

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 170**

51 Int. Cl.:

G01N 33/579 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2012 PCT/JP2012/055728**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2012 WO12118226**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2012 E 12710808 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2681564**

54 Título: **Agente para la medición de endotoxinas**

30 Prioridad:

28.02.2011 US 201161447556 P

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

17.01.2018

73 Titular/es:

**SEIKAGAKU CORPORATION (100.0%)
6-1, Marunouchi 1-chome
Chiyoda-kuTokyo 100-0005, JP**

72 Inventor/es:

**MIZUMURA, HIKARU;
AIZAWA, MAKI y
ODA, TOSHIO**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 650 170 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

Agente para la medición de endotoxinas

5 **Sector de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un agente de medición de endotoxinas.

10 **Antecedentes de la invención**

15 La endotoxina es un lipopolisacárido existente en la membrana externa de la pared celular de bacterias gram-negativas y conocido por ser un pirógeno fuerte. Además, se sabe que incluso una pequeña cantidad de endotoxina provoca diferentes estados de enfermedad debido a una infección bacteriana, tal como la liberación de citocinas inflamatorias debido a la activación de los macrófagos y la inducción del choque de endotoxinas, además de fiebre. Por lo tanto, es importante la detección de endotoxinas en productos farmacéuticos, tales como los inyectables; agua; equipos médicos y demás. Además, la endotoxina está considerada como la principal causa de shock en infección de bacterias gram-negativas y, por lo tanto, se puede juzgar la presencia o ausencia de infección o un efecto farmacéutico mediante la medición de endotoxinas en la sangre.

20 Además, se sabe que infección de cangrejo de herradura americano (*Limulus polyphemus*) con bacterias gram-negativas produce la coagulación intravascular, y este fenómeno se ha utilizado para la detección de endotoxinas.

25 Es decir, es conocido un procedimiento para la medición de endotoxinas que utiliza un extracto de células sanguíneas de un cangrejo de herradura (lisado de amebocitos del cangrejo de herradura; a continuación, denominado también "lisado") (por ejemplo, documento no de patente 1). Este procedimiento se denomina "prueba de limulus" y utiliza una reacción en cascada de diferentes proteínas existentes en el lisado, reacción que está provocada por el contacto de la endotoxina con el lisado. En la figura 1 se muestra un diagrama esquemático de la reacción en cascada.

30 Al entrar en contacto la endotoxina con el lisado, el factor C existente en el lisado se activa para producir factor C de tipo activo. Este factor C de tipo activo activa el factor B existente en el lisado, para producir el factor B de tipo activo. Este factor B de tipo activo activa posteriormente un enzima procoagulante existente en el lisado, para producir una coagulación enzimática.

35 Este enzima coagulante hidroliza una parte específica de la molécula de coagulógeno existente en el lisado. Por esto, se produce gel de coagulina, para provocar la coagulación del lisado. De este modo, midiendo la reacción de coagulación del lisado, se puede medir la endotoxina.

40 Además, permitiendo además que una enzima coagulante reaccione con un sustrato sintético para provocar una reacción de color, la endotoxina se puede medir. Por ejemplo, un enzima coagulante reacciona con un sustrato sintético t-butoxicarbonil-leucil-glicil-arginil-pNA (Boc-Leu-Gly-Arg-pNA) para hidrolizar su enlace amida, y de este modo, liberar pNA. De este modo, incluyendo de manera preliminar el sustrato sintético en el sistema de reacción, la endotoxina puede ser cuantificada mediante la medida de la absorbancia (405 nm) de la sustancia colorante (pNA).

45 Además, se sabe que el sistema de reacción en cascada se puede reconstruir utilizando el factor C, el factor B y un enzima procoagulante, que se purificaron a partir de lisado de un cangrejo de herradura japonés (documento no de patente 2).

50 Además, se conoce un caso en el que un factor C recombinante derivado de un cangrejo de herradura del sudeste asiático *Carcinoscorpius rotundicauda*; y un factor B recombinante y un enzima procoagulante recombinante derivados de un cangrejo de herradura japonés *Tachypleus tridentatus* se utilizaron para reconstruir el sistema de reacción en cascada (documento de patente 1).

55 Además, es conocido un sistema para detectar endotoxinas mediante la utilización de un factor C recombinante derivado de un cangrejo de herradura del sudeste asiático *Carcinoscorpius rotundicauda* y un sustrato que reacciona con el factor C de tipo activo para liberar una sustancia fluorescente (documento de patente 2). Este sistema está disponible comercialmente como un sistema de detección de endotoxinas (nombre comercial: PyroGene (marca registrada); Lonza).

60 Sin embargo, para poder utilizar el lisado o el factor C, factor B o el enzima procoagulante de origen natural, preparados a partir de los mismos, es necesario capturar cangrejos de herradura y recoger la sangre de los mismos. Por lo tanto, en vista de la conservación de recursos biológicos o similares, es difícil suministrar estos componentes ilimitadamente. Por lo tanto, se ha demandado una técnica para producir fácil y rápidamente un reactivo para la detección de endotoxinas a un bajo coste.

65

Además, en los casos en los que se utiliza un factor C recombinante, un factor B recombinante y un enzima procoagulante recombinante, en cualquiera de los casos descritos anteriormente se requiere 1 hora o más para la medición, y no se ha conseguido una sensibilidad de detección en el orden de 0,001 UE/ml. Por lo tanto, se ha demandado una técnica para medir endotoxinas de manera altamente sensible y rápidamente.

5 DOCUMENTOS DE LOS ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

Documentos de patente

10 [Documento de patente 1] WO 2008/004674
[Documento de patente 2] US 6.849.426 B

Documentos no de patente.

15 [Documento no de patente 1] Iwanaga S., Curr Opin Immunol. Feb de 1993; 5(1): 74-82.
[Documento no de patente 2] Nakamura T. y otros, Biochem J. Mar de 1986; 99(3): 847-57.

Características de la invención

20 La presente invención tiene como objetivo dar a conocer un procedimiento para producir un agente de medición de endotoxinas que pueda medir endotoxinas de manera rápida y altamente sensible.

25 Los inventores de la presente invención han descubierto que la endotoxina se puede medir de manera rápida y altamente sensible utilizando un factor C recombinante (sin marcador His), un factor B recombinante y un enzima procoagulante recombinante, que se derivan de cangrejo de herradura japonés *Tachypleus tridentatus* y se expresan utilizando células de insectos como un huésped, completando de este modo la presente invención.

Es decir, la presente invención es tal como sigue.

30 [1] Un procedimiento para producir un agente de medición de endotoxinas, que comprende las siguientes proteínas (1) a (3) de *Tachypleus tridentatus*, cada una de ellas es una proteína recombinante que no tiene una secuencia de marcador His en el extremo C-terminal o cualquier otro péptido en cualquier extremo terminal, y se obtienen a partir de células de insectos como un huésped:

- 35 (1) factor C que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No.: 2;
(2) factor B que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No.: 4; y
(3) enzima procoagulante que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No.: 6,

comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas (A) a (E):

40 (A) una etapa de incorporar cada uno de los siguientes ADN (1) a (3) de *Tachypleus tridentatus* en un ADN viral;

- 45 (1) ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.: 2;
(2) ADN codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.: 4; y
(3) ADN codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.: 6;

(B) una etapa de infectar células de insectos con los virus en los que se ha incorporado cada uno de dichos ADN;

50 (C) una etapa de permitir que las células de insecto infectadas con cada uno de dichos virus expresen la proteína codificada por cada uno de dichos ADN;

(D) una etapa de recuperar el factor C, el factor B y el enzima procoagulante como una solución y eliminar los virus mediante una membrana de filtración de fibras huecas con un tamaño de poro de 500 kDa; y

55 (E) una etapa de formular el agente de medición de endotoxinas.

[2] Un procedimiento para producir a un agente de medición de endotoxinas que comprende las siguientes proteínas (1) a (3) de *Tachypleus tridentatus*, cada una de ellas es una proteína recombinante que no tiene una secuencia de marcador His en el extremo C-terminal o cualquier otro péptido en cualquier extremo terminal, y se obtienen a partir de células de insectos como un huésped:

- 60 (1) factor C que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No.: 2;
(2) factor B que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No.: 4; y
(3) enzima procoagulante que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No.: 6,

65 comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas (A) a (E):

(A) una etapa de incorporar cada uno de los siguientes ADN (1) a (3) de *Tachypleus tridentatus* en un vector;

- (1) ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.: 2;
- (2) ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.: 4; y
- (3) ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.: 6;

(B) una etapa de introducir el vector, en el que se ha incorporado cada uno de dichos ADN, en células de insectos para incorporar cada uno de dichos ADN en el cromosoma de las células de insecto;

(C) una etapa de permitir que las células de insecto, en el que se ha incorporado cada uno de dichos ADN, expresen la proteína codificada por cada uno de dichos ADN;

(D) una etapa de recuperar el factor C, el factor B y el enzima procoagulante como una solución; y

(E) una etapa de formular el agente de medición de endotoxinas.

Mediante la presente invención, se puede medir endotoxinas de manera rápida y altamente sensible. Por ejemplo, en una realización de la presente invención, se consigue una sensibilidad de detección en el orden de 0,0005 UE/ml con sólo 30 minutos de medición. Además, en la presente invención, el factor C recombinante, el factor B recombinante y el enzima procoagulante recombinante expresados pueden utilizarse sin purificación y, por lo tanto, un agente de medición de endotoxinas que comprende estas proteínas recombinantes se puede producir de manera sencilla y rápida a un coste bajo.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

[Figura 1] La figura 1 es un diagrama que muestra el sistema de reacción en cascada en un ensayo de limulus.

[Figura 2] La figura 2 es un diagrama que muestra la estructura del vector pIZ/V5-His y la posición de inserción de cada uno de los genes. La flecha en la parte superior indica la posición de inserción de los genes.

[Figura 3] La figura 3 es una fotografía que muestra los niveles de expresión de varios factores C.

[Figura 4] La figura 4 es un diagrama que muestra las actividades de varios factores C.

[Figura 5] La figura 5 es una fotografía que muestra la estabilidad del factor C expresado mediante el procedimiento viral.

[Figura 6] La figura 6 es una fotografía que muestra la estabilidad del factor C expresado mediante el procedimiento celular de expresión estable.

[Figura 7] La figura 7 es un diagrama que muestra el efecto del tratamiento por filtración de membrana de fibras huecas en las reactividades de los factores expresados mediante el procedimiento viral.

[Figura 8] La figura 8 es un diagrama que muestra la reactividad del agente de medición de endotoxinas que contiene los factores expresados mediante el procedimiento viral.

[Figura 9] La figura 9 es un diagrama que muestra la reactividad del agente de medición de endotoxinas que contiene los factores expresados mediante el procedimiento de línea celular de expresión estable. (a) La reactividad en la concentración de endotoxina de 0 a 0,1 UE/ml. (b) La reactividad en la concentración de endotoxina de 0 a 0,01 UE/ml.

[Figura 10] La figura 10 es una fotografía que muestra las purezas y concentraciones del factor C recombinante purificado y el factor C natural purificado.

[Figura 11] La figura 11 es una curva de calibración que muestra una relación entre intensidades de banda y la cantidad de BSA.

[Figura 12] La figura 12 es un diagrama que muestra las actividades del factor C recombinante purificado y el factor C natural purificado.

Descripción

En la presente memoria descriptiva, una serie de reacciones en las que la endotoxina activa el factor C para producir el factor C de tipo activo, el factor C de tipo activo activa el factor B para producir el factor B de tipo activo y el factor B de tipo activo activa un enzima procoagulante para producir una coagulación enzimática puede ser denominada "reacción en cascada".

(1) Agente de medición de endotoxinas

El agente de medición de endotoxinas se compone del factor C, el factor B y un enzima procoagulante. A continuación, el factor C, el factor B y el enzima procoagulante en el agente de medición de endotoxinas pueden ser denominados "factor C de la presente memoria descriptiva", "factor B de la presente memoria descriptiva" y "enzima procoagulante de la presente memoria descriptiva", respectivamente. Además, el factor C, el factor B y el enzima procoagulante pueden ser denominados colectivamente "factores".

Todo el factor C de la presente memoria descriptiva, el factor B de la presente memoria descriptiva, y el enzima procoagulante de la presente memoria descriptiva son proteínas recombinantes que se pueden obtener por su expresión utilizando células de insectos como un huésped.

El factor C de la presente memoria descriptiva es un factor de C derivado de un cangrejo de herradura japonés *Tachypleus tridentatus*. El factor C de la presente memoria descriptiva se caracteriza por que no tiene un marcador His enlazado en el extremo C-terminal. Además, el factor C de la presente memoria descriptiva preferentemente no tiene un marcador V5 en el extremo C-terminal. De forma más preferente, además, el factor C de la presente memoria descriptiva no tiene ningún péptido unido en el extremo C-terminal. De forma especialmente preferente, además, el factor C de la presente memoria descriptiva no tiene ningún péptido enlazado en cualquier extremo terminal. Una secuencia de aminoácidos del factor C de *Tachypleus tridentatus* se muestra en la SEQ ID No.: 2. Una secuencia de nucleótido del gen que codifica el factor C de *Tachypleus tridentatus* se muestra en la SEQ ID No.: 1.

El factor C de la presente memoria descriptiva puede ser una variante de la proteína con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No.: 2, siempre y cuando la variante tenga la actividad del factor C.

"La actividad del factor C" significa una actividad por la que el factor C se convierte en el factor C de tipo activo en presencia de endotoxinas, para activar el factor B. El hecho de que el factor C de la presente memoria descriptiva "tenga la actividad de factor C" puede ser confirmado, por ejemplo, utilizando el factor C de la presente memoria descriptiva en combinación con un factor B adecuado y un enzima procoagulante adecuado y detectando el avance de la reacción en cascada en la presencia de endotoxinas. Más concretamente, se puede utilizar la proteína de la SEQ ID No.: 4 como el factor B adecuado, y se puede utilizar la proteína de la SEQ ID No.: 6 como el enzima procoagulante adecuado. El avance de la reacción en cascada puede medirse utilizando el sustrato mencionado más adelante para la detección.

El factor C de la presente memoria descriptiva puede ser una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No.: 2, pero que incluye sustitución, eliminación, inserción o adición de uno o varios residuos de aminoácidos, siempre y cuando el factor C tenga la actividad del factor C. El significado del término "uno o varios" varía dependiendo de las posiciones de los residuos de aminoácido en la estructura tridimensional de la proteína y los tipos de residuos de aminoácido y, más particularmente, el término significa preferentemente de 1 a 20, más preferentemente de 1 a 10, aún más preferentemente de 1 a 5, de forma especialmente preferente, de 1 a 3. La sustitución, eliminación, inserción o adición de uno o varios aminoácidos descrita anteriormente, es una mutación conservadora que mantiene la función normal de la proteína. Un ejemplo representativo de la mutación conservadora es una sustitución conservadora. La sustitución conservadora es, por ejemplo, una mutación en la que una sustitución tiene lugar mutuamente entre Phe, Trp y Tyr, si el sitio de sustitución es un aminoácido aromático; entre Leu, Ile y Val, si el sitio de sustitución es un aminoácido hidrofóbico; entre Gln y Asn, si el sitio de sustitución es un aminoácido polar; entre Lys, Arg e His, si el sitio de sustitución es un aminoácido básico; entre Asp y Glu, si el sitio de sustitución es un aminoácido ácido y entre Ser y Thr, si en el sitio de sustitución hay un aminoácido con un grupo hidroxilo. Entre los ejemplos de sustituciones consideradas como sustituciones conservadoras se incluyen, específicamente, sustitución de Ser o Thr por Ala, sustitución de Gln, His o Lys por Arg, sustitución del Glu, Gln, Lys, His o Asp por Asn, sustitución de Asn, Glu o Gln por Asp, sustitución de Ser o Ala por Cys, sustitución de Asn, Glu, Lys, His, Asp o Arg por Gln, sustitución de Gly, Asn, Gln, Lys o Asp por Glu, sustitución de Pro por Gly, sustitución de Asn, Lys, Gln, Arg o Tyr por His, sustitución de Leu, Met, Val, o Phe por Ile, sustitución de Ile, Met, Val o Phe por Leu, sustitución de Asn, Glu, Gln, His o Arg por Lys, sustitución de Ile, Leu, Val o Phe por Met, sustitución de Trp, Tyr, Met, His o Leu por Phe, sustitución de Thr o Ala por Ser, sustitución de Ser o Ala por Thr, sustitución de Phe o Tyr por Trp, sustitución de His, Phe o Trp por Tyr y sustitución del Met, His o Leu por Val. Además, la sustitución, eliminación, inserción, adición, inversión o similares, descritas anteriormente, pueden incluir también una mutación natural debido a la diferencia en el individuo, cepa o especie entre los cangrejos de herradura a partir de los que se deriva el gen.

Además, el factor C de la presente memoria descriptiva puede ser una proteína que tenga una homología o identidad de no menos del 80%, preferentemente, no menos del 90%, más preferentemente, no menos del 95%, todavía más preferentemente, no menos del 97%, de forma especialmente preferente, no menos del 99%, para toda la longitud de la secuencia de aminoácidos del factor C, tal como el que se ha descrito anteriormente, por ejemplo, a toda la longitud de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No.: 2 y tiene la actividad del factor C.

El gen que codifica el factor C de la presente memoria descriptiva no está particularmente limitado, siempre y cuando el gen codifique el factor C de la presente memoria descriptiva, tal como el que se ha descrito anteriormente. El gen que codifica el factor C de la presente memoria descriptiva puede ser una sonda preparada basada en una secuencia de genes conocidos, por ejemplo, un ADN que se hibrida con la secuencia complementaria de longitud completa de la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID No.: 1, o con una parte de la misma, en condiciones estrictas y codifica una proteína con la actividad del factor C. En la presente memoria descriptiva, el término "condiciones estrictas" significa condiciones en las cuales se forma el denominado híbrido específico, pero no se forma un híbrido no específico. Entre los ejemplos de condiciones se incluyen condiciones en las que ADN altamente homólogos se hibridan entre sí, por ejemplo, se hibridan entre sí ADN homólogos en no menos del 80%, preferentemente homólogos en no menos del 90%, más preferentemente, homólogos en no menos del 95%, aún más preferentemente, homólogos en no menos del 97%, de forma especialmente preferente, homólogos en no menos del 99%, mientras que ADN menos homólogos que los anteriores no se hibridan entre sí; y las condiciones en las que el lavado se lleva a cabo una vez, más preferentemente 2 ó 3 veces, a una concentración salina y temperatura correspondientes a 60°C, 1xSSC y SDS al 0,1%; preferentemente 60°C, 0,1xSSC y SDS al 0,1%; más

preferentemente 68°C, 0,1xSSC y SDS al 0,1%; que son las condiciones de lavado normal en la hibridación de Southern.

5 Además, las combinaciones de los codones en el gen que codifica el factor C de la presente memoria descriptiva se pueden modificar para que el gen esté optimizado para expresarse en células de insecto. La optimización puede realizarse utilizando, por ejemplo, un contrato de servicio disponible de manera general. El gen que codifica el factor C de la presente memoria descriptiva puede ser una variante de ADN cuyas combinaciones de codones estén optimizadas para su expresión en células de insectos.

10 La descripción anterior de las variantes del gen y la proteína pueden aplicarse de manera similar para el factor B y el enzima procoagulante de la presente memoria descriptiva y a los genes que codifican a los mismos.

15 El factor B de la presente memoria descriptiva es un factor B que deriva de un cangrejo de herradura. Además, el enzima procoagulante de la presente memoria descriptiva es un enzima procoagulante derivado de un cangrejo de herradura. Entre los ejemplos del cangrejo de herradura se incluyen cangrejo de herradura japonés *Tachypleus tridentatus*, cangrejo de herradura americano *Limulus polyphemus*, cangrejo de herradura del sudeste asiático *Carcinoscorpius rotundicauda* y cangrejo de herradura del sudeste asiático *Tachypleus gigas*. Los factores anteriores derivan, preferentemente, de entre los cangrejos de herradura, del cangrejo de herradura japonés *Tachypleus tridentatus*.

20 Las secuencias del aminoácido del factor B y del enzima procoagulante de *Tachypleus tridentatus* se muestran en las SEQ ID No.: 4 y 6, respectivamente. Secuencias de nucleótidos de los genes que codifican el factor B y el enzima procoagulante de *Tachypleus tridentatus* se muestran en las SEQ ID No.: 3 y 5, respectivamente.

25 El factor B de la presente memoria descriptiva puede ser una variante del factor B de cualquiera de los cangrejos de herradura descritos anteriormente, por ejemplo, una variante de la proteína con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No.: 4, siempre y cuando el factor B de la presente invención tenga la actividad del factor B. Además, el gen que codifica el factor B de la presente memoria descriptiva no está particularmente limitado, siempre y cuando el gen codifique el factor B de la presente memoria descriptiva, tal como se ha descrito anteriormente. La descripción anterior en el factor C se aplica también *mutatis mutandis* a las variantes del gen y la proteína.

35 "La actividad del factor B" significa una actividad por la que factor B se convierte en el factor B de tipo activo en presencia del factor C de tipo activo, para cambiar un enzima procoagulante a su forma activa, un enzima coagulante. El hecho de que el factor B de la presente memoria descriptiva "tiene la actividad del factor B" puede confirmarse, por ejemplo, utilizando el factor B de la presente memoria descriptiva en combinación con un factor C adecuado y un enzima procoagulante adecuado, y detectar los avances de la reacción en cascada en presencia de endotoxinas. Más concretamente, la proteína de la SEQ ID No.: 2 se puede utilizar como el factor C adecuado, y la proteína de la SEQ ID No.: 6 se puede utilizar como el enzima procoagulante adecuado. El avance de la reacción en cascada puede medirse utilizando el sustrato mencionado más adelante para la detección.

40 El enzima procoagulante de la presente memoria descriptiva puede ser una variante del enzima procoagulante de cualquiera de los cangrejos de herradura descritos anteriormente, por ejemplo, una variante de la proteína con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No.: 6, siempre y cuando el enzima procoagulante de la presente memoria descriptiva tenga la actividad del enzima procoagulante. Además, el gen que codifica el enzima procoagulante de la presente invención no está particularmente limitado, siempre y cuando el gen codifique el enzima procoagulante de la presente invención, tal como se ha descrito anteriormente. La descripción anterior sobre el factor C se aplica también *mutatis mutandis* a las variantes del gen y la proteína.

50 "La actividad del enzima procoagulante" significa una actividad por la cual una enzima procoagulante cambia a un enzima coagulante en presencia del factor B de tipo activo, para reaccionar con el sustrato para la detección que se menciona a continuación. La "actividad para reaccionar con un sustrato para la detección" significa, por ejemplo, una actividad para reaccionar con coagulógeno para provocar la coagulación y una actividad para reaccionar con Boc-Leu-Gly-Arg-pNA para liberar pNA. El hecho de que el enzima procoagulante de la presente memoria descriptiva "tiene la actividad del enzima procoagulante" puede confirmarse, por ejemplo, mediante la coagulación enzimática de la presente invención en combinación con un factor C adecuado y un factor B adecuado y detectar el avance de la reacción en cascada en la presencia de endotoxinas. Más concretamente, se puede utilizar la proteína de la SEQ ID No.: 2 como el factor C adecuado, y se puede utilizar la proteína de la SEQ ID No.: 4 como el factor B adecuado. El avance de la reacción en cascada puede medirse utilizando el sustrato mencionado a continuación para la detección.

60 De forma similar al factor C de la presente memoria descriptiva, el factor B de la presente memoria descriptiva o el enzima procoagulante de la presente memoria descriptiva que se van a utilizar, pueden ser cualquiera en los que no se añade el marcador His al extremo C-terminal, aquellos en los que no se añade el marcador V5 al extremo C-terminal, aquellos en los que no se añade ningún péptido al extremo C-terminal y aquellos en los que no se añade ningún péptido a ningún extremo terminal.

65

Además, las combinaciones de codones en el gen que codifica el factor B de la presente memoria descriptiva o el gen que codifica el enzima procoagulante de la presente memoria descriptiva se pueden modificar para que el o los genes estén optimizados para ser expresados en células de insectos. Entre los ejemplos del ADN que codifica el factor B de la SEQ ID No.: 4 y tiene las combinaciones de los codones optimizados para la expresión en células de insectos se incluye el ADN de la SEQ ID No.: 8. Entre los ejemplos del ADN que codifica el enzima procoagulante de la SEQ ID No.: 6 y tiene combinaciones de codones optimizados para la expresión en células de insectos se incluye el ADN de la SEQ ID No.: 9. Cada uno del gen que codifica el factor B de la presente memoria descriptiva o el gen que codifica el enzima procoagulante de la presente memoria descriptiva puede ser una variante de ADN cuyas combinaciones de codones están optimizados para su expresión en células de insectos.

El agente de medición de endotoxinas de la presente memoria descriptiva puede comprender el factor C de la presente memoria descriptiva, el factor B de la presente memoria descriptiva y el enzima procoagulante de la presente memoria descriptiva.

El agente de medición de endotoxinas de la presente memoria descriptiva puede comprender un sustrato para la detección del avance de la reacción en cascada. En la presente memoria descriptiva, este sustrato se puede denominar "sustrato para la detección".

Entre los ejemplos del sustrato para la detección se incluye coagulógeno. Debido al contacto del coagulógeno con un enzima coagulante, tiene lugar coagulación para producir coagulina. El avance de la reacción de coagulación puede ensayarse mediante la medición de la turbidez de la solución de reacción. El coagulógeno se puede recuperar de un extracto de células sanguíneas del cangrejo de herradura (lisado). Además, dado que se ha aclarado una secuencia de nucleótidos del gen que codifica el coagulógeno (Miyata, y otros, PROTEIN, NUCLEIC ACID AND ENZYME, Extra Edition, núm. 29, págs. 30-43 (1986)), se puede producir coagulógeno según un procedimiento convencional mediante ingeniería genética.

Como el sustrato para la detección, también puede utilizarse un sustrato sintético. El sustrato sintético no está particularmente limitado, siempre y cuando el sustrato tenga una propiedad adecuada para la detección, tal como una propiedad por la que la reacción catalítica de una enzima coagulante provoca el revelado de color o la emisión de fluorescencia. Entre los ejemplos del sustrato sintético se incluyen sustratos representados por la fórmula general X-Y-Z (en la que X representa un grupo protector, Y representa un péptido, y Z representa un colorante enlazado a Y través de un enlace amida). En los casos en los que la endotoxina existe en el sistema de reacción, la reacción catalítica de una enzima coagulante, que se produce como consecuencia de la reacción en cascada, escinde el enlace amida entre Y y Z, para liberar el colorante Z, que conduce al revelado de color o a la emisión de fluorescencia. El grupo protector X no está especialmente limitado, y puede utilizarse convenientemente un grupo protector conocido para péptidos. Entre los ejemplos de un grupo protector de este tipo se incluyen el grupo t-butoxicarbonilo y el grupo benzoílo. El colorante Z no está especialmente limitado y puede ser un colorante que puede detectarse bajo luz visible o un colorante fluorescente. Entre los ejemplos del colorante Z se incluyen pNA (para-nitroanilina), MCA (ácido 7-metoxicumarin-4-acético), DNP (2,4-dinitroanilina) y colorantes de dansilo. Entre los ejemplos del péptido Y se incluyen Leu-Gly-Arg (LGR), Ile-Glu-Gly-Arg (IEGR) (SEQ ID No.: 12) y Val-Pro-Arg (VPR). El colorante Z liberado se puede medir por un procedimiento seleccionado dependiendo de la propiedad del colorante.

Además, el agente de medición de endotoxinas de la presente memoria descriptiva también puede comprender un componente diferente de los factores y el sustrato para la detección, siempre y cuando el agente se pueda utilizar para la medición de endotoxinas. Este componente no está especialmente limitado y puede seleccionarse en consideración de la capacidad de conservación, facilidad de manejo y la estabilidad de los factores y el sustrato para la detección. El agente de medición de endotoxinas de la presente memoria descriptiva puede comprender, por ejemplo, un agente tamponador de pH y/o sal. Entre los ejemplos del agente tamponador de pH se incluyen tampón HEPES, tampón MES, tampón Tris y solución tampón de amplia gama GTA. El agente de medición de endotoxinas de la presente memoria descriptiva puede comprender también disolventes orgánicos, tales como alcoholes, cetonas, ésteres y amidas.

El agente de medición de endotoxinas de la presente memoria descriptiva puede formularse en una forma arbitraria entre las que se incluyen, por ejemplo, una forma sólida, una forma líquida y una forma del gel. Para la formulación, se pueden utilizar los aditivos utilizados normalmente como portadores de la formulación, tales como vehículos; aglutinantes; disgregantes; lubricantes; estabilizantes; agentes correctivos; diluyentes; surfactantes y disolventes. El agente de medición de endotoxinas de la presente memoria descriptiva se puede utilizar para la medición de endotoxinas tal como se presenta, o después de ser diluido, disperso o disueltos en agua, solución salina fisiológica, solución tampón o similares. Ni que decir que la formulación resultante obtenida por esta dilución, dispersión, o disolución queda también dentro del ámbito del agente de medición de endotoxinas de la presente memoria descriptiva.

En el agente de medición de endotoxinas de la presente memoria descriptiva, los factores y los otros componentes puede existir como una o más mezclas o pueden existir por separado. Por ejemplo, los factores pueden ser mezclados en una relación arbitraria para ser formulados, o pueden formularse por separado.

- Las concentraciones de los factores y los otros componentes en el agente de medición de endotoxinas de la presente memoria descriptiva no están particularmente limitadas y, preferentemente, se ajustan de manera que las concentraciones queden dentro de los intervalos preferentes mencionados a continuación cuando se mide la endotoxina. Preferentemente, la concentración de cada uno de los factores en el agente de medición de endotoxinas de la presente memoria descriptiva (en términos de la solución preparada antes de entrar en contacto con la muestra) es, por ejemplo, de 20 a 100 µg/ml, más preferentemente de 40 a 80 µg/ml, de forma especialmente preferente, aproximadamente, 60 µg/ml.
- El agente de medición de endotoxinas de la presente memoria descriptiva se puede proporcionar como un kit de medición de endotoxinas. El kit de medición de endotoxinas no está particularmente limitado, siempre y cuando el kit contenga el agente de medición de endotoxinas de la presente invención.
- (2) Procedimiento para producir el agente de medición de endotoxinas
- Los factores que debe comprender el agente de medición de endotoxinas de la presente memoria descriptiva se pueden producir mediante expresión utilizando células de insectos como un huésped.
- Las células de insectos no están particularmente limitadas, siempre y cuando las células puedan expresar los factores, y pueden utilizarse convenientemente las células que se utilizan normalmente para la expresión de una proteína heteróloga. Entre los ejemplos de estas células de insectos se incluyen Sf9, Sf21, SF+ y High-five. Las células de insectos son preferentemente Sf9.
- Las condiciones de cultivo en las que se cultivan las células de insectos no están particularmente limitadas, siempre y cuando las células de los insectos puedan cultivarse en dichas condiciones y, si es necesario, las condiciones de cultivo utilizadas normalmente para el cultivo de células de insectos pueden utilizarse después de las debidas modificaciones. Por ejemplo, como un medio de cultivo, puede utilizarse uno utilizado normalmente para el cultivo de células de insectos. Entre los ejemplos de un medio de este tipo se incluyen medios libres de suero para células de insectos disponibles en el mercado. Más concretamente, medio Sf900 II (Invitrogen) o similares pueden utilizarse convenientemente. El cultivo puede llevarse a cabo, por ejemplo, a 27°C a 28°C con agitación.
- El procedimiento para expresar los factores utilizando células de insectos como un huésped no está particularmente limitado, siempre y cuando los factores se puedan expresar por el mismo y puede utilizarse convenientemente un procedimiento utilizado normalmente para la expresión heteróloga de una proteína. Por ejemplo, cada factor puede expresarse mediante infección de células de insectos con un virus en el que se ha incorporado un gen que codifica el factor (procedimiento viral). De forma alternativa, cada factor puede expresarse mediante la introducción de un vector, en el que se ha incorporado un gen que codifica el factor, en las células de insectos, incorporando de este modo el gen en el cromosoma del huésped (procedimiento de línea celular de expresión estable).
- < Procedimiento viral >
- El virus que se va a utilizar en el procedimiento viral no está particularmente limitado, siempre y cuando las células de los insectos puedan ser infectadas con el virus y los factores puedan ser expresados por las mismas, y puede utilizarse convenientemente un virus utilizado normalmente para la expresión de una proteína en células de insecto. Entre los ejemplos de un virus de este tipo se incluye un baculovirus. El baculovirus es preferentemente *nucleopolihedrovirus* (NPV). Entre los ejemplos de NPV se incluyen AcNPV (NPV *Autographa californica*) y BmNPV (NPV *Bombix mori*). El NPV es preferentemente AcNPV.
- La introducción del ácido nucleico en el virus puede llevarse a cabo mediante un procedimiento convencional, por ejemplo, por recombinación homóloga con un vector de transferencia. Entre los ejemplos del vector de transferencia se incluyen pPSC8 (Protein Sciences), pFastBac (Invitrogen) y pVL1393 (Pharmingen). El vector de transferencia es preferentemente pPSC8.
- Mediante infección, por un procedimiento convencional, de células de insectos con un virus en el que se ha incorporado el gen que codifica a cada factor, se pueden obtener células de insectos que albergan el virus y expresan el factor.
- < Procedimiento de línea celular de expresión estable >
- Mediante la incorporación del gen que codifica cada factor en el cromosoma de las células de los insectos, se puede obtener una línea celular de expresión estable, que expresa el factor de manera estable. El procedimiento de construcción de la línea celular de expresión estable no está especialmente limitado, y la construcción puede llevarse a cabo mediante un procedimiento convencional. Por ejemplo, la línea celular de expresión estable puede construirse utilizando el vector pIZ/V5-su (Invitrogen) según el manual.

En cualquier caso, las células de expresión se construyen de forma que el factor C expresado tiene el extremo C-terminal en el que no está unido el marcador His. Además, en casos los que cada factor se va a expresar sin la adición de cualquier péptido, lo que no está limitado al marcador His en el extremo C-terminal del factor C, las células de expresión se pueden construir de forma que no se añada ningún péptido.

5 En cualquier caso, los factores podrán expresarse conjuntamente mediante un solo tipo de células de expresión, o las células de expresión pueden construirse para cada factor para expresar por separado los factores respectivos.

10 Que cada factor se expresa, o no, puede confirmarse mediante la medición de la actividad del factor. Que cada factor se expresa, o no, puede confirmarse también midiendo la cantidad de ARNm transcrito a partir del gen que codifica el factor, o detectando el factor mediante transferencia Western utilizando un anticuerpo.

15 Cada factor expresado puede ser recuperado como una solución que contiene el factor, para ser utilizado como un componente del agente de medición de endotoxinas de la presente memoria descriptiva. La solución que contiene el factor puede ser, por ejemplo, un caldo de cultivo, un sobrenadante de cultivo, o un extracto celular o una mezcla de los mismos. Cada factor se puede utilizar después de la purificación o sin purificación. En la presente invención, se puede proporcionar un agente de medición de endotoxinas que tiene una eficacia suficientemente elevada incluso utilizando el sobrenadante del cultivo celular que contiene cada factor expresado sin la purificación del factor. En los casos en los que cada factor debe ser purificado, la purificación puede realizarse, por ejemplo, mediante un procedimiento conocido para la purificación de una proteína. Entre los ejemplos de este procedimiento se incluyen precipitación de sulfato de amonio, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de hidroxiapatita. En los casos en los que un marcador, tal como un marcador His está unido a cada factor, el factor puede ser purificado también mediante cromatografía de afinidad utilizando afinidad contra el marcador.

25 En los casos en los que cada factor se produjo mediante el procedimiento viral, preferentemente, el virus se elimina. El procedimiento de eliminación del virus no está especialmente limitado, y la eliminación puede llevarse a cabo mediante un procedimiento convencional. Por ejemplo, el virus puede ser eliminado a través de una membrana de filtración de fibras huecas con un tamaño de poro de 500 kDa.

30 (3) Procedimiento para la medición de endotoxinas

35 Mediante la mezcla del agente de medición de endotoxinas de la presente memoria descriptiva con una muestra, la reacción en cascada procede en los casos en los que la muestra contiene endotoxinas. Midiendo el avance de la reacción en cascada, puede medirse la endotoxina en la muestra. Es decir, la presente memoria descriptiva describe un procedimiento para la medición de endotoxinas en una muestra de ensayo, procedimiento que comprende una etapa de mezcla del agente de medición de endotoxinas de la presente memoria descriptiva con una muestra de ensayo y una etapa de medición del avance de la reacción en cascada (denominada a continuación "primera realización").

40 Cada factor comprendido en el agente de medición de endotoxinas de la presente memoria descriptiva puede haber estado contenido en el sistema de reacción desde el comienzo de la etapa de mezcla del agente de medición de endotoxinas de la presente memoria descriptiva con una muestra, o se puede añadir secuencialmente al sistema de reacción.

45 Por ejemplo, la etapa de mezcla del agente de medición de endotoxinas de la presente memoria descriptiva con una muestra de ensayo puede comprender las siguientes etapas (A) a (C):

- 50 (A) una etapa de adición del factor C de la presente memoria descriptiva al sistema de reacción;
- (B) una etapa de adición del factor B de la presente memoria descriptiva al sistema de reacción; y
- (C) una etapa de adición del enzima procoagulante de la presente memoria descriptiva al sistema de reacción.

55 Las etapas (A) a (C) se pueden ser llevar a cabo por separado, parcialmente al mismo tiempo, o totalmente al mismo tiempo. Las etapas (A) a (C) se pueden ser llevar a cabo en un orden arbitrario. Por ejemplo, la etapa (A) puede estar seguida por la etapa (B), que a continuación puede estar seguida por la etapa (C).

60 El avance de la reacción en cascada puede medirse añadiendo un sustrato para la detección del sistema de reacción y, a continuación, midiendo la reacción del sustrato (colorante, coagulación o similares). El sustrato para la detección puede haber estado contenido en el sistema de reacción desde el comienzo de la etapa de mezcla del agente de medición de endotoxinas de la presente memoria descriptiva con una muestra de ensayo, o puede añadirse al sistema de reacción durante el desarrollo o después de finalizar la etapa. La primera realización, incluye, por supuesto, casos en los que se utiliza el agente de medición de endotoxinas de la presente memoria descriptiva que contiene de manera preliminar un sustrato para la detección.

65 Siempre y cuando la reacción en cascada proceda en los casos en los que la endotoxina está contenida en la sustancia de ensayo, el factor B y el enzima procoagulante de la presente memoria descriptiva pueden no

necesariamente ponerse en contacto con la muestra de ensayo. Es decir, otra realización del procedimiento de la presente memoria descriptiva para la medición de endotoxinas (denominada a continuación "segunda realización") es un procedimiento para la medición de endotoxinas en una sustancia de ensayo, procedimiento que comprende las siguientes etapas (A) a (D).

- 5
- (A) una etapa de mezcla del factor C de la presente memoria descriptiva con una muestra de ensayo;
 - (B) una etapa de mezcla del factor B de la presente memoria descriptiva con el factor C después de la mezcla del mismo en la etapa A;
 - 10 (C) una etapa de mezcla del enzima procoagulante de la presente memoria descriptiva con el factor B después de la mezcla del mismo en la etapa B; y
 - (D) una etapa de medición del avance de la reacción en cascada.

15 En la segunda realización, las etapas (A) a (D) pueden proceder por separado, parcialmente al mismo tiempo, o totalmente al mismo tiempo. Por ejemplo, después de comenzar la etapa A, puede añadirse el factor B o el enzima procoagulante al sistema de reacción durante el desarrollo de la etapa o después de la terminación de la misma. De manera alternativa, después de comenzar la etapa B, puede añadirse el enzima procoagulante al sistema de reacción durante el desarrollo de la etapa o después de la terminación de la misma. De manera alternativa, los 3 factores pueden estar contenidos en el sistema de reacción desde el comienzo de la etapa A. De manera alternativa, por ejemplo, después de la puesta en contacto en la etapa A, el factor C puede ser recuperado para ser utilizado en la etapa B, y después de la puesta contacto en la etapa B, el factor B puede ser recuperado para ser utilizado en la etapa C.

20 En la segunda realización, puede medirse el avance de la reacción en cascada mediante adición de un sustrato para la detección del sistema de reacción y, a continuación, medir la reacción del sustrato (colorante, coagulación o similares). El sustrato para la detección puede estar contenido en el sistema de reacción desde el principio de etapa A, o puede añadirse al sistema de reacción durante el desarrollo de cada etapa o después de la terminación las mismas.

30 El procedimiento de la presente memoria descriptiva para la medición de endotoxinas puede comprender otra etapa arbitraria, siempre y cuando la reacción en cascada proceda en los casos en los que la muestra de ensayo contenga endotoxinas. Por ejemplo, el procedimiento de la presente memoria descriptiva para la medición de endotoxinas puede comprender una etapa de adición de un sustrato para la detección del sistema de reacción, o una etapa de mezcla de un enzima coagulante, producido por la reacción en cascada con un sustrato para la detección. Además, por ejemplo, el procedimiento de la presente memoria descriptiva para la medición de endotoxinas puede comprender una etapa de cálculo del nivel de endotoxinas en la muestra de ensayo sobre la base de la reacción del sustrato para la detección.

35 En el procedimiento de la presente memoria descriptiva para la medición de endotoxinas, la reacción se lleva a cabo preferentemente en un solvente acuoso, tal como agua o un tampón.

40 En el procedimiento de la presente memoria descriptiva para la medición de endotoxinas, la concentración de cada factor en la solución de reacción no está particularmente limitada, siempre y cuando la reacción en cascada proceda en los casos en los que la endotoxina se encuentra en la muestra de ensayo, y se puede configurar apropiadamente dependiendo de la propiedad del factor o similares. Por ejemplo, la concentración de cada factor es, generalmente, de 10 a 50 $\mu\text{g/ml}$, preferentemente, de 20 a 40 $\mu\text{g/ml}$, más preferentemente, de 30 $\mu\text{g/ml}$, en términos de la concentración final.

45 En el procedimiento de la presente memoria descriptiva para la medición de endotoxinas, la concentración del sustrato para la detección en la solución de reacción no está particularmente limitada, siempre y cuando la reacción en cascada proceda en los casos en los que la endotoxina se encuentra en la muestra de ensayo y se puede configurar apropiadamente dependiendo de la propiedad del sustrato para la detección o similares. Por ejemplo, en los casos en los que el sustrato para la detección es un sustrato sintético, la concentración de sustrato para la detección es, normalmente, de 0,001 mM a 100 mM, preferentemente, de 0,01 mM a 10 mM, en términos a la concentración final.

50 En cualquier realización, el sistema de reacción puede contener uno o más componentes arbitrarios que no sean el agente de medición de endotoxinas en la primera realización o los factores de la segunda realización, sustrato para la detección y muestra de ensayo, siempre y cuando la reacción en cascada proceda en los casos en los que la endotoxina se encuentra en la muestra de ensayo. Por ejemplo, el sistema de reacción puede contener un agente tamponador de pH y/o sal. Entre los ejemplos del agente tamponador de pH se incluyen tampón HEPES, tampón MES, tampón Tris y solución tampón de amplia gama GTA. El sistema de reacción puede contener también disolventes orgánicos, tales como alcoholes, cetonas, ésteres y amidas.

55 El pH de la solución de reacción no está limitado particularmente, siempre y cuando la reacción en cascada proceda en los casos en los que la endotoxina se encuentra en la muestra de ensayo, y puede configurarse correctamente

según la propiedad de cada factor. Por ejemplo, el pH de la solución de reacción es, generalmente, de 5 a 10, preferentemente, de 7 a 8,5.

5 La temperatura de reacción no está limitada particularmente, siempre y cuando la reacción en cascada proceda en los casos en los que la endotoxina se encuentra en la muestra de ensayo, y puede configurarse correctamente según la propiedad de cada factor. La temperatura de reacción es, por ejemplo, generalmente de 10°C a 80°C, preferentemente, de 20°C a 50°C. Por ejemplo, la temperatura de reacción puede ser temperatura ambiente.

10 El tiempo de reacción no está limitado particularmente y pueden configurarse adecuadamente dependiendo de condiciones tales como la propiedad de cada factor y la temperatura de reacción. El tiempo de reacción es, por ejemplo, normalmente de 5 minutos a 1 hora, preferentemente, de 15 minutos a 45 minutos. Por ejemplo, el tiempo de reacción puede ser 30 minutos.

15 En cualquier realización, durante el proceso de reacción, además, la muestra de ensayo, los factores y los otros componentes pueden añadirse individualmente o en una combinación arbitraria al sistema de reacción. Estos componentes pueden añadirse a la vez o en una pluralidad de momentos, o pueden añadirse continuamente. Se pueden utilizar condiciones constantes desde el inicio de la reacción hasta el final de la reacción, o las condiciones pueden cambiarse durante el proceso de reacción.

20 Mediante la medición de la reacción del sustrato para la detección (colorante, coagulación o similares), puede medirse el avance de la reacción en cascada debido a la existencia de la endotoxina y, por lo tanto, puede medirse la endotoxina en la sustancia de ensayo. La reacción del sustrato para la detección (colorante, coagulación o similares) se puede medir por un procedimiento dependiendo del sustrato para la detección utilizado.

25 En los casos en los que la medición de endotoxinas se realiza cuantitativamente, se pueden utilizar una muestra patrón de endotoxina cuya concentración es conocida, para obtener una correlación de datos entre el nivel de endotoxinas y el grado de reacción del sustrato para la detección (grado de coloración, coagulación o similares), y las endotoxinas existentes en la muestra pueden cuantificarse a partir de los datos de correlación. Los datos de correlación pueden ser, por ejemplo, una curva de calibración. La cuantificación puede realizarse mediante el procedimiento cinético o mediante el procedimiento de punto final.

30 La muestra de ensayo objeto de la medición de endotoxinas no está limitada especialmente, y entre los ejemplos de la misma se incluyen agua médica, productos farmacéuticos, soluciones de infusión, preparaciones sanguíneas, equipos médicos, aparatos médicos, cosméticos, alimentos y bebidas, muestras ambientales (por ejemplo, de aire, de ríos y de suelos), componentes biológicos (por ejemplo, sangre, fluidos corporales y tejidos), proteínas de origen natural, proteínas recombinantes, ácidos nucleicos y carbohidratos. La muestra de ensayo se puede someter a la medición de la endotoxina mediante mezcla, dispersión, o disolviendo la muestra tal como está, o como un extracto o solución de lavado de la muestra de ensayo en un sistema de reacción.

40 EJEMPLOS

La presente invención se describirá ahora más particularmente por medio de ejemplos.

45 Ejemplo 1: Producción de agente de medición de endotoxinas de la presente invención

(1-1) Procedimiento de utilización de virus (a continuación, denominado "procedimiento viral")

50 En el presente ejemplo, se utilizó un baculovirus recombinante en el que se incorporó el gen que codifica a cada uno del factor C, el factor B y un enzima procoagulante, para expresar el factor en las células de insectos, y de este modo se produjo un agente de medición de endotoxinas.

(1-1-1) Preparación de baculovirus recombinante

55 Como un ADN de codificación de factor C con marcador His unido (gen del factor C con marcador His unido), se sintetizó totalmente el ADN de la SEQ ID No.: 7 mediante un contrato de servicio disponible de forma general (TAKARA BIO INC.). El factor C con marcador His unido es el factor C de un cangrejo de herradura japonés que se muestra en la SEQ ID No.: 2 en la que un marcador de 6 His se une en el extremo C-terminal. El ADN se insertó entre los sitios de reconocimiento de los enzimas de restricción *NruI* y *SmaI* de un vector de transferencia pPSC8 (Protein Sciences), para obtener un vector para su recombinación. Utilizando el vector de recombinación, se incorporó el gen del factor C con marcador His unido en un baculovirus AcNPV, preparar un baculovirus recombinante.

60 A continuación, utilizando un cebador FC-N-Pst (SEQ ID No.: 10) y un cebador FC-notag-R-Bam (SEQ ID No.: 11) y el ADN descrito anteriormente que codifica el factor C con marcador His unido como una plantilla, se llevó a cabo PCR para preparar ADN que codifica un factor C en el que se eliminó la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de marcador His, en el extremo 3' (gen del factor C sin marcador). El ADN que codifica el factor C de

cangrejo de herradura japonés se muestra en la SEQ ID No.: 2, en el que no está unido el marcador His en el extremo C-terminal. Además, para el gen del factor C sin marcador His, se preparó un baculovirus recombinante mediante el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente.

5 Como un ADN de codificación del factor B (gen del factor B), se sintetizó totalmente el ADN de la SEQ ID No.: 8 mediante un contrato de servicio disponible de forma general (TAKARA BIO INC.). El ADN que codifica el factor B de cangrejo de herradura japonés se muestra en la SEQ ID No.: 4 (sin marcador His), y las combinaciones de sus codones están optimizadas para su expresión en células de insectos. Se preparó también para el gen del factor B, un baculovirus recombinante mediante el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente. Sin embargo, la posición de inserción en el vector de pPSC8 estaba entre los sitios de reconocimiento de los enzimas de restricción *PstI* y *KpnI*.

15 Como un ADN de codificación del enzima procoagulante (gen del enzima procoagulante), se sintetizó totalmente el ADN de la SEQ ID No.: 9 mediante un contrato de servicio disponible de forma general (TAKARA BIO INC.). El ADN que codifica el enzima procoagulante de cangrejo de herradura japonés que se muestra en la SEQ ID No.: 6 (sin marcador His), y las combinaciones de sus codones están optimizadas para su expresión en células de insectos. Se preparó también para el gen del enzima procoagulante, un baculovirus recombinante mediante el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente. Sin embargo, la posición de inserción en el vector de pPSC8 estaba entre los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción *XbaI* y *BglIII*.

20 (1-1-2) Infección de células de insectos (células Sf9) con Baculovirus recombinante

25 Se inocularon células Sf9 (Novagen) en un medio en $1,5 \times 10^6$ células/ml y se añadió al medio el baculovirus recombinante, en el que se había introducido el ADN que codifica el factor C unido al marcador His, para infectar las células con el virus. Como el medio para las células Sf9, se utilizó Sf900 II (Invitrogen) complementado con antibióticos (agentes antibióticos-antifúngicos ($\times 100$); Invitrogen) (concentración final, $\times 1$) (1 l). La multiplicidad de infección (MOI) de los virus se estableció en 1,0. Posteriormente, las células obtenidas se cultivaron a 28°C durante 48 horas con agitación.

30 Del mismo modo, se infectaron células Sf9 con el virus en el cual se había introducido el ADN que codifica el factor C sin marcador His.

35 Además, se infectaron también células Sf9 con cada uno de los virus en los que se había introducido el ADN que codifica el factor B y el virus en el que se había introducido el ADN que codifica el enzima procoagulante. En estos casos, la MOI se fijó a 0,5, y el tiempo de cultivo fue de 72 horas.

(1-1-3) Recuperación de la solución de la proteína recombinante expresada

40 Se centrifugó cada uno de los caldos de cultivo obtenidos después del cultivo anterior, a 4°C a 3000xg, durante 30 minutos para obtener el sobrenadante que, a continuación, se almacenó a -80°C.

(1-1-4) Eliminación de las impurezas y virus de la solución de la proteína recombinante

45 Se descongeló cada uno de los sobrenadantes que se habían almacenado congelados, tal como se ha descrito anteriormente, y se aplicó a un filtro con un tamaño de poro de 0,1 μm (filtro Cup (Millipore)). La filtración se llevó a cabo con succión, y se recuperó la solución que había pasado a través del filtro. Cada sobrenadante recuperado se aplicó a una membrana de filtración de fibras huecas con un tamaño de poro de 500 kDa (membrana de fibras huecas de poliéter sulfona; Spectrum Labs) y se filtró mediante el sistema de filtración de bomba de Kros Flow TFF (Spectrum Labs). Se recuperó cada solución que había pasado a través de la membrana.

50 (1-1-5) Preparación del reactivo

55 Se mezclaron conjuntamente a 4°C, 560 ml de cada solución obtenida en el (1-1-4) anterior (en las que están contenidos el factor C, el factor B y el enzima procoagulante), 134 ml de agua destilada, 126 ml de solución acuosa de un sustrato sintético (Boc-Leu-Gly-Arg-pNA) 6,66 mM (concentración final, 0,3 mM) y 560 ml de solución acuosa de dextrano al 15% (concentración final, 3%). Esta mezcla se distribuyó en alícuotas de 5 ml de volumen en frascos y se liofilizó, para proporcionar al agente de medición de endotoxinas 1.

60 (1 - 2) Procedimiento utilizando plásmidos (a continuación, denominado también "procedimiento de la línea celular de expresión estable")

En el presente ejemplo, se incorporó un gen que codifica a cada uno de los factores C, factor B, enzima procoagulante en el cromosoma de las células de insectos para la construcción de una línea celular de expresión estable y, a continuación, se expresó cada factor, produciendo un agente de medición de endotoxinas.

65

(1-2-1) Preparación y cultivo de la línea celular de expresión estable

Se introdujo cada uno del gen del factor C sin marcador His, el gen del factor B (SEQ ID No.: 8) y el gen del enzima de procoagulante (SEQ ID No.: 9), utilizados en el procedimiento viral descrito anteriormente, en las células Sf9 (Invitrogen) utilizando el kit del vector pIZ (Invitrogen).

Más concretamente, en primer lugar, se incorporó cada uno de los ADN entre los sitios de reconocimiento de *EcoRV* y *MluI* en un vector pIZ/V5-His comprendido en el kit, y cada vector resultante se mezcló con Celfectina comprendida en el kit, seguido de la introducción del vector en las células Sf9. La posición de incorporación de los ADN en pIZ/V5-His, y similares se muestran en la figura 2. En la región indicada por una flecha gruesa en la parte superior en la figura 2, se incorporó cada uno de los ADN. Como medio para las células Sf9, se utilizó Sf900 III (Invitrogen) complementado con antibióticos (agentes antibióticos antifúngicos ($\times 100$); Invitrogen) (concentración final, $\times 1$) y antibiótico Zeocina (Invitrogen) (concentración final, 50 $\mu\text{g/ml}$). La densidad de la línea celular obtenida de este modo, en la que se había introducido cada ADN, se ajustó a 6×10^5 células/ml (1 l) en el medio y las células se cultivaron a 28°C durante 96 horas con agitación.

Debe observarse que, aunque una secuencia de marcador His está contenida en pIZ/V5-His, todos los ADN descritos anteriormente tienen un codón de detención, de manera que tanto el factor C, el factor B como el enzima procoagulante se expresan sin adición del marcador His.

(1-2-2) Recuperación de la solución de proteína recombinante, eliminación de impurezas y preparación de reactivos

Se procesó cada caldo de cultivo obtenido después del cultivo descrito anteriormente de la misma manera que se ha descrito en "(1-1-3) Recuperación de la solución de la proteína recombinante expresada", "(1-1-4) Eliminación de las impurezas y el virus de la solución de la proteína recombinante" y "(1-1-5) Preparación del reactivo" para el procedimiento viral. Sin embargo, no se realizó el proceso de filtración utilizando una membrana de filtración de fibras huecas en "(1-1-4) Eliminación de las impurezas y el virus de la solución de la proteína recombinante". Se proporcionó el agente de medición obtenido de este modo como el agente de medición de endotoxinas 2.

Ejemplo 2: Propiedades y similares de las proteínas expresadas

(2 - 1) Comparación del nivel de expresión del factor C

Se comparó el nivel de expresión entre el factor C sin marcador His obtenido mediante el procedimiento viral y el procedimiento de línea celular de expresión estable, y el factor C unido a marcador His obtenido mediante el procedimiento viral.

Se evaluó el nivel de expresión mediante un muestreo de 0,5, 1,5, 5 ó 15 μl de la solución correspondiente después de la filtración y antes de la preparación del reactivo en el ejemplo 1 y sometiendo a las soluciones muestreadas a electroforesis en gel de poliacrilamida al 5-20% (en condiciones no reductoras) en presencia de SDS y, a continuación, a transferencia Western utilizando un anticuerpo anti-factor C (2C12, obtenido del Profesor Shun-ichiro Kawabata, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Kyushu).

Los resultados se muestran en la figura 3. Los resultados indican que los niveles de expresión del factor C sin marcador His eran más bajos que el nivel de expresión del factor C unido a marcador His. Además, las intensidades de las bandas de la transferencia Western en la figura 3 se midieron utilizando un densitómetro, y se calculó la relación de volumen de cada solución con la que se consiguen concentraciones iguales de factor C, sobre la base de valores relativos de las intensidades medidas. La relación de volumen fue 50 para el factor C sin marcador His obtenido mediante el procedimiento viral, 17 para el factor C sin marcador His obtenido mediante el procedimiento de línea celular de expresión estable y 7 para el factor C unido a marcador His obtenido mediante el procedimiento viral.

(2-2) Comparación de la actividad del factor C

La capacidad de activar el enzima procoagulante de cada una de las soluciones de factor C fue estudiada utilizando la misma cantidad de factor C.

Más particularmente, se colocó cada una de solución de factor C unido a marcador His obtenida mediante el procedimiento viral (0,7 μl o 5 μl), solución de factor C sin marcador His obtenida mediante el procedimiento viral (5 μl) y solución de factor C sin marcador His obtenida mediante el procedimiento de la línea celular de expresión estable (1,7 μL) en un pocillo de una placa de 96 pocillos. Posteriormente, se añadió la solución que contenía el factor B (5 μl) y la solución que contenía el enzima procoagulante (5 μl) obtenidas después de la filtración a través del filtro 0,1 μm (1-1-4) en el procedimiento viral en el ejemplo 1 y Boc-Leu-Gly-Arg-pNA (concentración final, 0,3 mM), Tris-HCl (pH 8,0) (concentración final, 100 mM) y 50 μl de endotoxina (nombre del producto "Endotoxina patrón de referencia USP" (USP-RSE); disponible comercialmente de Seikagaku Biobusiness Corporation) (concentración

de la muestra: 0, 0,05 ó 0,5 UE/ml) de manera que el volumen total en el pocillo fue de 100 µl y se mezcló conjuntamente, seguido de incubación a 37°C durante 3 horas, durante las cuales se midió la absorbancia a 405 nm con el tiempo. Como control negativo se utilizó agua destilada. La velocidad de incremento en la absorbancia (la velocidad de cambio de absorbancia) refleja la capacidad de activar el enzima procoagulante. El término "UE" significa la "unidad de endotoxina", que es una unidad que representa la cantidad de endotoxina (esto también se aplica a continuación).

Los resultados se muestran en la figura 4. En la figura 4, "DW" significa agua destilada; "Virus + marcador His (x1)" solución de factor C unido a marcador His obtenida mediante el procedimiento viral (0,7 µL); "Virus + marcador His (x7)" significa la misma solución (5 µl); "Virus sin marcador (x1)" significa la solución de factor C sin marcador His obtenida mediante el procedimiento viral; y "Sf9 estable sin marcador (x1)" significa la solución de factor C sin marcador His obtenida mediante el procedimiento de la línea celular de expresión estable.

Como resultado, no se observó la activación del enzima procoagulante o apenas se observó en la solución de factor C unido a marcador His que contiene la misma cantidad de factor C (0,7 µl) e incluso en la solución que contiene aproximadamente 7 veces la cantidad del factor C (5 µl). Por otro lado, el factor C sin marcador His demostró una capacidad de activación del enzima procoagulante notable, independientemente de si se obtuvo mediante el procedimiento viral o mediante el procedimiento de línea celular de expresión estable.

De los resultados anteriores, se demostró que una molécula de factor C recombinante expresada sin adición de la secuencia de marcador His tiene una capacidad mucho mayor de activación del enzima procoagulante que una molécula de factor C recombinante expresada con adición de marcador His. Además, se demostró que cada una de las proteínas expresadas se puede utilizar sin purificación, en el estado el que la proteína está contenida en el sobrenadante de cultivo.

(2-3) Comparación de la estabilidad del factor C expresado

(2-3-1) Estabilidad del factor C expresado mediante el procedimiento viral

En la etapa de cultivo de las células infectadas por el virus a 28°C con agitación (1-1-2) en el procedimiento viral en el ejemplo 1, se recuperó el sobrenadante después de 48 horas, 72 horas y 96 horas de cultivo, y cada sobrenadante recuperado se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida al 5-20% (en condiciones no reductoras) en presencia de SDS, seguido por la evaluación de la cantidad restante de factor C mediante transferencia Western utilizando el anticuerpo anti-factor C (2C12, que es el mismo que se ha utilizado anteriormente). Además, se realizó el muestreo y el análisis por separado de la misma manera para el sobrenadante obtenido por adición de un inhibidor de proteasa (leupeptina a una concentración final de 0,5 µg/ml + pepstatina A a una concentración final de 0,7 µg/ml) al caldo de cultivo después de 24 horas de la infección con el virus.

Los resultados se muestran en la figura 5. Como resultado, se demostró que el factor C expresado mediante el procedimiento viral se descomponía con el tiempo durante el cultivo. Además, se demostró que la descomposición del factor C se producía también en cierta medida en el caso en el que se añadía el inhibidor de proteasa.

(2-3-2) Estabilidad del factor C expresado mediante el procedimiento de línea celular de expresión estable

Del mismo modo, en la etapa de cultivo de la línea celular de expresión estable a 28°C con agitación (1-2-1) en el procedimiento de línea celular de expresión estable en el ejemplo 1, se recuperó el sobrenadante después de 72 horas, 96 horas, 120, 144 y 168 horas de cultivo, y cada sobrenadante recuperado se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida al 5-20% (en condiciones no reductoras) en presencia de SDS, seguido por la evaluación de la cantidad restante de factor C mediante transferencia Western utilizando el anticuerpo anti-factor C (2C12, que es el mismo que se ha utilizado anteriormente). Además, se aplicó también el sobrenadante obtenido después de 48 horas de cultivo mediante el procedimiento viral.

Los resultados se muestran en la figura 6. Como resultado, el factor C expresado mediante el procedimiento de línea celular de expresión estable no se había descompuesto en ausencia de un inhibidor de proteasa, incluso después de 168 horas de cultivo. Por todo esto, se demostró que la utilización del procedimiento de línea celular de expresión estable puede evitar descomposición del factor C.

(2-4) Estudio sobre si es necesario el tratamiento de filtración por membrana de fibras huecas

Se estudió si es necesario el tratamiento de filtración por membrana de fibras huecas (1-1-4) en el procedimiento viral. Utilizando cada solución muestreada antes de la filtración a través de la membrana de fibras huecas (1-1-4) y cada solución muestreada después la filtración a través de la misma (3 lotes) en (1-1-4), se midió la velocidad de incremento en la absorbancia (la velocidad de cambio de absorbancia) de la misma manera que en el apartado (2-2) anterior, mediante la adición de la endotoxina (USP-RSE) a una concentración final de 0 ó 0,05 UE/ml.

Los resultados se muestran en la figura 7. En la figura 7, "solución sin filtrar" significa una solución que permanecía en el cartucho de membrana de fibras huecas sin filtrar. En los casos en los que se utilizó cada solución muestreada después de la filtración a través de la membrana de fibras huecas, el grado de activación del enzima procoagulante fue bajo cuando la concentración de endotoxina fue 0 UE/ml (en otras palabras, el valor de blanco en la medición de endotoxina fue bajo) y, es decir, se obtuvo un excelente resultado. Por el contrario, se descubrió que, en los casos en los que se utilizó cada solución muestreada antes de filtración a través de la membrana de fibras huecas ("antes de la filtración" o "solución sin filtrar"), el grado de activación del enzima procoagulante fue elevado incluso en los casos de 0 UE/ml de endotoxinas, lo que conduce a un valor de blanco elevado en la medición de endotoxinas.

Por el contrario, mediante el procedimiento de línea celular de expresión estable, el grado de activación del enzima procoagulante en el caso de 0 UE/ml de endotoxinas (el valor de blanco en la medición de endotoxinas) se mantuvo bajo incluso sin un proceso de filtración a través de la membrana de filtración de fibras huecas (figura 4).

A partir de estos resultados, se observó que, aunque la filtración a través de una membrana de filtración de fibras huecas es indispensable en los casos en los que se utiliza el procedimiento viral, esta filtración no es necesaria en los casos en los que se utiliza el procedimiento de línea celular de expresión estable.

Ejemplo 3: Medición de endotoxinas con el agente de medición de endotoxinas de la presente invención

(3 - 1) Medición utilizando el agente de medición de endotoxinas 1

Se añadieron 3,3 ml de tampón de Tris 100 mM (pH 8,0) al agente de medición de endotoxinas 1 (producto liofilizado) para disolver el agente. En esta solución, la concentración de proteína de cada uno de los sobrenadantes de cultivo que contenían el factor C, el factor B y el enzima procoagulante, era aproximadamente 60 µg/ml.

En cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos, se distribuyeron 50 µl de alícuotas de una solución de endotoxina en una concentración de 0, 0,001, 0,01 ó 0,1 UE/ml y se añadieron a cada pocillo 50 µl de la solución de agente de medición de endotoxinas preparada disolviendo el agente, seguido por la mezcla de la mezcla resultante. A continuación, se incubó la mezcla a 37°C durante 30 minutos, y se midió la concentración de endotoxinas según el procedimiento de velocidad de reacción, en la cual se midió la absorbancia a 405 nm con el tiempo durante la incubación. En esta solución de reacción, la concentración de proteína de cada uno de los sobrenadantes de cultivo que contienen el factor C, el factor B y el enzima procoagulante, era aproximadamente 30 µg/ml.

Los resultados se muestran en la figura 8. Como resultado, se observó que, en casos en los que se utilizaron los factores expresados mediante el procedimiento viral, la velocidad de cambio de absorbancia aumentó linealmente dentro del intervalo de 0,001 a 0,10 UE/ml a medida que aumentaba la concentración de endotoxinas.

(3-2) Medición utilizando el agente de medición de endotoxinas 2

Se añadieron 3,3 ml de tampón Hepes 100 mM (pH 7.6) al agente de medición de endotoxinas 2 (producto liofilizado) para disolver el agente. En esta solución, la concentración de proteína de cada uno de los sobrenadantes de cultivo que contienen el factor C, el factor B y el enzima procoagulante, era aproximadamente 60 µg/ml.

En cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos, se distribuyeron 50 µl de alícuotas de una solución de endotoxina en una concentración de 0, 0,0005, 0,001, 0,005, 0,01 ó 0,1 UE/ml y se añadieron a cada pocillo 50 µl de la solución de agente de medición de endotoxinas preparada disolviendo el agente, seguido por la mezcla de la mezcla resultante. A continuación, se incubó la mezcla a 37°C durante 30 minutos, y se midió la concentración de endotoxinas según el procedimiento de velocidad de reacción, en la cual se midió la absorbancia a 405 nm con el tiempo durante la incubación. En esta solución de reacción, la concentración de proteína de cada uno de los sobrenadantes de cultivo que contienen el factor C, el factor B y el enzima procoagulante, era aproximadamente 30 µg/ml.

Los resultados se muestran en la figura 9. Como resultado, se observó que, en los casos en los que se utilizaron los factores expresados mediante el procedimiento de línea celular de expresión estable, la velocidad de cambio de absorbancia aumentó linealmente dentro del intervalo de 0,0005 a 0,1 UE/ml a medida que aumentaba la concentración de endotoxinas.

En base a los resultados anteriores, con cualquiera de los agentes de medición de endotoxinas, la cuantificación de endotoxinas a concentraciones de 0,001 UE/ml era posible en 30 minutos. Además, con el agente de medición de endotoxinas 2, se pudo medir endotoxinas a una concentración de 0,0005 que UE/ml en 30 minutos. De este modo, se demostró que los agentes medición de endotoxinas de la presente invención permiten una cuantificación más rápida y sensible de la endotoxina en comparación con los procedimientos convencionales (mediante los cuales la medición no tarda menos de 1 hora y no se ha conseguido una sensibilidad de detección de 0,001 UE/ml). Además, se ha demostrado que, en cualquier caso, los factores expresados pueden utilizarse para un agente de medición tal como están sin purificación.

Ejemplo 4: Diferencia en actividad de la proteína factor C recombinante y la proteína factor C de origen natural

(4 - 1) Purificación de la proteína factor C recombinante y la proteína factor C de origen natural

Se prepararon 2 columnas de anticuerpo de factor C, mediante unión covalente de 2 mg de anticuerpo anti-factor C (2C12, que era el mismo que se ha utilizado anteriormente) a 1 ml de columna de sefarosa (GE Healthcare). La preparación se realizó según el procedimiento descrito en las instrucciones adjuntas. A 76 ml de sobrenadante de cultivo que contenía la proteína factor C recombinante, derivada mediante el procedimiento de célula de expresión estable que se preparó mediante el mismo proceso, tal como se describe en el apartado "(1-2-2) Recuperación de proteínas recombinantes", anterior se añadió la misma cantidad de tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,0) que contenía cloruro de sodio 2 M y EDTA 2 mM para diluir el sobrenadante de cultivo, seguido de someter la dilución resultante a una de las columnas de anticuerpo de factor C. Del mismo modo, a 76 ml de un extracto de células sanguíneas de cangrejo de herradura, se añadió una cantidad igual de tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,0) que contenía cloruro de sodio 2 M y EDTA 2 mM para diluir el extracto, seguido de someter la dilución resultante a la otra columna de anticuerpo de factor C. Ambas columnas se lavaron secuencialmente con 20 ml cada una de solución tampón de Tris-HCl 20 mM (pH 8,0) que contenía 200 mM o 450 mM de cloruro de sodio, y la elución se realizó a continuación con 50 mM de tampón de glicina (pH 2,5). En un tubo de 1,5 ml, en el que se había colocado de forma preliminar 0,025 ml de base Trizma 1 M (Sigma), se recogió 1 ml de cada fracción eluída, para retornar el pH de la solución eluída a neutro.

(4-2) Comparación de la concentración entre las proteínas de factor C recombinante y la proteína factor C de origen natural purificadas

Se sometieron las fracciones eluídas de las proteínas factor C recombinante y factor C de origen natural purificadas a separación por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5-20% (en condiciones no reductoras) en presencia de SDS. En este proceso, albúmina de suero bovino purificada (=BSA) cuya concentración era conocida, también se sometió a separación en el mismo gel que las muestras para referencia de concentración (figura 10). Se cuantificaron las intensidades de las bandas de la BSA sobre el gel teñido con azul brillante Coomassie con un densitómetro y se mostraron gráficamente respecto a las concentraciones de la proteína BSA, para preparar una curva de calibración (figura 11). Basado en las intensidades de la banda de las proteínas de factor C purificado y la curva de calibración, se determinaron aproximadamente las concentraciones de las proteínas factor C purificadas. Como resultado, se reveló que, en cuanto a las muestras purificadas, la proteína factor C natural tenía aproximadamente 4 veces la concentración de la proteína factor C recombinante.

(4-3) Comparación de la actividad entre las proteínas factor C recombinante y la proteína factor C de origen natural purificadas

Se realizó una comparación de la actividad utilizando las proteínas factor C recombinante y la de origen natural purificadas. En esta comparación, la concentración de proteína se igualó entre los factores C purificados basado en los resultados (4-2). En cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos, se dispusieron alícuotas de 50 µl de una solución de endotoxina a una concentración de 0, 0,05, 0,1, ó 0,5 UE/ml. Se añadieron a cada pocillo los reactivos y los sobrenadantes de cultivo de modo que solución tampón de Tris 50 mM (pH 8.0), 0,2 µg/ml de proteína factor C purificada, 30 de µg/ml de proteína de cada uno de los sobrenadantes de cultivo que contenía el factor B recombinante y el enzima procoagulante recombinante y 0,3 mM del sustrato sintético Boc-Leu-Gly-Arg-pNA estaban contenidos en la solución de reacción, cuyo volumen total se ajustó a 100 µl por adición de agua para inyección. La solución de reacción se incubó a 37°C durante 30 minutos, y el análisis se realizó según el procedimiento de velocidad de reacción en la que se midió la absorbancia a 405 nm con el tiempo durante la incubación.

Como resultado, se reveló que la proteína factor C recombinante purificada tenía dos veces la actividad de la proteína factor C de origen natural purificada (figura 12). Los resultados anteriores sugieren que el factor C recombinante tiene una actividad específica más elevada que el factor C de origen natural.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Mediante la presente invención, se puede producir un agente de medición de endotoxinas de forma sencilla y rápida con un bajo coste.

DESCRIPCIÓN DE LA LISTA DE SECUENCIAS

SEQ ID No.: 1 Secuencia de ADN del gen del factor C del cangrejo de herradura japonés
 SEQ ID No.: 2 Secuencia de aminoácidos del factor C del cangrejo de herradura japonés
 SEQ ID No.: 3 Secuencia de ADN del gen del factor B del cangrejo de herradura japonés
 SEQ ID No.: 4 Secuencia de aminoácidos del factor B del cangrejo de herradura japonés
 SEQ ID No.: 5 Secuencia de ADN del gen de la enzima procoagulante del cangrejo de herradura japonés

ES 2 650 170 T3

SEQ ID No.: 6 Secuencia de aminoácidos de enzima procoagulante del cangrejo de herradura japonés
SEQ ID No.: 7 Secuencia de ADN del gen del factor C unido al marcador His
SEQ ID No.: 8 Secuencia de ADN del gen del factor B cuyos codones están optimizados para la expresión en células de insecto
5 SEQ ID No.: 9 Secuencia de ADN del gen de la enzima procoagulante cuyos codones están optimizados para la expresión en células de insectos
SEQ ID No.: 10 Cebador para la preparación del gen del factor C sin marcador His
SEQ ID No.: 11 Cebador para la preparación del gen del factor C sin marcador His
10 SEQ ID No.: 12 Secuencia de péptidos

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SEIKAGAKU CORPORATION

15 <120> Agente para la medición de endotoxinas

<130> OP-11070-PCT

<150> US61/447, 556

20 <151> 2011-02-28

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

25

<210> 1

<211> 3060

<212> ADN

<213> Tachypleus tridentatus

30

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (3060)

<223>

35

<400> 1

atg gtc tta gcg tgc ttt ttg gtg tct ggt tta gtt cta ggg ata cta

48

Met Val Leu Ala Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Val Leu Gly Ile Leu

ES 2 650 170 T3

	180	185	190	
	ccc aaa tgt att cga gaa tgt gcc aag gtt tca tet cca gaa cac ggg			624
	Pro Lys Cys Ile Arg Glu Cys Ala Lys Val Ser Ser Pro Glu His Gly			
	195	200	205	
5	aaa gtg aat gct cct agt ggc aat atg ata gaa ggg gct act tta cgg			672
	Lys Val Asn Ala Pro Ser Gly Asn Met Ile Glu Gly Ala Thr Leu Arg			
	210	215	220	
	ttc tca tgt gat agt ccc tac tac ttg att ggt caa gaa aca tta acc			720
	Phe Ser Cys Asp Ser Pro Tyr Tyr Leu Ile Gly Gln Glu Thr Leu Thr			
10	225	230	235	240
	tgc cag ggt aat ggt cag tgg agt gga caa ata cca caa tgt aag aag			768
	Cys Gln Gly Asn Gly Gln Trp Ser Gly Gln Ile Pro Gln Cys Lys Lys			
	245	250	255	
	ttg gtc ttc tgt cct gac ctt gat cct gta aac cat gct gaa cac cag			816
15	Leu Val Phe Cys Pro Asp Leu Asp Pro Val Asn His Ala Glu His Gln			
	260	265	270	
	gtt aaa att ggt gtg gaa caa aaa tat ggt cag ttt cct caa ggc act			864
	Val Lys Ile Gly Val Glu Gln Lys Tyr Gly Gln Phe Pro Gln Gly Thr			
	275	280	285	
20	gaa gtg acc tat acg tgt tcg ggt aac tac ttc ttg atg ggt ttt aac			912
	Glu Val Thr Tyr Thr Cys Ser Gly Asn Tyr Phe Leu Met Gly Phe Asn			
	290	295	300	
	acc tta aaa tgt aac cct gat ggg tcc tgg tca gga tca cag cca tcc			960
	Thr Leu Lys Cys Asn Pro Asp Gly Ser Trp Ser Gly Ser Gln Pro Ser			
25	305	310	315	320
	tgt gtt aaa gtg gca gac aga gag gtc gac tgt gac agt aaa gct gta			1008
	Cys Val Lys Val Ala Asp Arg Glu Val Asp Cys Asp Ser Lys Ala Val			
	325	330	335	
	gac ttc ttg gat gat gtt ggt gaa cct gtc agg atc cac tgt cct gct			1056
30	Asp Phe Leu Asp Asp Val Gly Glu Pro Val Arg Ile His Cys Pro Ala			
	340	345	350	
	ggc tgt tct ttg aca gct ggt act gtg tgg ggt aca gcc ata tac cac			1104
	Gly Cys Ser Leu Thr Ala Gly Thr Val Trp Gly Thr Ala Ile Tyr His			

ES 2 650 170 T3

	355	360	365	
	gaa ctt tcc tca gtg tgt cgt gca gcc atc cat get ggc aag ctt cca			1152
	Glu Leu Ser Ser Val Cys Arg Ala Ala Ile His Ala Gly Lys Leu Pro			
	370	375	380	
5	aac tct gga ggg gcg gtg cat gta gtg aac aat ggc ccc tac tcg gac			1200
	Asn Ser Gly Gly Ala Val His Val Val Asn Asn Gly Pro Tyr Ser Asp			
	385	390	395	400
	ttt ctg ggt agt gac ctg aat ggg ata aaa tcg gaa gag ttg aag tct			1248
	Phe Leu Gly Ser Asp Leu Asn Gly Ile Lys Ser Glu Glu Leu Lys Ser			
10	405	410	415	
	ctt gcc cgc agt ttt cga ttt gat tat gtc agt tca tcc aca gca ggt			1296
	Leu Ala Arg Ser Phe Arg Phe Asp Tyr Val Ser Ser Ser Thr Ala Gly			
	420	425	430	
	aga tca gga tgt cct gat gga tgg ttt gag gta gaa gag aac tgt gtg			1344
15	Arg Ser Gly Cys Pro Asp Gly Trp Phe Glu Val Glu Glu Asn Cys Val			
	435	440	445	
	tac gtt aca tca aaa cag aga gcc tgg gaa aga get caa ggt gtg tgt			1392
	Tyr Val Thr Ser Lys Gln Arg Ala Trp Glu Arg Ala Gln Gly Val Cys			
	450	455	460	
20	acc aat atg gct gct cgt ctt gct gtg cta gac aaa gat cta att ccg			1440
	Thr Asn Met Ala Ala Arg Leu Ala Val Leu Asp Lys Asp Leu Ile Pro			
	465	470	475	480
	agt tcc ttg act gag act cta cga ggg aaa ggg tta aca acc aca tgg			1488
	Ser Ser Leu Thr Glu Thr Leu Arg Gly Lys Gly Leu Thr Thr Thr Trp			
25	485	490	495	
	ata gga ttg cac aga cta gat gct gag aag ccc ttt gtt tgg gag cta			1536
	Ile Gly Leu His Arg Leu Asp Ala Glu Lys Pro Phe Val Trp Glu Leu			
	500	505	510	
	atg gat cgt agt aat gtg gtt ctg aat gat aac cta aca ttc tgg gcc			1584
30	Met Asp Arg Ser Asn Val Val Leu Asn Asp Asn Leu Thr Phe Trp Ala			
	515	520	525	
	tct ggc gaa cct gga aat gaa act aac tgt gta tat ctg gac atc cga			1632
	Ser Gly Glu Pro Gly Asn Glu Thr Asn Cys Val Tyr Leu Asp Ile Arg			

ES 2 650 170 T3

	530	535	540	
	gat cag ctg cag cct gtg tgg aaa acc aag tca tgt ttt cag ccc tca			1680
	Asp Gln Leu Gln Pro Val Trp Lys Thr Lys Ser Cys Phe Gln Pro Ser			
	545	550	555	560
5	agc ttt gct tgc atg atg gat ttg tca gac aga aat aaa gcc aaa tgc			1728
	Ser Phe Ala Cys Met Met Asp Leu Ser Asp Arg Asn Lys Ala Lys Cys			
	565	570	575	
	gat gac cct gga cca ctg gaa aat gga cac gcc aca ctt cat gga caa			1776
	Asp Asp Pro Gly Pro Leu Glu Asn Gly His Ala Thr Leu His Gly Gln			
10	580	585	590	
	agt att gat ggg ttc tat gct ggt tct tct ata agg tac agc tgt gag			1824
	Ser Ile Asp Gly Phe Tyr Ala Gly Ser Ser Ile Arg Tyr Ser Cys Glu			
	595	600	605	
	gtt ctc cac tac ctc agt gga act gag acc gta act tgt aca aca aat			1872
15	Val Leu His Tyr Leu Ser Gly Thr Glu Thr Val Thr Cys Thr Thr Asn			
	610	615	620	
	ggc aca tgg agt gct cct aaa cct cga tgt atc aaa gtc atc acc tgc			1920
	Gly Thr Trp Ser Ala Pro Lys Pro Arg Cys Ile Lys Val Ile Thr Cys			
	625	630	635	640
20	caa aac cct cct gta cca tca tat ggt tct gtg gaa atc aaa ccc cca			1968
	Gln Asn Pro Pro Val Pro Ser Tyr Gly Ser Val Glu Ile Lys Pro Pro			
	645	650	655	
	agt cgg aca aac tcg atc agt cgt gtt ggg tca cct ttc ttg agg ttg			2016
	Ser Arg Thr Asn Ser Ile Ser Arg Val Gly Ser Pro Phe Leu Arg Leu			
25	660	665	670	
	cca cgg tta ccc ctc cca tta gcc aga gca gcc aaa cct cct cca aaa			2064
	Pro Arg Leu Pro Leu Pro Leu Ala Arg Ala Ala Lys Pro Pro Pro Lys			
	675	680	685	
	cct aga tcc tca caa ccc tct act gtg gac ttg gct tct aaa gtt aaa			2112
30	Pro Arg Ser Ser Gln Pro Ser Thr Val Asp Leu Ala Ser Lys Val Lys			
	690	695	700	
	cta cct gaa ggt cat tac cgg gta ggg tct cga gcc att tac acg tgc			2160
	Leu Pro Glu Gly His Tyr Arg Val Gly Ser Arg Ala Ile Tyr Thr Cys			

ES 2 650 170 T3

	705		710		715		720			
	gag tcg aga tac tac gaa cta ctt gga tct caa ggc aga aga tgt gac									2208
	Glu Ser Arg Tyr Tyr Glu Leu Leu Gly Ser Gln Gly Arg Arg Cys Asp									
			725		730		735			
5	tct aat gga aac tgg agt ggt cgg ccc get agc tgt att cca gtt tgt									2256
	Ser Asn Gly Asn Trp Ser Gly Arg Pro Ala Ser Cys Ile Pro Val Cys									
			740		745		750			
	gga cgg tca gac tct cct cgt tct cct ttc atc tgg aat ggg aat tct									2304
	Gly Arg Ser Asp Ser Pro Arg Ser Pro Phe Ile Trp Asn Gly Asn Ser									
10			755		760		765			
	aca gaa ata ggt cag tgg ccg tgg cag gca gga atc tct cga tgg ctt									2352
	Thr Glu Ile Gly Gln Trp Pro Trp Gln Ala Gly Ile Ser Arg Trp Leu									
			770		775		780			
	gca gac cac aat atg tgg ttt ctc cag tgt gga gga tcc cta ttg aat									2400
15	Ala Asp His Asn Met Trp Phe Leu Gln Cys Gly Gly Ser Leu Leu Asn									
			785		790		795		800	
	gag aaa tgg atc gtc act gct gcc cac tgt gtc acc tac tct gct act									2448
	Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Thr Tyr Ser Ala Thr									
			805		810		815			
20	gct gag ata att gat ccc agt cag ttt aaa atc tat ctg ggc aag tac									2496
	Ala Glu Ile Ile Asp Pro Ser Gln Phe Lys Ile Tyr Leu Gly Lys Tyr									
			820		825		830			
	tac cgt gat gac agt aga gac gat gac tac gta caa gta aga gag gct									2544
	Tyr Arg Asp Asp Ser Arg Asp Asp Asp Tyr Val Gln Val Arg Glu Ala									
25			835		840		845			
	ctc gag atc cac gta aat cct aac tac gac ccc ggc aat ctc aac ttt									2592
	Leu Glu Ile His Val Asn Pro Asn Tyr Asp Pro Gly Asn Leu Asn Phe									
			850		855		860			
	gac ata gcc cta att caa ctg aaa act cct gtt act ttg aca aca cga									2640
30	Asp Ile Ala Leu Ile Gln Leu Lys Thr Pro Val Thr Leu Thr Thr Arg									
			865		870		875		880	
	gtc caa cca atc tgt ctg cct act gac atc aca aca aga gaa cac ttg									2688
	Val Gln Pro Ile Cys Leu Pro Thr Asp Ile Thr Thr Arg Glu His Leu									

ES 2 650 170 T3

	885	890	895	
	aag gag gga aca tta gca gtg gtg aca ggt tgg ggt ttg aat gaa aac			2736
	Lys Glu Gly Thr Leu Ala Val Val Thr Gly Trp Gly Leu Asn Glu Asn			
	900	905	910	
5	aac aca tat tca gag atg att caa caa get gtg cta cct gtt gtt gca			2784
	Asn Thr Tyr Ser Glu Met Ile Gln Gln Ala Val Leu Pro Val Val Ala			
	915	920	925	
	gca agc acc tgt gaa gag ggg tac aag gaa gca gac tta cca ctg aca			2832
	Ala Ser Thr Cys Glu Glu Gly Tyr Lys Glu Ala Asp Leu Pro Leu Thr			
10	930	935	940	
	gta aca gag aac atg ttc tgt gca ggt tac aag aag gga cgt tat gat			2880
	Val Thr Glu Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Lys Gly Arg Tyr Asp			
	945	950	955	960
	gcc tgc agt ggg gac agt gga gga cca tta gtg ttt gct gat gat tcc			2928
15	Ala Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Phe Ala Asp Asp Ser			
	965	970	975	
	cgt acc gaa agg cgg tgg gtc ttg gaa ggg att gtc agc tgg ggc agt			2976
	Arg Thr Glu Arg Arg Trp Val Leu Glu Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser			
	980	985	990	
20	ccc agt gga tgt ggc aag gct aac cag tat ggg ggc ttc act aaa gtt			3024
	Pro Ser Gly Cys Gly Lys Ala Asn Gln Tyr Gly Gly Phe Thr Lys Val			
	995	1000	1005	
	aac gtt ttt cta tca tgg att agg cag ttc att tga			3060
	Asn Val Phe Leu Ser Trp Ile Arg Gln Phe Ile			
25	1010	1015		

<210> 2

<211> 1019

30 <212> PRT

<213> Tachypleus tridentatus

<400> 2

ES 2 650 170 T3

Met Val Leu Ala Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Val Leu Gly Ile Leu
 1 5 10 15
 Ala Gln Gln Met Arg Pro Val Gln Ser Arg Gly Val Asp Leu Gly Leu
 20 25 30
 5 Cys Asp Glu Thr Arg Phe Glu Cys Lys Cys Gly Asp Pro Gly Tyr Val
 35 40 45
 Phe Asn Val Pro Met Lys Gln Cys Thr Tyr Phe Tyr Arg Trp Arg Pro
 50 55 60
 Tyr Cys Lys Pro Cys Asp Asp Leu Glu Ala Lys Asp Ile Cys Pro Lys
 10 65 70 75 80
 Tyr Lys Arg Cys Gln Glu Cys Lys Ala Gly Leu Asp Ser Cys Val Thr
 85 90 95
 Cys Pro Pro Asn Lys Tyr Gly Thr Trp Cys Ser Gly Glu Cys Gln Cys
 100 105 110
 15 Lys Asn Gly Gly Ile Cys Asp Gln Arg Thr Gly Ala Cys Thr Cys Arg
 115 120 125
 Asp Arg Tyr Glu Gly Ala His Cys Glu Ile Leu Lys Gly Cys Pro Leu
 130 135 140
 Leu Pro Ser Asp Ser Gln Val Gln Glu Val Arg Asn Pro Pro Asp Asn
 20 145 150 155 160
 Pro Gln Thr Ile Asp Tyr Ser Cys Ser Pro Gly Phe Lys Leu Lys Gly
 165 170 175
 Val Ala Arg Ile Ser Cys Leu Pro Asn Gly Gln Trp Ser Ser Phe Pro
 180 185 190
 25 Pro Lys Cys Ile Arg Glu Cys Ala Lys Val Ser Ser Pro Glu His Gly
 195 200 205
 Lys Val Asn Ala Pro Ser Gly Asn Met Ile Glu Gly Ala Thr Leu Arg
 210 215 220
 Phe Ser Cys Asp Ser Pro Tyr Tyr Leu Ile Gly Gln Glu Thr Leu Thr
 30 225 230 235 240
 Cys Gln Gly Asn Gly Gln Trp Ser Gly Gln Ile Pro Gln Cys Lys Lys
 245 250 255
 Leu Val Phe Cys Pro Asp Leu Asp Pro Val Asn His Ala Glu His Gln

ES 2 650 170 T3

	260		265		270
	Val Lys Ile Gly Val Glu Gln Lys Tyr Gly Gln Phe Pro Gln Gly Thr				
	275		280		285
	Glu Val Thr Tyr Thr Cys Ser Gly Asn Tyr Phe Leu Met Gly Phe Asn				
5	290		295		300
	Thr Leu Lys Cys Asn Pro Asp Gly Ser Trp Ser Gly Ser Gln Pro Ser				
	305		310		315
	Cys Val Lys Val Ala Asp Arg Glu Val Asp Cys Asp Ser Lys Ala Val				
	325		330		335
10	Asp Phe Leu Asp Asp Val Gly Glu Pro Val Arg Ile His Cys Pro Ala				
	340		345		350
	Gly Cys Ser Leu Thr Ala Gly Thr Val Trp Gly Thr Ala Ile Tyr His				
	355		360		365
	Glu Leu Ser Ser Val Cys Arg Ala Ala Ile His Ala Gly Lys Leu Pro				
15	370		375		380
	Asn Ser Gly Gly Ala Val His Val Val Asn Asn Gly Pro Tyr Ser Asp				
	385		390		395
	Phe Leu Gly Ser Asp Leu Asn Gly Ile Lys Ser Glu Glu Leu Lys Ser				
	405		410		415
20	Leu Ala Arg Ser Phe Arg Phe Asp Tyr Val Ser Ser Ser Thr Ala Gly				
	420		425		430
	Arg Ser Gly Cys Pro Asp Gly Trp Phe Glu Val Glu Glu Asn Cys Val				
	435		440		445
	Tyr Val Thr Ser Lys Gln Arg Ala Trp Glu Arg Ala Gln Gly Val Cys				
25	450		455		460
	Thr Asn Met Ala Ala Arg Leu Ala Val Leu Asp Lys Asp Leu Ile Pro				
	465		470		475
	Ser Ser Leu Thr Glu Thr Leu Arg Gly Lys Gly Leu Thr Thr Thr Trp				
	485		490		495
30	Ile Gly Leu His Arg Leu Asp Ala Glu Lys Pro Phe Val Trp Glu Leu				
	500		505		510
	Met Asp Arg Ser Asn Val Val Leu Asn Asp Asn Leu Thr Phe Trp Ala				
	515		520		525

ES 2 650 170 T3

Ser Gly Glu Pro Gly Asn Glu Thr Asn Cys Val Tyr Leu Asp Ile Arg
 530 535 540
 Asp Gln Leu Gln Pro Val Trp Lys Thr Lys Ser Cys Phe Gln Pro Ser
 545 550 555 560
5 Ser Phe Ala Cys Met Met Asp Leu Ser Asp Arg Asn Lys Ala Lys Cys
 565 570 575
 Asp Asp Pro Gly Pro Leu Glu Asn Gly His Ala Thr Leu His Gly Gln
 580 585 590
 Ser Ile Asp Gly Phe Tyr Ala Gly Ser Ser Ile Arg Tyr Ser Cys Glu
10 595 600 605
 Val Leu His Tyr Leu Ser Gly Thr Glu Thr Val Thr Cys Thr Thr Asn
 610 615 620
 Gly Thr Trp Ser Ala Pro Lys Pro Arg Cys Ile Lys Val Ile Thr Cys
 625 630 635 640
15 Gln Asn Pro Pro Val Pro Ser Tyr Gly Ser Val Glu Ile Lys Pro Pro
 645 650 655
 Ser Arg Thr Asn Ser Ile Ser Arg Val Gly Ser Pro Phe Leu Arg Leu
 660 665 670
 Pro Arg Leu Pro Leu Pro Leu Ala Arg Ala Ala Lys Pro Pro Pro Lys
20 675 680 685
 Pro Arg Ser Ser Gln Pro Ser Thr Val Asp Leu Ala Ser Lys Val Lys
 690 695 700
 Leu Pro Glu Gly His Tyr Arg Val Gly Ser Arg Ala Ile Tyr Thr Cys
 705 710 715 720
25 Glu Ser Arg Tyr Tyr Glu Leu Leu Gly Ser Gln Gly Arg Arg Cys Asp
 725 730 735
 Ser Asn Gly Asn Trp Ser Gly Arg Pro Ala Ser Cys Ile Pro Val Cys
 740 745 750
 Gly Arg Ser Asp Ser Pro Arg Ser Pro Phe Ile Trp Asn Gly Asn Ser
30 755 760 765
 Thr Glu Ile Gly Gln Trp Pro Trp Gln Ala Gly Ile Ser Arg Trp Leu
 770 775 780
 Ala Asp His Asn Met Trp Phe Leu Gln Cys Gly Gly Ser Leu Leu Asn

ES 2 650 170 T3

785 790 795 800
 Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Thr Tyr Ser Ala Thr
 805 810 815
 Ala Glu Ile Ile Asp Pro Ser Gln Phe Lys Ile Tyr Leu Gly Lys Tyr
 5 820 825 830
 Tyr Arg Asp Asp Ser Arg Asp Asp Asp Tyr Val Gln Val Arg Glu Ala
 835 840 845
 Leu Glu Ile His Val Asn Pro Asn Tyr Asp Pro Gly Asn Leu Asn Phe
 850 855 860
 10 Asp Ile Ala Leu Ile Gln Leu Lys Thr Pro Val Thr Leu Thr Thr Arg
 865 870 875 880
 Val Gln Pro Ile Cys Leu Pro Thr Asp Ile Thr Thr Arg Glu His Leu
 885 890 895
 Lys Glu Gly Thr Leu Ala Val Val Thr Gly Trp Gly Leu Asn Glu Asn
 15 900 905 910
 Asn Thr Tyr Ser Glu Met Ile Gln Gln Ala Val Leu Pro Val Val Ala
 915 920 925
 Ala Ser Thr Cys Glu Glu Gly Tyr Lys Glu Ala Asp Leu Pro Leu Thr
 930 935 940
 20 Val Thr Glu Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Lys Gly Arg Tyr Asp
 945 950 955 960
 Ala Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Phe Ala Asp Asp Ser
 965 970 975
 Arg Thr Glu Arg Arg Trp Val Leu Glu Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser
 25 980 985 990
 Pro Ser Gly Cys Gly Lys Ala Asn Gln Tyr Gly Gly Phe Thr Lys Val
 995 1000 1005
 Asn Val Phe Leu Ser Trp Ile Arg Gln Phe Ile
 1010 1015
 30

<210> 3

<211> 1203

ES 2 650 170 T3

<212> ADN

<213> Tachypleus tridentatus

<220>

5 <221> CDS

<222> (1)..(1203)

<223>

<400> 3

10	atg acg tgg ata tgt gtg ata acg ttg ttt gct ctg gct tct gct acg	48
	Met Thr Trp Ile Cys Val Ile Thr Leu Phe Ala Leu Ala Ser Ala Thr	
	1 5 10 15	
	ttg ggt aac aaa gtt agt aga gtg ggg gtc ctc ttc ccc aag aca cgg	96
	Leu Gly Asn Lys Val Ser Arg Val Gly Val Leu Phe Pro Lys Thr Arg	
15	20 25 30	
	aac gac aat gag tgt aca gca aga ggg gga ttg aaa gga tcc tgc aaa	144
	Asn Asp Asn Glu Cys Thr Ala Arg Gly Gly Leu Lys Gly Ser Cys Lys	
	35 40 45	
	tcc ctc ata gac tgt cct agt gtc ttg gct acg ttg aag gac agt ttt	192
20	Ser Leu Ile Asp Cys Pro Ser Val Leu Ala Thr Leu Lys Asp Ser Phe	
	50 55 60	
	cct gtc gtt tgc tct tgg aat ggt cga ttt cag cct att gtc tgc tgt	240
	Pro Val Val Cys Ser Trp Asn Gly Arg Phe Gln Pro Ile Val Cys Cys	
	65 70 75 80	
25	cct gat gca ata gca cca cca cct gta acc aca aca gct gta act gta	288
	Pro Asp Ala Ile Ala Pro Pro Pro Val Thr Thr Thr Ala Val Thr Val	
	85 90 95	
	ata tct aca aaa gaa cca aag ctt cca aga tta cat ata tca ggt tgt	336
	Ile Ser Thr Lys Glu Pro Lys Leu Pro Arg Leu His Ile Ser Gly Cys	
30	100 105 110	
	gga aaa aga aaa gtc aaa ata gat att aca act gtt gga cgc tct gga	384
	Gly Lys Arg Lys Val Lys Ile Asp Ile Thr Thr Val Gly Arg Ser Gly	
	115 120 125	

ES 2 650 170 T3

tca cca ata ctt cct ccg ata tct act cct caa aat tca aca ggt ggg 432
 Ser Pro Ile Leu Pro Pro Ile Ser Thr Pro Gln Asn Ser Thr Gly Gly
 130 135 140
 aga gga att att gct gga ggc gta gaa gcc aaa att ggc gcg tgg cct 480
 5 Arg Gly Ile Ile Ala Gly Gly Val Glu Ala Lys Ile Gly Ala Trp Pro
 145 150 155 160
 tgg atg gca gct gtt ttt gtg aaa aac ttt ggc att ggc aga ttc cac 528
 Trp Met Ala Ala Val Phe Val Lys Asn Phe Gly Ile Gly Arg Phe His
 165 170 175
 10 tgt gct ggt agc ata atc agt aac aag tac att ttg tca gct gcc cac 576
 Cys Ala Gly Ser Ile Ile Ser Asn Lys Tyr Ile Leu Ser Ala Ala His
 180 185 190
 gcc ttc ctt atc gga ggt cga aag ttg acc cca act cgc tta gct gtc 624
 Ala Phe Leu Ile Gly Gly Arg Lys Leu Thr Pro Thr Arg Leu Ala Val
 15 195 200 205
 cgt gtg gga ggc cac tac ata aag agg ggt caa gag tat cca gtg aaa 672
 Arg Val Gly Gly His Tyr Ile Lys Arg Gly Gln Glu Tyr Pro Val Lys
 210 215 220
 gac gtg att atc cat cct cat tat gta gaa aag gag aac tac aat gat 720
 20 Asp Val Ile Ile His Pro His Tyr Val Glu Lys Glu Asn Tyr Asn Asp
 225 230 235 240
 ata gcc ata atc gag tta aaa gag gaa ctg aac ttt acg gac ttg gtc 768
 Ile Ala Ile Ile Glu Leu Lys Glu Glu Leu Asn Phe Thr Asp Leu Val
 245 250 255
 25 aat cct ata tgt ctc cct gat cca gag aca gta acg gat cca tta aaa 816
 Asn Pro Ile Cys Leu Pro Asp Pro Glu Thr Val Thr Asp Pro Leu Lys
 260 265 270
 gac aga att gtg act gca gcg gga tgg ggc gat ctg gat ttc tcc ggt 864
 Asp Arg Ile Val Thr Ala Ala Gly Trp Gly Asp Leu Asp Phe Ser Gly
 30 275 280 285
 cca cgg agc caa gtt cta cgt gag gta agc atc cca gtt gtt cca gtt 912
 Pro Arg Ser Gln Val Leu Arg Glu Val Ser Ile Pro Val Val Pro Val
 290 295 300

ES 2 650 170 T3

gat aaa tgt gat caa gcc tat gag aaa ctc aac acc cct tca cta aaa 960
 Asp Lys Cys Asp Gln Ala Tyr Glu Lys Leu Asn Thr Pro Ser Leu Lys
 305 310 315 320
 aat ggg ata acg aat aac ttc ctt tgc gct gga ttg gaa gaa gga ggg 1008
 5 Asn Gly Ile Thr Asn Asn Phe Leu Cys Ala Gly Leu Glu Glu Gly Gly
 325 330 335
 aaa gac gct tgc caa ggc gat tct ggt gga ccg ttg atg cta gtg aac 1056
 Lys Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Leu Val Asn
 340 345 350
 10 aac act agg tgg ata gta gta gga gtt gtg tcg ttc ggg cac aag tgt 1104
 Asn Thr Arg Trp Ile Val Val Gly Val Val Ser Phe Gly His Lys Cys
 355 360 365
 gcc gag gaa gga tat cct ggt gtg tac tcg cgc gta gcg agt tac cta 1152
 Ala Glu Glu Gly Tyr Pro Gly Val Tyr Ser Arg Val Ala Ser Tyr Leu
 15 370 375 380
 gac tgg atc gcg aaa gtt acg aac tcg tta gat cat gcc gtc act aac 1200
 Asp Trp Ile Ala Lys Val Thr Asn Ser Leu Asp His Ala Val Thr Asn
 385 390 395 400
 taa 1203
 20
 <210> 4
 <211> 400
 <212> PRT
 25 <213> Tachypleus tridentatus
 <400> 4
 Met Thr Trp Ile Cys Val Ile Thr Leu Phe Ala Leu Ala Ser Ala Thr
 1 5 10 15
 30 Leu Gly Asn Lys Val Ser Arg Val Gly Val Leu Phe Pro Lys Thr Arg
 20 25 30
 Asn Asp Asn Glu Cys Thr Ala Arg Gly Gly Leu Lys Gly Ser Cys Lys
 35 40 45

ES 2 650 170 T3

Ser Leu Ile Asp Cys Pro Ser Val Leu Ala Thr Leu Lys Asp Ser Phe
50 55 60
Pro Val Val Cys Ser Trp Asn Gly Arg Phe Gln Pro Ile Val Cys Cys
65 70 75 80
5 Pro Asp Ala Ile Ala Pro Pro Pro Val Thr Thr Thr Ala Val Thr Val
85 90 95
Ile Ser Thr Lys Glu Pro Lys Leu Pro Arg Leu His Ile Ser Gly Cys
100 105 110
Gly Lys Arg Lys Val Lys Ile Asp Ile Thr Thr Val Gly Arg Ser Gly
10 115 120 125
Ser Pro Ile Leu Pro Pro Ile Ser Thr Pro Gln Asn Ser Thr Gly Gly
130 135 140
Arg Gly Ile Ile Ala Gly Gly Val Glu Ala Lys Ile Gly Ala Trp Pro
145 150 155 160
15 Trp Met Ala Ala Val Phe Val Lys Asn Phe Gly Ile Gly Arg Phe His
165 170 175
Cys Ala Gly Ser Ile Ile Ser Asn Lys Tyr Ile Leu Ser Ala Ala His
180 185 190
Ala Phe Leu Ile Gly Gly Arg Lys Leu Thr Pro Thr Arg Leu Ala Val
20 195 200 205
Arg Val Gly Gly His Tyr Ile Lys Arg Gly Gln Glu Tyr Pro Val Lys
210 215 220
Asp Val Ile Ile His Pro His Tyr Val Glu Lys Glu Asn Tyr Asn Asp
225 230 235 240
25 Ile Ala Ile Ile Glu Leu Lys Glu Glu Leu Asn Phe Thr Asp Leu Val
245 250 255
Asn Pro Ile Cys Leu Pro Asp Pro Glu Thr Val Thr Asp Pro Leu Lys
260 265 270
Asp Arg Ile Val Thr Ala Ala Gly Trp Gly Asp Leu Asp Phe Ser Gly
30 275 280 285
Pro Arg Ser Gln Val Leu Arg Glu Val Ser Ile Pro Val Val Pro Val
290 295 300
Asp Lys Cys Asp Gln Ala Tyr Glu Lys Leu Asn Thr Pro Ser Leu Lys

ES 2 650 170 T3

305 310 315 320
 Asn Gly Ile Thr Asn Asn Phe Leu Cys Ala Gly Leu Glu Glu Gly Gly
 325 330 335
 Lys Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Leu Val Asn
5 340 345 350
 Asn Thr Arg Trp Ile Val Val Gly Val Val Ser Phe Gly His Lys Cys
 355 360 365
 Ala Glu Glu Gly Tyr Pro Gly Val Tyr Ser Arg Val Ala Ser Tyr Leu
 370 375 380
10 Asp Trp Ile Ala Lys Val Thr Asn Ser Leu Asp His Ala Val Thr Asn
 385 390 395 400

<210> 5
15 <211> 1128
 <212> ADN
 <213> Tachypleus tridentatus

<220>
20 <221> CDS
 <222> (1)..(1128)
 <223>

<400> 5
25 atg ttg gtg aat aac gtg ttt tca cta ctg tgt ttc cca ctc ttg atg 48
 Met Leu Val Asn Asn Val Phe Ser Leu Leu Cys Phe Pro Leu Leu Met
 1 5 10 15
 tct gtg gtt aga tgc agt act ctc agc aga cag cgt aga cag ttt gtt 96
 Ser Val Val Arg Cys Ser Thr Leu Ser Arg Gln Arg Arg Gln Phe Val
30 20 25 30
 ttc cct gac gag gaa gaa ctt tgc tca aac cga ttt act gaa gaa gga 144
 Phe Pro Asp Glu Glu Glu Leu Cys Ser Asn Arg Phe Thr Glu Glu Gly
 35 40 45

ES 2 650 170 T3

aca tgc aaa aat gtc ttg gat tgt aga ata ctt tta caa aaa aat gat 192
 Thr Cys Lys Asn Val Leu Asp Cys Arg Ile Leu Leu Gln Lys Asn Asp
 50 55 60

tat aat tta ctc aaa gaa tca ata tgc ggc ttt gaa ggc ata aca ccc 240
 5 Tyr Asn Leu Leu Lys Glu Ser Ile Cys Gly Phe Glu Gly Ile Thr Pro
 65 70 75 80

aaa gtt tgt tgt ccg aaa tca agc cat gta att tca agt aca cag gca 288
 Lys Val Cys Cys Pro Lys Ser Ser His Val Ile Ser Ser Thr Gln Ala
 85 90 95

10 cct cca gaa acc act acg act gaa cgc cca cca aaa cag ata cca ccc 336
 Pro Pro Glu Thr Thr Thr Thr Glu Arg Pro Pro Lys Gln Ile Pro Pro
 100 105 110

aat ctt cat gaa gtg tgt gga att cac aat act aca act acc agg att 384
 Asn Leu His Glu Val Cys Gly Ile His Asn Thr Thr Thr Thr Arg Ile
 15 115 120 125

att gga ggt cgg gaa gca cct att gga gcc tgg ccg tgg atg act gct 432
 Ile Gly Gly Arg Glu Ala Pro Ile Gly Ala Trp Pro Trp Met Thr Ala
 130 135 140

gtc tac ata aaa caa gga gga atc aga agt gtt cag tgt ggt ggc gca 480
 20 Val Tyr Ile Lys Gln Gly Gly Ile Arg Ser Val Gln Cys Gly Gly Ala
 145 150 155 160

ctt gtc act aac agg cac gtg att aca gct tgc cac tgt gtt gta aac 528
 Leu Val Thr Asn Arg His Val Ile Thr Ala Ser His Cys Val Val Asn
 165 170 175

25 agt gca gga aca gat gtg atg cca gct gat gta ttc tgc gtt cgt ctg 576
 Ser Ala Gly Thr Asp Val Met Pro Ala Asp Val Phe Ser Val Arg Leu
 180 185 190

ggt gaa cac aat tta tac agt acc gat gac gat tgc aat cca ata gat 624
 Gly Glu His Asn Leu Tyr Ser Thr Asp Asp Asp Ser Asn Pro Ile Asp
 30 195 200 205

ttt gca gtt acg tgc gtg aaa cat cac gaa cac ttt gta ctc gcg acg 672
 Phe Ala Val Thr Ser Val Lys His His Glu His Phe Val Leu Ala Thr
 210 215 220

ES 2 650 170 T3

tat ttg aat gac atc gca att cta acg tta aat gac aca gtt acg ttt 720
Tyr Leu Asn Asp Ile Ala Ile Leu Thr Leu Asn Asp Thr Val Thr Phe
225 230 235 240
aca gac aga att cga ccc att tgt cta cct tat cgt aag ttg aga tac 768
5 Thr Asp Arg Ile Arg Pro Ile Cys Leu Pro Tyr Arg Lys Leu Arg Tyr
245 250 255
gat gat cta gca atg aga aaa ccg ttt atc act gga tgg gga aca aca 816
Asp Asp Leu Ala Met Arg Lys Pro Phe Ile Thr Gly Trp Gly Thr Thr
260 265 270
10 gca ttt aac ggc cca tct agt gca gtg ttg aga gaa gta cag tta cca 864
Ala Phe Asn Gly Pro Ser Ser Ala Val Leu Arg Glu Val Gln Leu Pro
275 280 285
ata tgg gaa cac gag gcc tgt aga cag gcc tac gag aag gat tta aat 912
Ile Trp Glu His Glu Ala Cys Arg Gln Ala Tyr Glu Lys Asp Leu Asn
15 290 295 300
att aca aac gtg tat atg tgt gct ggc ttt gca gat ggc ggg aag gat 960
Ile Thr Asn Val Tyr Met Cys Ala Gly Phe Ala Asp Gly Gly Lys Asp
305 310 315 320
gct tgc cag ggt gat tct gga ggt cca atg atg ttg cct gtt aaa acc 1008
20 Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Met Met Leu Pro Val Lys Thr
325 330 335
gga gag ttt tat ctc att gga att gtg tct ttc gga aag aaa tgc gca 1056
Gly Glu Phe Tyr Leu Ile Gly Ile Val Ser Phe Gly Lys Lys Cys Ala
340 345 350
25 ttg cct gga ttt cct ggg gtt tac aca aaa gtg aca gag ttt tta gat 1104
Leu Pro Gly Phe Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Glu Phe Leu Asp
355 360 365
tgg att gca gaa cat atg gtg tag 1128
Trp Ile Ala Glu His Met Val
30 370 375

ES 2 650 170 T3

<211> 375

<212> PRT

<213> Tachypleus tridentatus

5 <400> 6

Met Leu Val Asn Asn Val Phe Ser Leu Leu Cys Phe Pro Leu Leu Met

1 5 10 15

Ser Val Val Arg Cys Ser Thr Leu Ser Arg Gln Arg Arg Gln Phe Val

20 25 30

10 Phe Pro Asp Glu Glu Glu Leu Cys Ser Asn Arg Phe Thr Glu Glu Gly

35 40 45

Thr Cys Lys Asn Val Leu Asp Cys Arg Ile Leu Leu Gln Lys Asn Asp

50 55 60

Tyr Asn Leu Leu Lys Glu Ser Ile Cys Gly Phe Glu Gly Ile Thr Pro

15 65 70 75 80

Lys Val Cys Cys Pro Lys Ser Ser His Val Ile Ser Ser Thr Gln Ala

85 90 95

Pro Pro Glu Thr Thr Thr Thr Glu Arg Pro Pro Lys Gln Ile Pro Pro

100 105 110

20 Asn Leu His Glu Val Cys Gly Ile His Asn Thr Thr Thr Thr Arg Ile

115 120 125

Ile Gly Gly Arg Glu Ala Pro Ile Gly Ala Trp Pro Trp Met Thr Ala

130 135 140

Val Tyr Ile Lys Gln Gly Gly Ile Arg Ser Val Gln Cys Gly Gly Ala

25 145 150 155 160

Leu Val Thr Asn Arg His Val Ile Thr Ala Ser His Cys Val Val Asn

165 170 175

Ser Ala Gly Thr Asp Val Met Pro Ala Asp Val Phe Ser Val Arg Leu

180 185 190

30 Gly Glu His Asn Leu Tyr Ser Thr Asp Asp Asp Ser Asn Pro Ile Asp

195 200 205

Phe Ala Val Thr Ser Val Lys His His Glu His Phe Val Leu Ala Thr

210 215 220

ES 2 650 170 T3

aaatatggta cttggtgtag cggatgaatgt caatgtaaga atggaggtat ctgtgaccag 360
 aggacaggag cttgtacctg tcgtgacaga tatgaaggag cgcactgtga aattctcaaa 420
 gttgtcctc ttcttccatc ggattctcaa gttcaggaag tcagaaacc accagataat 480
 ccccaacta ttgactacag ctgttcacca gggttcaagc ttaaaggcgt ggcacgaatt 540
5 agctgtctcc caaatggaca gtggagtagc tttccacca aatgtattcg agaatgtgcc 600
 aaggtttcat ctccagaaca cgggaaagtg aatgctccta gtggcaatat gatagaaggg 660
 gctactttac gtttctcatg tgatagtccc tactacttga ttggtcaaga aacattaacc 720
 tgccagggta atggtcagtg gagtggacaa ataccacaat gtaagaagtt ggtcttctgt 780
 cctgacctg atcctgtaaa ccatgtgaa caccaggta aaattggtgt ggaacaaaaa 840
10 tatggtcagt ttcctcaagg cactgaagtg acctatacgt gttcgggtaa ctacttcttg 900
 atgggtttta acaccttaa atgtaaccct gatgggtcct gtcaggatc acagccatcc 960
 tgtgttaaag tggcagacag agaggtcgac tgtgacagta aagctgtaga cttcttggat 1020
 gatgttgggta aacctgtcag gatccactgt cctgctggct gttctttgac agctgggtact 1080
 gtgtggggta cagccatata ccacgaactt tcctcagtgt gtcgtgcagc catccatgct 1140
15 ggcaagcttc caaactctgg aggggcgggtg catgtagtga acaatggccc ctactcggac 1200
 tttctgggta gtgacctgaa tgggataaaa tcggaagagt tgaagtctct tgcccgcagt 1260
 tttcgatttg attatgtcag ttcattccaca gcaggtagat caggatgtcc tgatggatgg 1320
 tttgaggtag aagagaactg tgtgtacggt acatcaaaac agagagcctg ggaaagagct 1380
 caaggtgtgt gtaccaatat ggctgctcgt cttgctgtgc tagacaaaga tctaattccg 1440
20 agttccttga ctgagactct acgagggaaa gggtaacaa ccacatggat aggattgcac 1500
 agactagatg ctgagaagcc ctttgtttgg gagctaatgg atcgtagtaa tgtggttctg 1560
 aatgataacc taacattctg ggcctctggc gaacctggaa atgaaactaa ctgtgtatat 1620
 ctggacatcc gagatcagct gcagcctgtg tggaaaacca agtcatgttt tcagccctca 1680
 agctttgctt gcatgatgga tttgtcagac agaaataaag ccaaatgcga tgaccctgga 1740
25 ccactggaaa atggacacgc cacacttcat ggacaaagta ttgatgggtt ctatgctggt 1800
 tctctataa ggtacagctg tgaggttctc cactacctca gtggaactga gaccgtaact 1860
 tgtacaacaa atggcacatg gactgtcctt aaacctgat gtatcaaagt catcacctgc 1920
 caaaaccctc ctgtaccatc atatggttct gtggaaatca aaccccaag tcggacaaac 1980
 tcgatcagtc gtgttgggct acccttcttg aggttgcac gttaccct cccattagcc 2040
30 agagcagcca aacctctcc aaaacctaga tctcacaac cctctactgt ggacttggct 2100
 tctaaagtta aactacctga aggtcattac cgggtagggt ctcgagccat ttacacgtgc 2160
 gactcgagat actacgaact acttggatct caaggcagaa gatgtgactc taatgaaac 2220
 tggagtggtc ggcccgtag ctgtattcca gtttgggac gtcagactc tctcgttct 2280

ES 2 650 170 T3

cctttcatct ggaatgggaa ttctacagaa ataggtcagt ggccgtggca ggcaggaatc 2340
 tctcgatggc ttgcagacca caatatgtgg tttctccagt gtggaggate cctattgaa 2400
 gagaaatgga tcgtcactgc tgcccactgt gtcacctact ctgctactgc tgagataatt 2460
 gatcccagtc agtttaaaat ctatctgggc aagtactacc gtgatgacag tagagacgat 2520
 5 gactacgtac aagtaagaga ggctctcgag atccacgtaa atcctaacta cgaccccggc 2580
 aatctcaact ttgacatagc cctaattcaa ctgaaaactc ctgttacttt gacaacacga 2640
 gtccaaccaa tctgtctgcc tactgacatc acaacaagag aacacttgaa ggagggaaca 2700
 ttagcagtgg tgacaggttg gggtttgaat gaaaacaaca catattcaga gatgattcaa 2760
 caagctgtgc tacctgttgt tgcagcaagc acctgtgaag aggggtacaa ggaagcagac 2820
 10 ttaccactga cagtaacaga gaacatgttc tgtgcaggtt acaagaaggg acgttatgat 2880
 gcctgcagtg gggacagtgg aggaccatta gtgtttgctg atgattcccg taccgaaagg 2940
 cgggtgggtct tgggaaggat tgtcagctgg ggcagtccca gtggatgtgg caaggctaac 3000
 cagtatgggg gcttcactaa agttaacgtt tttctatcat ggattaggca gttcattcat 3060
 catcaccatc accattga 3078

15

- <210> 8
- <211> 1203
- <212> ADN

20 <213> Tachypleus tridentatus

<400> 8

atgacctgga tctgcgtgat caccctgttc gctctggctt ccgctaccct gggcaacaag 60
 gtgtcccgtg tgggtgtcct gttccccaag acccgtaacg acaacgagtg caccgctcgt 120
 25 ggtggctctga agggtcctg caagtccctg atcgactgcc cctccgtgct ggctaccctg 180
 aaggactcct tccccgtcgt gtgctcctgg aacggctggt tccagcccat cgtgtgctgc 240
 cccgacgcta tcgtcctccc cctgtgacc accaccgctg tgaccgtgat ctccaccaag 300
 gagcccaagc tgccccgtct gcacatctcc ggttgcggca agcgcaaggt caagatcgac 360
 atcaccaccg tgggcccgttc cggttccccc atctgcccc ccatctccac cccccagaac 420
 30 tccactgggtg gtcgtggtat categtggc ggtgtcgagg ctaagatcgg tgcttggecc 480
 tggatggctg ctgtgttcgt gaagaacttc ggtatcggtc gcttcactg cgctggttcc 540
 atcatctcca acaagtacat cctgtccgct gctcacgctt tcctcatcgg tggctgcaag 600
 ctgaccccca cccgtctggc tgtgcgtgtg ggtggtcact acatcaagcg tggccaggag 660

ES 2 650 170 T3

	taccocgtca aggacgtgat catccacccc cactacgtgg agaaggagaa ctacaacgac	720
	atcgccatca tcgagctgaa ggaggagctg aacttcaccg acctggtea ccccatctgc	780
	ctgcccgacc ccgagactgt gaccgaccct ctgaaggacc gtatcgtgac cgctgctggc	840
	tggggcgacc tggacttctc cggteccccg tcccaggctg tgcgtgaggt gtccatcccc	900
5	gtggtgcccc tggacaagtg cgaccaggct tacgagaagc tgaacacccc ctccctgaag	960
	aacggtatta ccaacaactt cctctgcgcc ggactcgagg aggttgcaa ggacgcttgc	1020
	cagggcgact ccggtggtcc cctgatgctg gtcaacaaca cccgttgat cgctgtgggt	1080
	gtcgtgtcct tcggtcacaa gtgcgctgag gagggttacc ccggcgtcta ctcccgtgtg	1140
	gcttctacc tggactggat cgctaaggtc accaactccc tggaccacgc tgtcaccaac	1200
10	taa	1203

<210> 9

<211> 1128

15 <212> ADN

<213> *Tachypleus tridentatus*

<400> 9

	atgctggtca acaacgtggt ctccctgctg tgettcccc tgetgatgac cgctgtgcgt	60
20	tgtcccaccc tgtcccgtca gcgtcgtcag ttctgttcc ccgacgaaga ggagctgtgc	120
	tccaaccgtt tcaccgagga gggcacttgc aagaacgtgc tggactgccc tatcctgctg	180
	cagaagaacg actacaacct cctgaaggag tccatctgcg gtttcgaggg tatactccc	240
	aaggtctgct gcccgaagtc ctcccacgtg atctccagca cccaggctcc ccccgagact	300
	accaccaccg agcgtcccc caagcagatc ccccccaacc tccacgaggt ctgcggtatc	360
25	cacaacacca ccaccaccg tatcatcggt ggtcgcgagg ctcccatcgg tgcttgccc	420
	tggatgaccg ctgtgtacat caagcagggt ggtatccggt ccgtgcagtg cggaggtgct	480
	ctggtcacca accgtcacgt gatcaccgct tcccactgcg tggtaacte cgctggcacc	540
	gacgtgatgc ccgctgacgt gttctctgtg cgtctgggcg agcacaacct gtactccacc	600
	gacgacgact ccaaccccat cgacttcgct gtgacctccg tgaagcacca cgagcacttc	660
30	gtgetggcta cctacctgaa cgacategct atctgactc tgaacgacac cgtgacctc	720
	accgaccgta tccgtcccat ctgcctgccc taccgcaagc tgcgttacga cgacctggct	780
	atgcgcaagc ccttcatcac cggctggggc accaccgctt tcaacggctc ctctccgct	840
	gtgetgctg aggtgcagct gcccatctgg gagcacgagg cttgccgtca ggcttacgag	900

ES 2 650 170 T3

aaggacctga acatcaccaa cgtgtacatg tgcgctggtt tcgctgacgg tggcaaggac 960
gcttgccagg gcgactccgg tggteccatg atgetgcccg tcaagaccgg cgagttctac 1020
ctgatcggtta tcgtgtcctt cggcaagaag tgcgctctgc cgggtttccc cgggtgtctac 1080
accaaggtca ccgagttcct cgactggatc gccgagcaca tgggtgtaa 1128

5

<210> 10

<211> 30

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador FC-N-Pst

15 <400> 10

caactgcaga tggctcttagc gtcgtttttg 30

<210> 11

20 <211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> cebador FC-notag-R-Bam

<400> 11

caggatcctc aatgaactg cctaattccat gat 33

30

<210> 12

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido

5

<400> 12

Ile Glu Gly Arg

1

10

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir un agente de medición de endotoxinas que comprende las siguientes proteínas (1) a (3) de *Tachypleus tridentatus*, cada una de ellas es una proteína recombinante que no tienen una secuencia de marcador His en el extremo C-terminal o cualquier otro péptido en cualquier extremo terminal y se obtiene a partir de células de insectos como un huésped:

- (1) factor C que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No.: 2;
- (2) factor B que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No.: 4; y
- (3) enzima procoagulante que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No.: 6,

comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas (A) a (E):

(A) una etapa de incorporar cada uno de los siguientes ADN (1) a (3) de *Tachypleus tridentatus* en un ADN viral;

- (1) ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.: 2;
- (2) ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.: 4; y
- (3) ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.: 6;

- (B) una etapa de infectar células de insectos con el virus en el que se ha incorporado cada uno de dichos ADN;
- (C) una etapa de permitir que las células de insecto infectadas con cada uno de dichos virus expresen la proteína codificada por cada uno de dichos ADN;
- (D) una etapa de recuperar el factor C, el factor B y el enzima procoagulante como una solución y eliminar el virus mediante una membrana de filtración de fibras huecas con un tamaño de poro de 500 kDa; y
- (E) una etapa de formular el agente de medición de endotoxinas.

2. Procedimiento para producir a un agente de medición de endotoxinas que comprende las siguientes proteínas (1) a (3) de *Tachypleus tridentatus*, cada una de ellas es una proteína recombinante que no tiene una secuencia de marcador His en el extremo C-terminal o cualquier otro péptido en cualquier extremo terminal y se obtiene a partir de células de insectos como un huésped:

- (1) factor C que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No.: 2;
- (2) factor B que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No.: 4; y
- (3) enzima procoagulante que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No.: 6,

comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas (A) a (E):

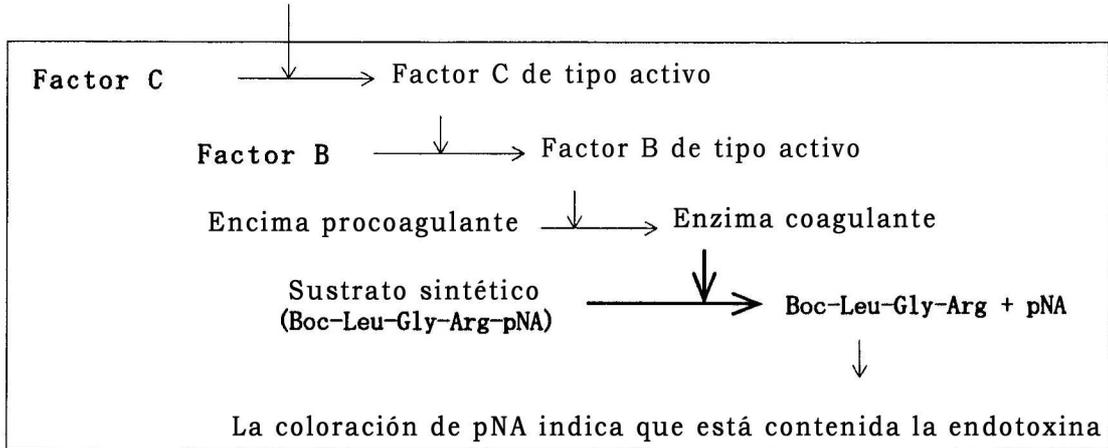
(A) una etapa de incorporar cada uno de los siguientes ADN (1) a (3) de *Tachypleus tridentatus* en un vector;

- (1) ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.: 2;
- (2) ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.: 4; y
- (3) ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.: 6;

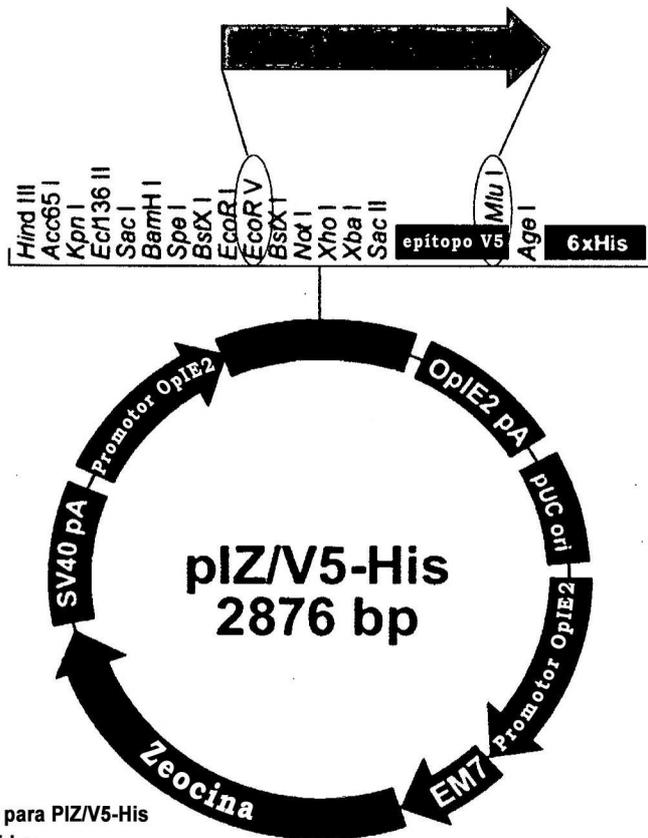
- (B) una etapa de introducir el vector, en el que se ha incorporado cada uno de dichos ADN, en células de insectos para incorporar cada uno de dichos ADN en el cromosoma de las células de insecto;
- (C) una etapa de permitir que las células de insecto, en las que se ha incorporado cada uno de dichos ADN, exprese la proteína codificada por cada uno de dichos ADN;
- (D) una etapa de recuperar el factor C, el factor B y el enzima procoagulante como una solución y
- (E) una etapa de formular el agente de medición de endotoxinas.

[Fig.1]

Muestra de ensayo que contiene endotoxina

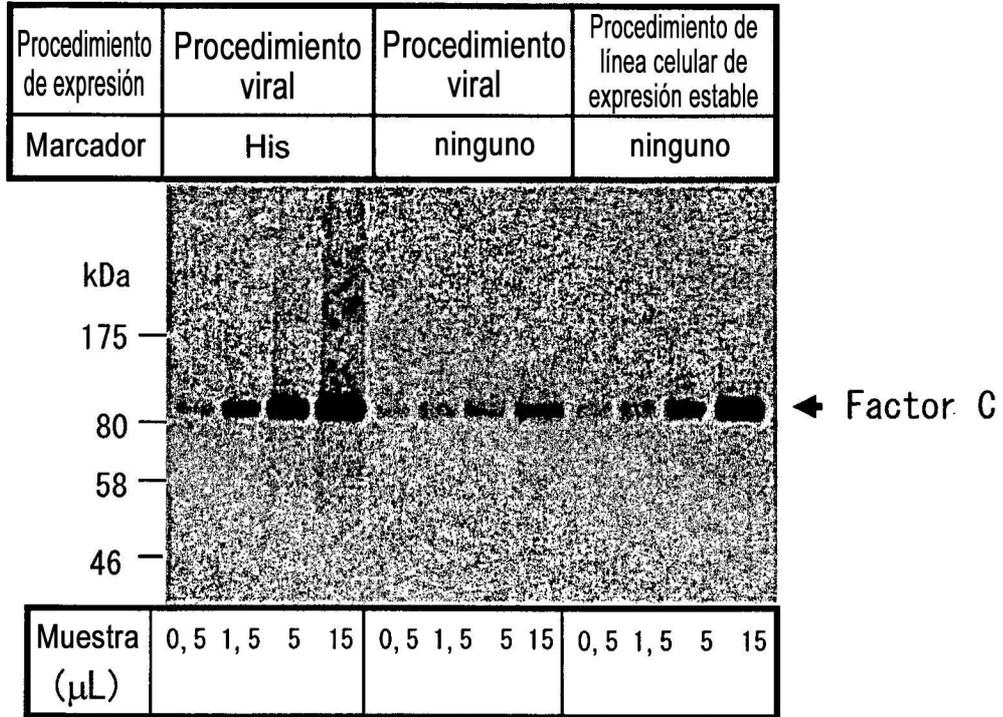


[Fig.2]

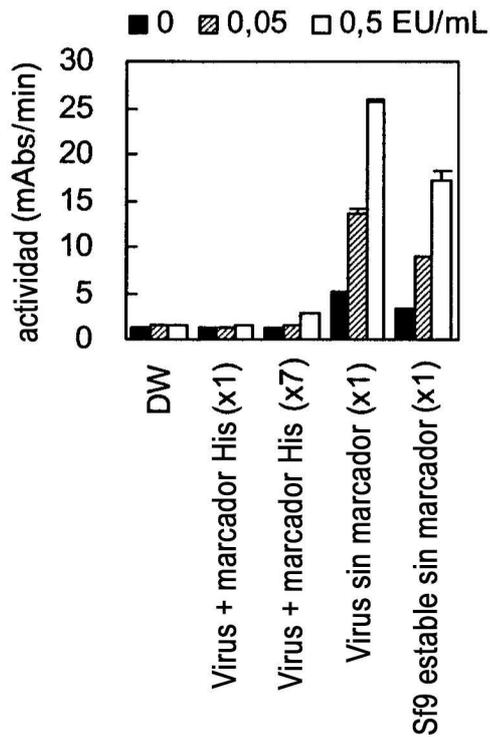


Comentarios para pIZ/V5-His
2876 nucleótidos

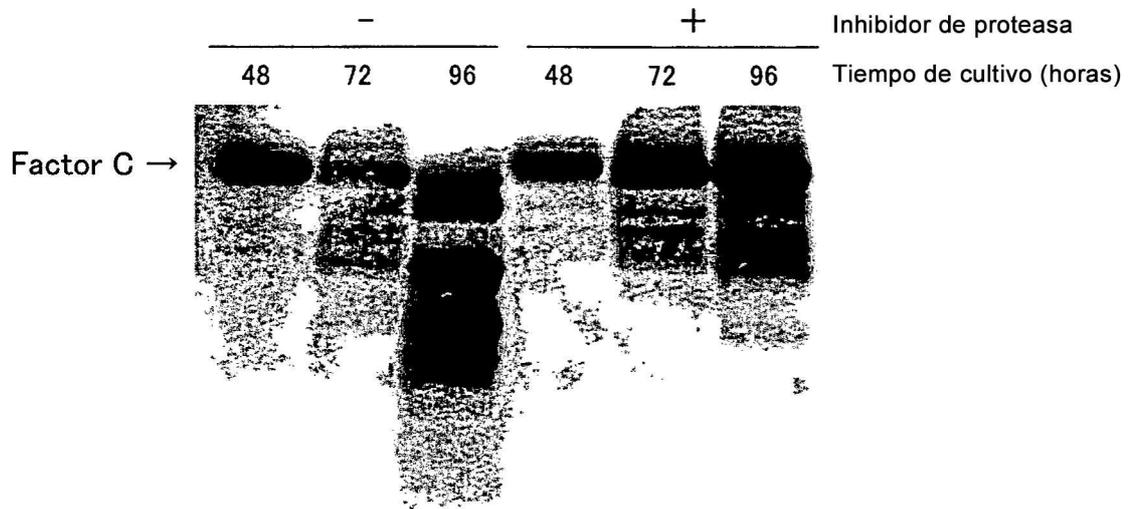
[Fig. 3]



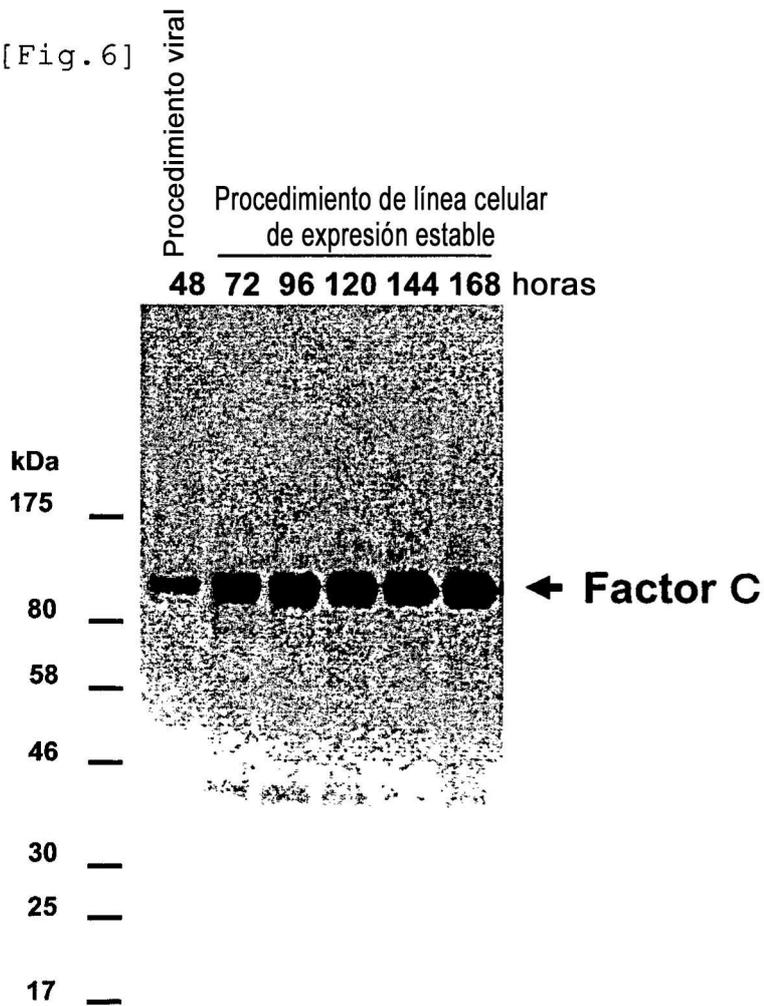
[Fig. 4]



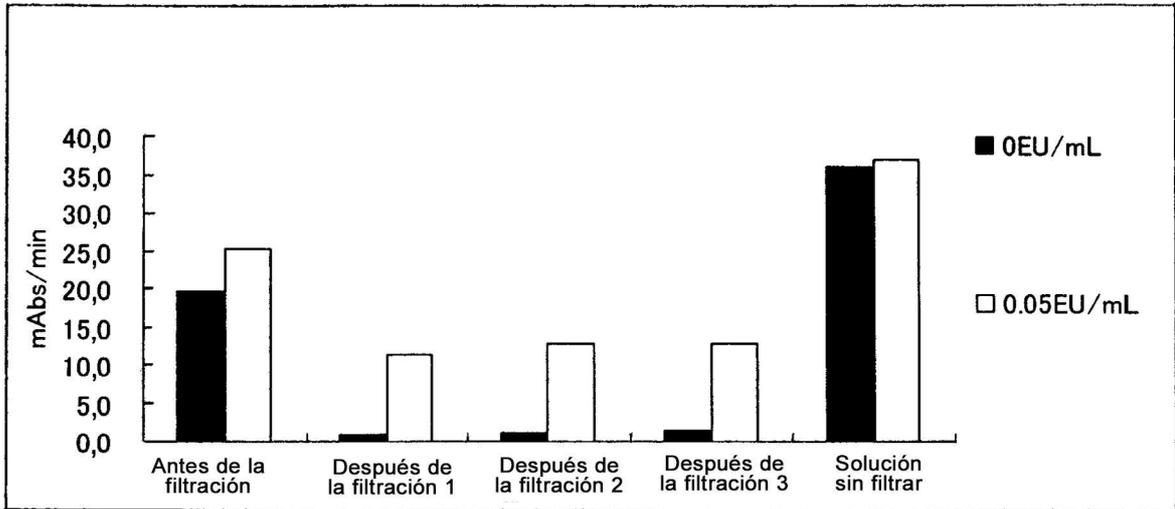
[Fig.5]



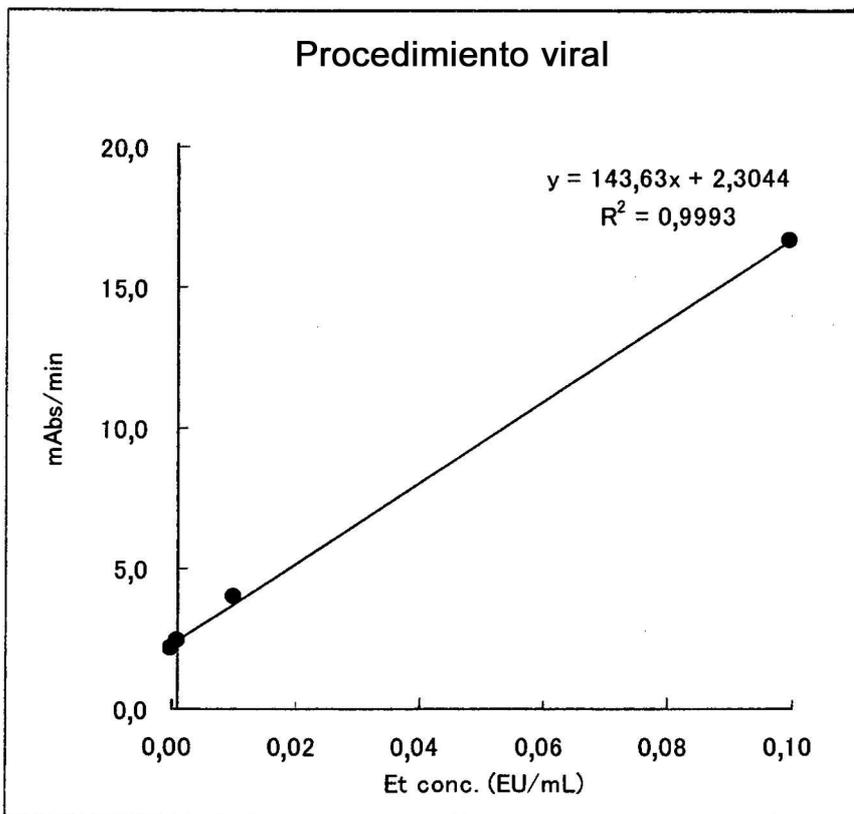
[Fig.6]



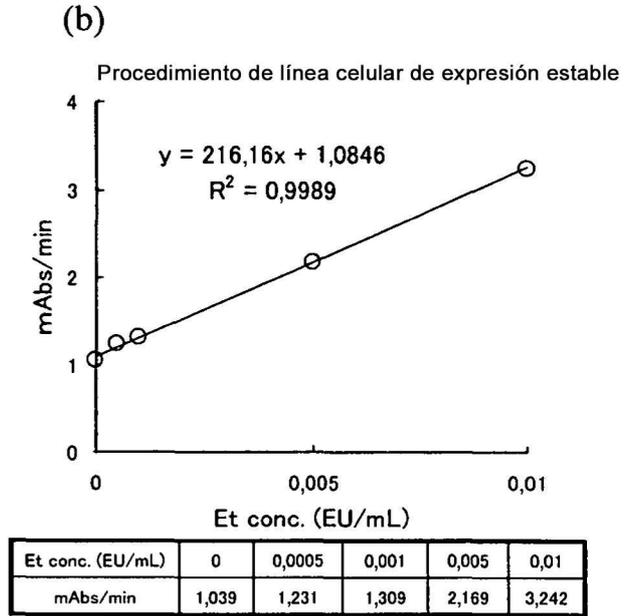
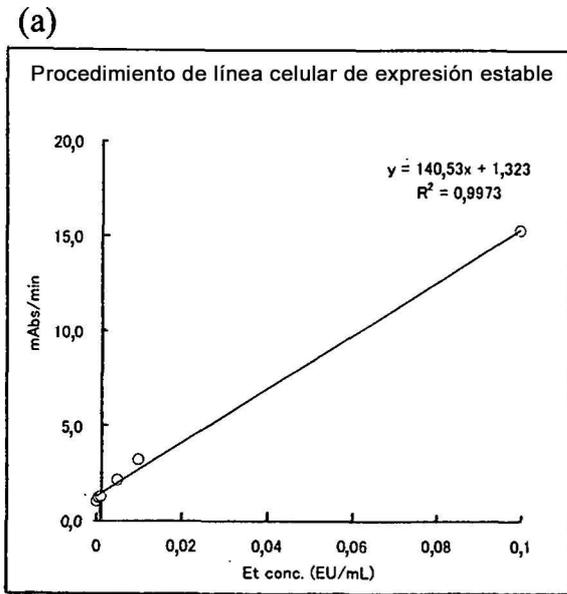
[Fig.7]



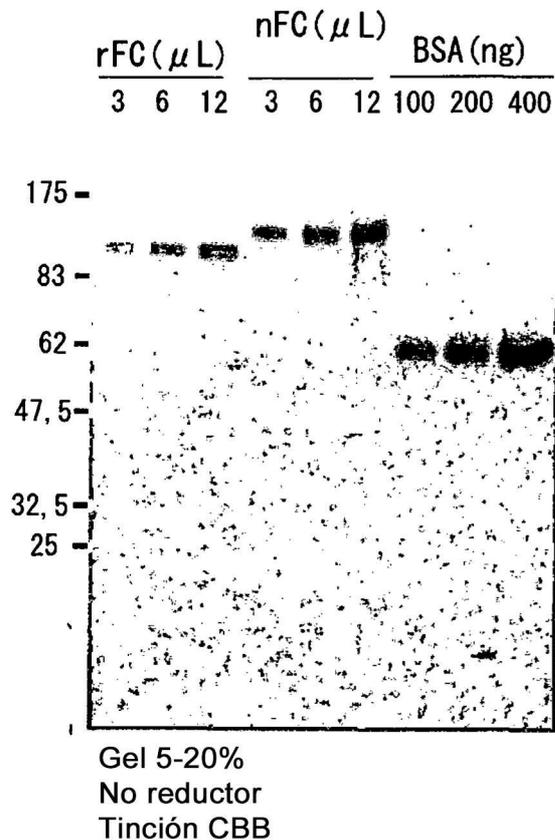
[Fig.8]



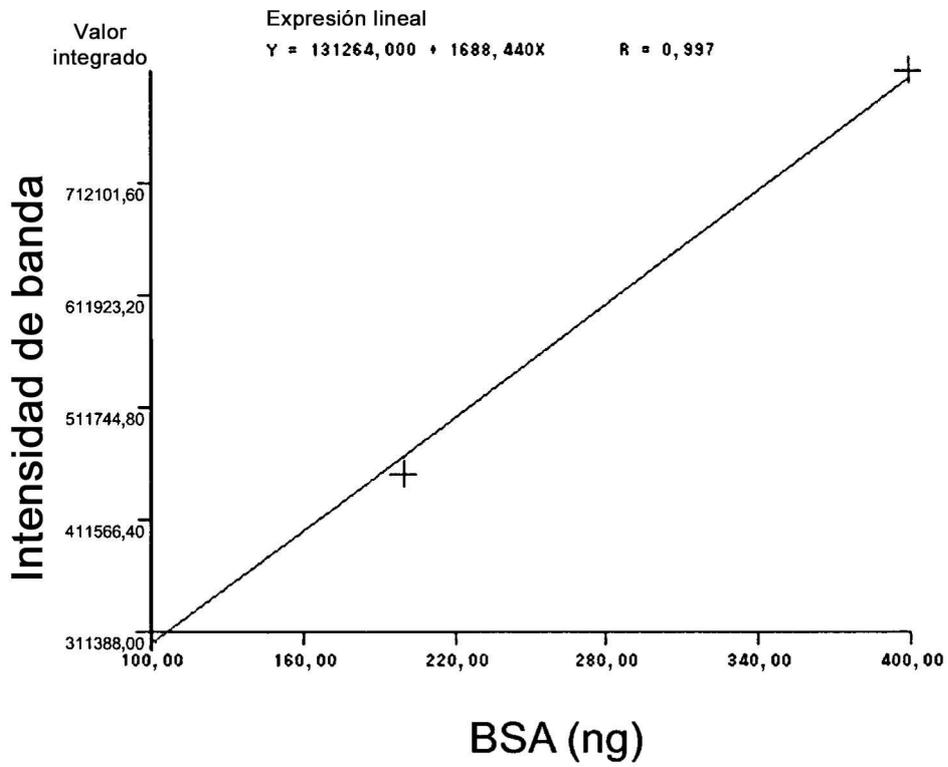
[Fig.9]



[Fig.10]



[Fig.11]



[Fig.12]

