgcat ctccttgcca ttctgttttg      120
tgctctctgg tctgcagtgt tggccgagaa ctcggatgat tatgatctca tgtatgtgaa      180
tttgacaac gaaatagaca atggactcca tcccactgag gacccacgc cgtgcgactg      240
cggctcaggag cactcggaat gggacaagct cttcatcatg ctggagaact cgcagatgag      300
agagcgcgatg ctgctgcaag ccacggacga cgtcctgcgg ggcgagctgc agaggctgcg      360
ggaggagctg ggccggctcg cggaaagcct ggcgaggccg tgcgcgccgg gggctcccgc      420
agaggccagg ctgaccagtg ctctggacga gctgctgcag gcgacccgcg acgcgggccg      480
caggctggcg cgtatggagg gcgcggaggg cagcgcacca gaggaggcgg ggcgcgcctt      540
ggccgcggtg ctagaggagc tgcggcagac gcgagccgac ctgcacgcgg tgcagggctg      600
ggctgcccgg agctggctgc cggcaggttg tgaaacagct attttattcc caatgcgttc      660
caagaagatt tttggaagcg tgcattccagt gagaccaatg aggcttgagt cttttagtgc      720
ctgcatttgg gtcaaagcca cagatgtatt aaacaaaacc atcctgtttt cctatggcac      780
aaagaggaaat ccatatgaaa tccagctgta tctcagctac caatccatag tgtttgtggt      840
gggtggagag gagaacaaac tggttgctga agccatggtt tccctgggaa ggtggacca      900
cctgtgcggc acctggaatt cagaggaagg gctcacatcc ttgtgggtaa atggtgaact      960
ggcggctacc actgttgaga tgccacaggg tcacattggt cctgaggggag gaatcctgca     1020
gattggccaa gaaaagaatg gctgctgtgt ggggtggggc ttgatgaaa cattagcctt     1080
ctctgggaga ctacaggct tcaatatctg ggatagtgtt cttagcaatg aagagataag     1140
agagaccgga ggagcagagt cttgtcacat ccgggggaat attggtgggt ggggagtcac     1200

```

ES 2 432 242 T3

agagatccag ccacatggag gagctcagta tgtttcataa atgttgtgaa actccacttg	1260
aagccaaaga aagaaactca cacttaaaac acatgccagt tgggaaggtc tgaaaactca	1320
gtgcataata ggaacacttg agactaatga aagagagagt tgagaccaat ctttatttgt	1380
actggccaaa tactgaataa acagttgaag gaaagacatt ggaaaaagct tagacatgat	1440
aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa aatgctttat	1500
ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt	1560
taacaacaac aattgcattc attttatgtt tcaggttcag ggggagggtg gggaggtttt	1620
ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg tatggctgat tatgatccgg ctgcctcgcg	1680
cgtttcggtg atgacggtga aaacctctga cacatgcagc tcccggagac ggtcacagct	1740
tgtctgtaag cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg gcgcgtcagc ggggtgtggc	1800
gggtgtcggg gcgcagccat gaccggtcga ctctcagggg ggggcccggg gatccaacgt	1860
tacagttctc cagtgcattg aatcccctca gttggttggg acaacttgcc aactgggccc	1920
tgttccacat gtgacacggg gggggaccaa acacaaaggg gttctctgac tgtagttgac	1980
atccttataa atggatgtgc acatttgcca aactgagtg gctttcatcc tggagcagac	2040
tttgcagtct gtggactgca acacaacatt gcctttatgt gtaactcttg gctgaagctc	2100
ttacaccaat gctgggggac atgtacctcc caggggcccc ggaagactac gggaggctac	2160
accaacgtca atcagagggg cctgtgtagc taccgataag cggaccctca agagggcatt	2220
agcaatagtg tttataaggc ccccttgtta accctaaacg ggtagcatat gcttcccggg	2280
tagtagtata tactatccag actaacccta attcaatagc atatgttacc caacgggaag	2340
catatgctat cgaattaggg ttagtaaaag ggtcctaagg aacagcgatc gatgataagc	2400
tgtcaaacat gagaattctt gaagacgaaa gggcctcgtg atacgcctat ttttataggt	2460
taatgtcatg ataataatgg tttcttagac gtcaggtggc acttttcggg gaaatgtgcg	2520
cggaaccctt atttgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca	2580
ataaccctga taaatgctt aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt	2640
ccgtgtgcgc cttattccct tttttgcggc attttgctt cctgtttttg ctcaaccaga	2700
aacgctggtg aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg gttacatcga	2760
actggatctc aacagcggta agatccttga gagttttcgc cccgaagaac gttttccaat	2820
gatgagcact tttaaagttc tgctatgtgg cgcggtatta tcccgtgttg acgccgggca	2880
agagcaactc ggtcgccgca tacactattc tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt	2940
cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac	3000
catgagtgat aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct	3060
aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt ggaaccgga	3120
gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgcag caatggcaac	3180
aacgttgcgc aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttcccggc aacaattaat	3240
agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc ttccggctgg	3300

ES 2 432 242 T3

ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta tcattgcagc 3360
actggggcca gatggttaagc cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc 3420
aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg 3480
gtaactgtca gaccaagttt actcatatat acttttagatt gatttaaaac ttcattttta 3540
atntaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgacaaaaa tcccttaacg 3600
tgagttttcg ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaaag atcaaaggat cttcttgaga 3660
tccttttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcgg 3720
ggtttggttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag 3780
agcgcagata ccaaatactg tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa 3840
ctctgtagca ccgctacat acctcgcctc gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag 3900
tggcgataag tcgtgtctta ccgggttggg ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca 3960
gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac 4020
cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgc acgcttcccg aaggagagaa 4080
ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggg cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc 4140
agggggaaac gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg 4200
tcgatttttg tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc 4260
ctttttacgg ttcttgccct tttgctgcgc cgcgtcggc tgctggagat ggcggacgcg 4320
atggatatgt tctgccaagg gttggtttgc gcattcacag ttctccgcaa gaattgattg 4380
gctccaattc ttggagtggg gaatccgta gcgaggtgcc gccggcttcc attcaggtcg 4440
aggtggcccc gctccatgca ccgcgacgca acgcggggag gcagacaagg tatagggcgg 4500
cgcctacaat ccatgccaac ccgttccatg tgctcggcga ggcggcataa atcgccgtga 4560
cgatcagcgg tccagtgatc gaagttaggc tggtaaagac cgcgagcgat ccttgaagct 4620
gtccctgatg gtcgtcatct acctgcctgg acagcatggc ctgcaacgcg ggcattcccga 4680
tgccgccgga agcgagaaga atcataatgg ggaaggccat ccagcctcgc gtcggaacg 4740
gcgaacgcca gcaagacgta gccagcgcg tcggccgcca tgccctgctt catccccgtg 4800
gcccgttgct cgcgtttgct ggcggtgtcc ccggaagaaa tatatttgca tgtcttagt 4860
tctatgatga cacaacccc gccagcgtc ttgtcattgg cgaattcgaa cacgcagatg 4920
cagtcggggc ggcgcggtcc caggtccact tcgcatatta aggtgacgcg tgtggcctcg 4980
aacaccgagc gaccctgcag cgacccgctt aacagcgtca acagcgtgcc gcagatcccg 5040
ggcaatgaga tatgaaaaag cctgaactca ccgcgacgtc tgtcgagaag tttctgatcg 5100
aaaagttcga cagcgtctcc gacctgatgc agctctcgga gggcgaagaa tctcgtgctt 5160
tcagcttcga tgtaggaggg cgtggatagc tcctcggggt aaatagctgc gccgatgggt 5220
tctacaaaga tcgttatggt tatcggcact ttgcatcggc cgcgctcccg attccggaag 5280
tgcttgacat tggggaattc agcgagagcc tgacctattg catctcccgc cgtgcacagg 5340

ES 2 432 242 T3

gtgtcacgtt gcaagacctg cctgaaaccg aactgcccgc tgttctgcag ccggtcgcgg 5400
 aggccatgga tgcgatcgct gcggccgatc ttagccagac gagcgggttc ggcccattcg 5460
 gaccgcaagg aatcgggtcaa tacaactacat ggcgtgattt catatgcgcg attgctgatc 5520
 cccatgtgta tcaactggcaa actgtgatgg acgacaccgt cagtgcgtcc gtcgcgcagg 5580
 ctctcgatga gctgatgctt tgggccgagg actgccccga agtccggcac ctctgtcacg 5640
 cggatttcgg ctccaacaat gtcctgacgg acaatggccg cataacagcg gtcattgact 5700
 ggagcgaggc gatgttcggg gattcccaat acgaggtcgc caacatcttc ttctggaggc 5760
 cgtgggttggc ttgtatggag cagcagacgc gctacttcga gcggaggcat ccggagcttg 5820
 caggatcgcc gcggctccgg gcgtatatgc tccgattgg tcttgaccaa ctctatcaga 5880
 gcttggttga cggcaatttc gatgatgcag cttgggcgca gggtcgatgc gacgcaatcg 5940
 tccgatccgg agccgggact gtcgggcgta cacaaatcgc ccgcagaagc gcggccgtct 6000
 ggaccgatgg ctgtgtagaa gtactcgcgg atagtggaaa ccgacgcccc agcactcgtc 6060
 cgagggcaaa ggaatagggg agatggggga ggctaactga aacacggaag gagacaatac 6120
 cggaaagAAC ccgcgctatg acggcaataa aaagacagaa taaaacgcac ggggtgttggg 6180
 tcgtttgttc ataaacgcgg ggttcgggtcc cagggctggc actctgtcga taccaccg 6240
 agacccatt ggggccaata cgcgcggtt tcttcctttt cccacccca ccccccaagt 6300
 tcgggtgaag gcccagggct cgcagccaac gtcggggcgg caggccctgc catagccact 6360
 ggccccgtgg gttagggacg ggttccccca tggggaatgg tttatggttc gtgggggtta 6420
 ttattttggg cgttgctggtt ggtctggtcc acgactggac tgagcagaca gaccatggt 6480
 ttttggatgg cctgggcatg gaccgcatgt actggcgcga cacgaacacc gggcgtctgt 6540
 ggctgcaaaa cacccccac ccccaaaaac caccgcgcgg atttctggcg tgccaagcta 6600
 gtcgaccaat tctcatgttt gacagcttat catcgcagat ccgggcaacg ttgttgccat 6660
 tgctgcaggc gcagaactgg taggtatgga agatctatac attgaatcaa tattggcaat 6720
 tagccatatt agtcattggt tatatagcat aatcaatat tggctattgg ccattgcata 6780
 cgttgtatct atatcataat atgtacattt atattggctc atgtccaata tgaccgcat 6840
 gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata 6900
 gccatataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggccccctt ggctgaccgc 6960
 ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 7020
 ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac 7080
 atcaagtgta tcatatgcca agtccgcccc ctattgacgt caatgacggt aatggccccg 7140
 cctggcatta tgcccagtac atgaccttac gggactttcc tacttggcag tacatctacg 7200
 tattagtcat cgctattacc atggtgatgc ggttttggca gtacaccaat gggcgtggat 7260
 agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt 7320
 tttggacca aatcaacgg gactttcaa aatgtcgtaa taaccccgcc ccgttgacgc 7380
 aatgggcgg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc 7440

 gtcagatctc tagaagctgg gtaccagct 7469

- 5 <210> 2
- <211> 6796
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

10 <220>

ES 2 432 242 T3

<223> plásmido recombinante pSC1-PTX3

<400> 2

aattcggatc	ccccgggctg	caggaattcc	ggctcaaact	cagctcactt	gagagtctcc	60	
tcccgccagc	tgtggaaaga	actttgcgtc	tctccagcaa	tgcattctct	tgcgattctg	120	
ttttgtgctc	tctggctctg	agtgttgcc	gagaactcgg	atgattatga	tctcatgtat	180	
gtgaatttgg	acaacgaaat	agacaatgga	ctccatccca	ctgaggaccc	cacgccgtgc	240	
gactgcggtc	aggagcactc	ggaatgggac	aagctcttca	tcatgctgga	gaactcgag	300	
atgagagagc	gcatgctgct	gcaagccacg	gacgacgtcc	tgcggggcga	gctgcagagg	360	
ctgcgggagg	agctgggccg	gctcgcggaa	agcctggcga	ggccgtgcgc	gccgggggct	420	
cccgcagagg	ccaggctgac	cagtgtctctg	gacgagctgc	tgcaggcgac	ccgcgacgcg	480	
ggccgcaggc	tggcgcgtat	ggagggcgcg	gaggcgcagc	gcccagagga	ggcggggcgc	540	
gccctggccg	cggtgctaga	ggagctgcgg	cagacgcgag	ccgacctgca	cgcggtgcag	600	
ggctgggctg	cccggagctg	gctgccggca	ggtgtgaaa	cagctatttt	attcccaatg	660	
cgttccaaga	agatttttgg	aagcgtgcat	ccagtgcgac	caatgaggct	tgagtctttt	720	
agtgcctgca	tttgggtcaa	agccacagat	gtattaaaca	aaaccatcct	gttttcctat	780	
ggcaciaaaga	ggaatccata	tgaaatccag	ctgtatctca	gctaccaatc	catagtgttt	840	
gtggtgggtg	gagaggagaa	caactgggtt	gctgaagcca	tggtttcctt	gggaagggtg	900	
accacactgt	gcgccacctg	gaattcagag	gaagggtcca	catccttgtg	ggtaaatggt	960	
gaactggcgg	ctaccactgt	tgagatggcc	acaggtcaca	ttgttcctga	gggaggaatc	1020	
ctgcagattg	gccaagaaaa	gaatggctgc	tgtgtgggtg	gtggctttga	tgaaacatta	1080	
gccttctctg	ggagactcac	aggcttcaat	atctgggata	gtgttccttag	caatgaagag	1140	
ataagagaga	ccggaggagc	agagtcttgt	cacatccggg	ggaatattgt	tgggtgggga	1200	
gtcacagaga	tccagccaca	tggaggagct	cagtatgttt	cataaatgtt	gtgaaactcc	1260	
acttgaagcc	aaagaaagaa	actcacactt	aaaacacatg	ccagttggga	aggtctgaaa	1320	
actcagtgca	taataggaac	acttgagact	aatgaaagag	agagttgaga	ccaatcttta	1380	
tttgtactgg	ccaaatactg	aataaacagt	tgaaggaaag	acattggaaa	aagcttatcg	1440	
ataccgtcga	cctcgagggg	gggcccgggg	atccagatct	tattaaagca	gaacttgttt	1500	
attgcagctt	ataatggtta	caaataaagc	aatagcatca	caaatttcac	aaataaagca	1560	
tttttttcac	tgcattctag	ttgtggtttg	tccaaactca	tcaatgtatc	ttatcatgtc	1620	
5	tggtcgactc	tagactcttc	cgcttcctcg	ctcactgact	cgctgcgctc	ggtcgttcgg	1680

ES 2 432 242 T3

ctgcggcgag cggtatcagc tcaactcaaag gcggtaatac ggttatccac agaatcaggg	1740
gataacgcag gaaagaacat gtccccaggc aggcagaagt atgcaaagca tgcatctcaa	1800
ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggcctccca gcaggcagaa gtatgcaaag	1860
catgcatctc aattagtcag caacatagc cccgccccta actccgcca tcccgccct	1920
aactccgcc agttccgcc attctccgcc ccatggctga ctaattttt ttatttatgc	1980
agaggccgag gccgctctg cctctgagc attccagaag tagtgaggag gcttttttg	2040
aggcctaggc ttttgcaaaa agctcccggg agcttgata tccattttcg gatctgatca	2100
agagacagga tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc	2160
ggccgcttg gtgagagggc tattcggtc tgactgggca caacagaca tcggctgctc	2220
tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcga gggcgcccc gttcttttg tcaagaccga	2280
cctgtccggt gccctgaatg aactgcagga cgaggcagc cggtatcgt ggctggccac	2340
gacgggcgtt ctttgcgag ctgtgctcga cgttgcact gaagcgggaa gggactggct	2400
gctattgggc gaagtgccg ggcaggatct cctgtcatct caccttgctc ctgccgagaa	2460
agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatac cttgatccgg ctacctgcc	2520
atcgaccac caagcgaac atcgcatcga gcgagcacgt actcggatgg aagccggctc	2580
tgatgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc	2640
caggctcaag gcgcgatgc ccgacggcga ggatctcgtc gtgacccatg gcgatgcctg	2700
cttgccgaat atcatggtg aaaatggccg ctttctgga ttcacgact gtggccggct	2760
gggtgtggcg gacctatc aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct	2820
tggcggcga tgggctgacc gcttctcgt gctttacgg atcgcgctc ccgattcga	2880
gcgcatgcc ttctatgcc ttcttgacga gttcttctga gcgggactct ggggttcgaa	2940
atgaccgacc aagcagcgc caacctgcca tcacgagatt tcgattccac cgccgcctc	3000
tatgaaagg tgggcttcg aatcgtttc cgggacgcc gctggatgat cctccagcgc	3060
gggatctca tgctggagtt cttcgccac ccaacttgt ttattgcagc ttataatggt	3120
tacaaataa gcaatagcat cacaaattc acaataaag ctttttttc actgcattct	3180
agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctgtataca tgtgagcaa	3240
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggcgcggtg ctggcgttt tccataggct	3300
ccgccccct gacgagcgc acaaaaatc agctcaagt cagaggaggc gaaaccgac	3360
aggactataa agataccagg cgtttcccc tggagctcc ctcgtgcgct ctctgttcc	3420
gaccctgcc cttaccgat acctgtccgc ctttctcct tcgggaagcg tggcgcttc	3480
tcaatgctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg	3540
tgtgcacgaa cccccgtc agcccagccg ctgccccta tccgtaact atcgtcttga	3600
gtccaaccg gtaagacacg acttatcgc actggcagca gccactggta acaggattag	3660
cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggggccta actacggcta	3720
cactagaag acagtattt gtatctgccc tctgctgaag ccagttacct tcgaaaaag	3780

ES 2 432 242 T3

agttggtagc tcttgatccg gcaaaacaaac caccgctggt agcggtggtt tttttgtttg 3840
 caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac 3900
 ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttgggtca tgagattatc 3960
 aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag 4020
 tatatatgag taaacttggt ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc 4080
 agcgatctgt ctatttcggt catccatagt tgcctgactc cccgctcgtgt agataactac 4140
 gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgagcag acccacgctc 4200
 accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg 4260
 tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag 4320
 tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tggtgccatt gctacaggca tcgtggtgtc 4380
 acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac 4440
 atgatcccc atgttggtgca aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag 4500
 aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca gcaactgcata attctcttac 4560
 tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag tactcaacca agtcattctg 4620
 agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc 4680
 gccacatagc agaactttaa aagtgctcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact 4740
 ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg 4800
 atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa 4860
 tgccgcaaaa aaggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac tcttctttt 4920
 tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg 4980
 tatttagaaa aataaaciaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga 5040
 cgtctaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc 5100
 ctttctgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccgg 5160
 agacggtcac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccgt cagggcgcgt 5220
 cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc ggcatcagag cagattgtac 5280
 tgagagtgca ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca 5340
 tcaggaaatt gtaaactgta atattttgtt aaaattcgcg ttaaattttt gttaaatcag 5400
 ctcatTTTTT aaccaatagg ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa aagaatagac 5460
 cgagataggg ttgagtgttg ttccagtttg gaacaagagt ccactattaa agaactgga 5520
 ctccaacgct aaagggcgaa aaaccgtcta tcagggcgat ggccactac gtgatctggc 5580
 ctccgcgccg ggttttggcg cccccgcgg gcgccccct cctcacggcg agcgtgcca 5640
 cgtcagacga agggcgacg gagcgtcctg atccttccgc ccggacgctc aggacagcgg 5700
 cccgctgctc ataagactcg gccttagaac cccagtatca gcagaaggac attttaggac 5760
 gggacttggg tgactctagg gcaactggtt tctttccaga gagcgggaaca ggcgaggaaa 5820

ES 2 432 242 T3

agtagtcctt tctcggcgat tctgcgagg gatctccgtg gggcggtgaa cgccgatgat 5880
 tatataagga cgcgccgggt gtggcacagc tagttccgtc gcagccggga tttgggtcgc 5940
 ggttcttggt tgtggatcgc tgtgatcgtc acttgggtgag tagcgggctg ctgggctggc 6000
 cggggctttc gtggccgccg ggccgctcgg tgggacggaa gcgtgtggag agaccgcaa 6060
 gggctgtagt ctgggtccgc gagcaaggtt gccctgaact gggggttggg gggagcgcag 6120
 caaatggcg gctgttcccg agtcttgaat ggaagacgct tgtgaggcgg gctgtgaggt 6180
 cgttgaaaca agtgggggg catggtgggc ggcaagaacc caaggtcttg aggccttcgc 6240
 taatgcggga aagctcttat tcgggtgaga tgggctgggg caccatctgg ggaccctgac 6300
 gtgaagtttg tcaactgactg gagaactcgg tttgtcgtct gttgcggggg cggcagttat 6360
 ggcggtgccg ttgggcagtg caccctgacc tttgggagcg cgcgccctcg tcgtgtcgtg 6420
 acgtcaccgg ttctgttggc ttataatgca gggtggggcc acctgccggt aggtgtgcgg 6480
 taggcttttc tccgtcgcag gacgcagggt tcgggcctag ggtaggctct cctgaatcga 6540
 caggcggcgg acctctgggt aggggagggg taagtgaggc gtcagtttct ttggtcgggt 6600
 ttatgtacct atcttcttaa gtagctgaag ctccggtttt gaactatgcg ctcgggggtg 6660
 gcgagtgtgt tttgtgaagt tttttaggca cttttgaaa tgtaatcatt tgggtcaata 6720
 tgtaattttc agtgttagac tagtaaattg tccgctaaat tctggccggt tttggctttt 6780
 ttgtagacc ggaccg 6796

5 <210> 3
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> cebador sintético

<400> 3

atatcacgtg atctggcctc cgcgcc 26

15 <210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> cebador sintético

<400> 4

25 ggaattcggg cgggtctaac aaa 23

30 <210> 5
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador sintético

<400> 5

atatacatgt cccaggcag gcagaa 26

ES 2 432 242 T3

<210> 6
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 6
 10 atatacatgt atacagacat gataag 26
 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> cebador sintético
 20
 <400> 7
 gtgagaactc ggatgattat gat 23
 25 <210> 8
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 8
 35 tgaacatac tgagctcctc cat 23
 <210> 9
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> cebador sintético
 45 <400> 9
 gagaactgta acgttgatc cagctgg 27
 <210> 10
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> cebador sintético
 55 <400> 10
 gtgtacaaag gatccagaca tgataag 27
 60 <210> 11
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

ES 2 432 242 T3

<223> cebador sintético

<400> 11

5 aagcttagac atgataagat acattg 26

<210> 12

<211> 26

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

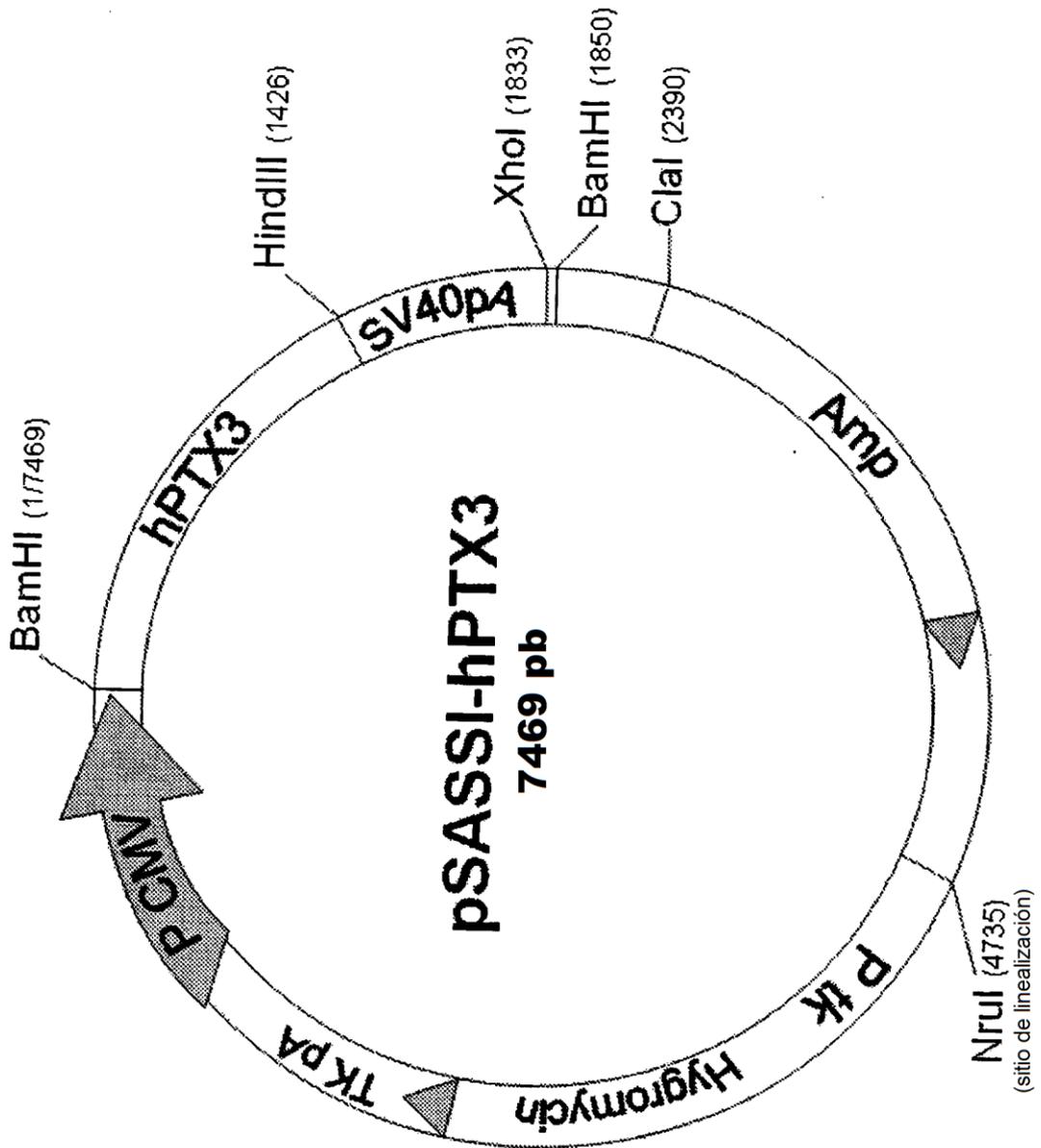
<223> cebador sintético

15 <400> 12

ctcgagagtc gaccggcat ggctgc 26

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un vector de expresión eucariótico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína pentraxina PTX3 larga humana puesta bajo el control de un promotor efectivo y de una secuencia de nucleótidos que codifica un marcador seleccionable, que tiene esencialmente la secuencia de SEQ ID 1, para transformar una célula anfitriona humana recombinante que ya es capaz de expresar la proteína pentraxina PTX3 larga humana, en donde dicha célula anfitriona humana recombinante es el clon 293F/PTX3/2F12 recombinante depositado en la ECACC con el nº 08011001.
2. El uso del vector de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el vector está linealizado.
- 10 3. Una célula humana recombinante transformada que es capaz de expresar la proteína pentraxina PTX3 larga humana, que es el clon 293F/PTX3/2F12 depositado en la ECACC con el nº 08011001 transformado ulteriormente por uso del vector de acuerdo con la reivindicación 1.
4. La célula humana recombinante transformada de acuerdo con la reivindicación 3, que es el clon MS24PTX recombinante depositado en la Health Protection Agency, Culture Collections Centre For Emergency Preparedness and Response Salisbury, Reino Unido, con el nº 09072902.
- 15 5. Uso de la célula humana recombinante transformada de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4 para la producción de la proteína pentraxina PTX3 larga humana.
6. Un procedimiento para la producción de la proteína pentraxina PTX3 larga humana que comprende
 - 20 a) transfectar una célula humana recombinante que ya expresa la proteína pentraxina PTX3 larga humana recombinante, con un plásmido en el que el gen de la pentraxina larga humana está puesto bajo el control del promotor de CMV;
 - b) seleccionar y cultivar la célula humana recombinante transfectada;
 - c) purificar la proteína pentraxina PTX3 larga humana a partir del medio de cultivo de la célula humana recombinante transfectada,
- 25 en donde la célula humana recombinante que ya expresa la proteína pentraxina PTX3 larga humana recombinante es el clon 293F/PTX3/2F12 recombinante depositado en la ECACC bajo el nº 08011001.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la célula humana recombinante transfectada es el clon MS24PTX depositado en la Health Protection Agency, Culture Collections Centre For Emergency Preparedness and Response Salisbury, Reino Unido, con el nº 09072902.
- 30 8. El procedimiento de la reivindicación 6 ó 7, en el que la etapa de purificación incluye por lo menos una de las siguientes etapas: cromatografía con intercambio aniónico, cromatografía con hidroxipatito o cromatografía de exclusión por tamaños.



Características	Posiciones de nucleótidos
hPTX3 ORF	95-1240
señal polyA de SV-40	1426-1833
Resistencia a ampicilina (Amp)	2390-4278
promotor de TK	4785-5027
gen de higromicina	5028-6079
señal polyA de TK	6080-6448
promotor de CMV	6610-7469

Fig. 1

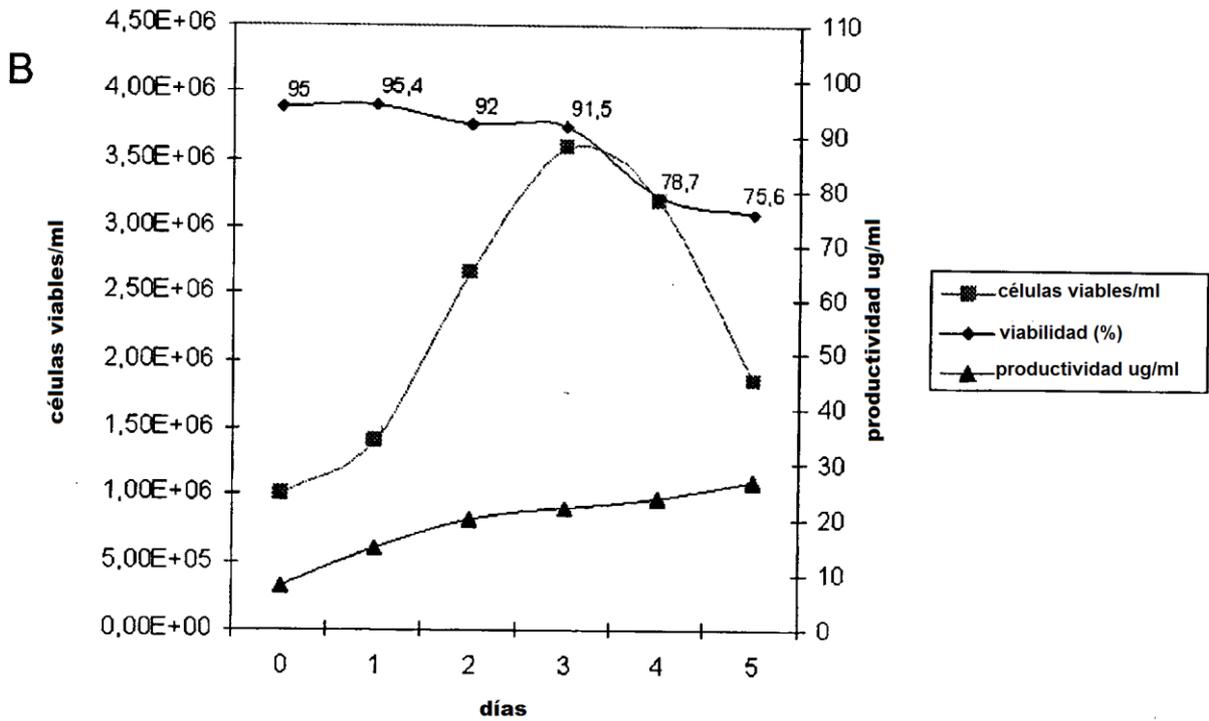
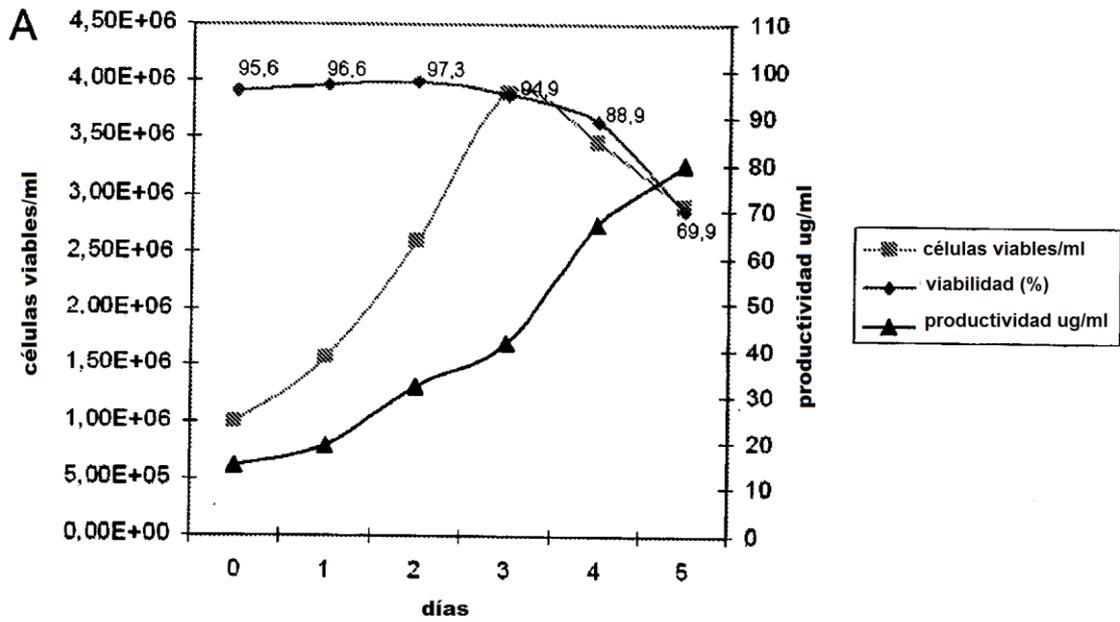


Fig. 2

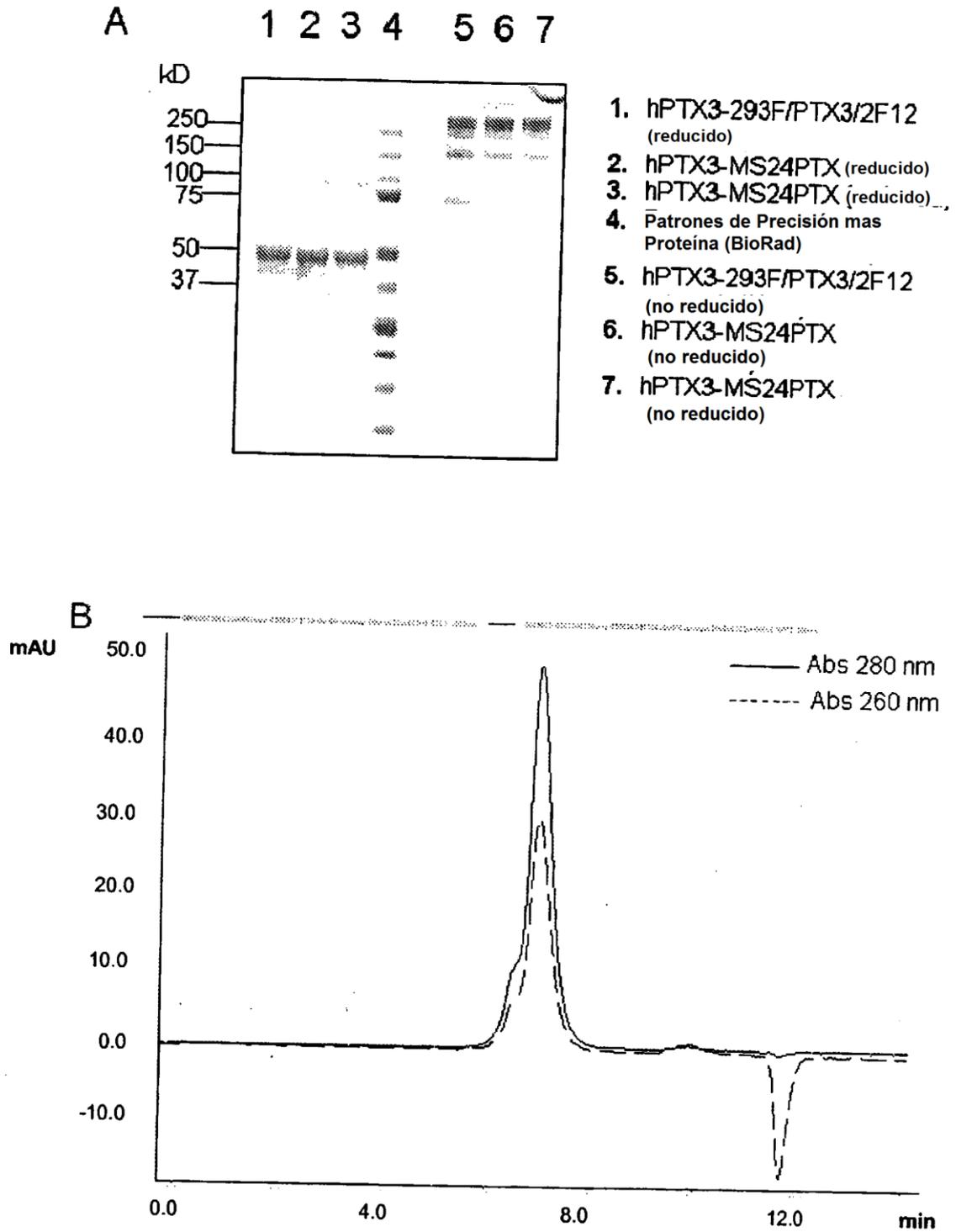


Fig. 3

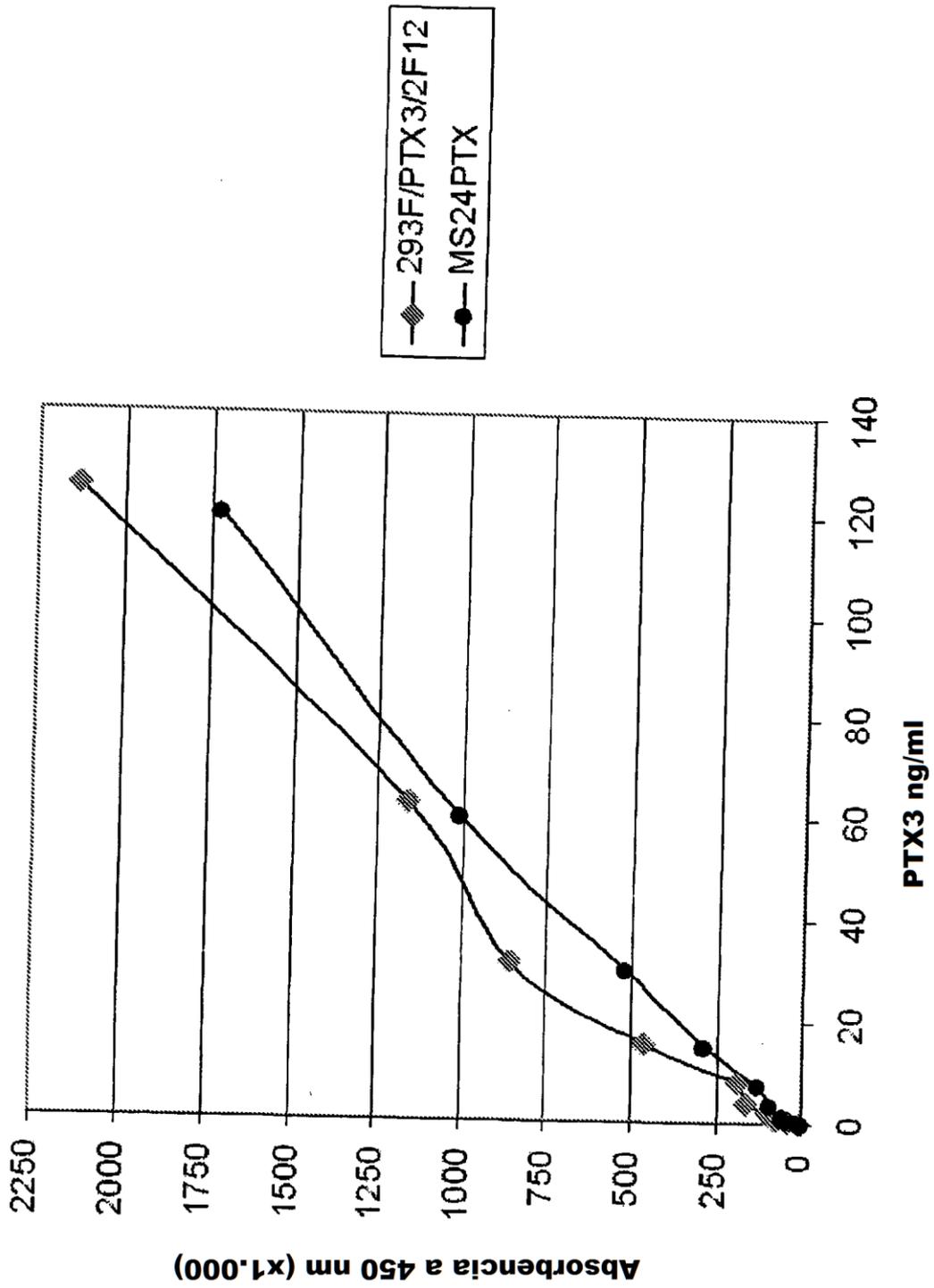
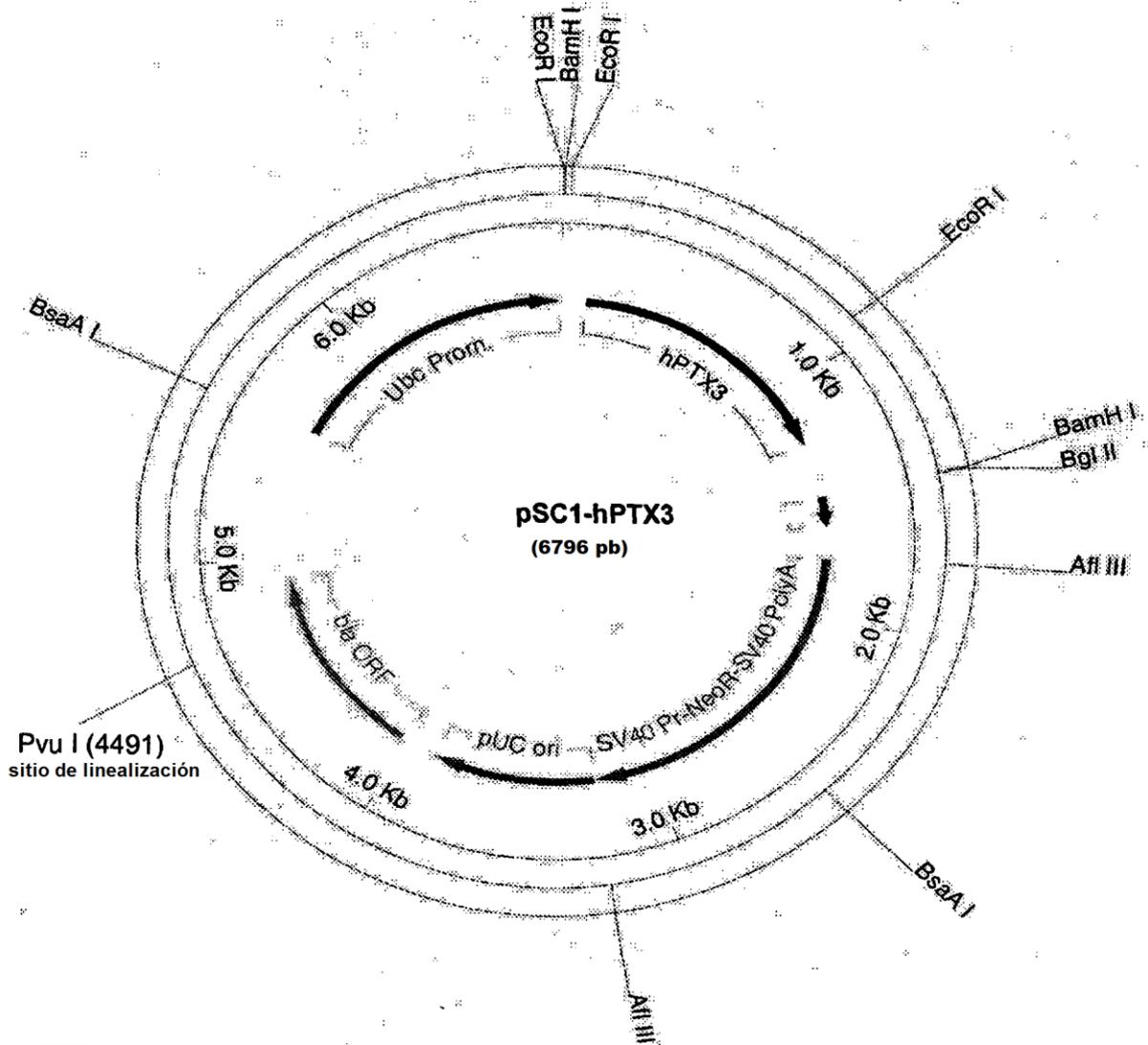


Fig. 4



Características	Posiciones de nucleótidos
ORF de hPTX3	100-1245
Bgl II	1475
señal de PolyA de SV40	1489-1622
promotor y origen de replicación de SV40	1765-2090
ORF de Neo	2126-2907
señal de PolyA de SV40	3095-3225
pUC origen de replicación	3233-3899
ORF de resistencia a ampicilina	4051-4908
promotor de ubiquitina C(Ubc) humana	5578-6787

Fig. 5