

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 089**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/579** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2012** E 17190094 (7)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019** EP 3273244

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:

**27.05.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

ES 2 763 089 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 factor C de cangrejo herradura.

10 **Antecedentes de la invención**

10 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.  
15 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 Se conoce un factor C de cangrejo herradura recombinante, que incluye un marcador His, a partir, por ejemplo, del

documento de patente 3 y del documento de patente 4.

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.

#### DOCUMENTOS DE LOS ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

10 Documentos de patente

[Documento de patente 1] WO 2008/004674

[Documento de patente 2] US 6.849.426 B

[Documento de patente 3] EP2050820

15 [Documento de patente 4] WO03/002976

Documentos no de patente.

[Documento no de patente 1] Iwanaga S., Curr Opin Immunol. Feb de 1993; 5(1): 74-82.

20 [Documento no de patente 2] Nakamura T. y otros, Biochem J. Mar de 1986; 99(3): 847-57.

#### Características de la invención

25 La presente invención tiene como objetivo dar a conocer procedimientos para producir un factor C de cangrejo herradura que pueda medir endotoxinas de manera rápida y altamente sensible.

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.

35 [1] Un procedimiento para producir un factor C de cangrejo herradura que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No.: 2 o que tiene una identidad no inferior al 90% de la longitud total de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No.: 2 y que tiene actividad de factor C, que 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 las células de insecto como huésped:

40 comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas (A) a (D):

(A) una etapa de incorporar ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del factor C en un ADN viral;

(B) una etapa de infectar células de insecto con el virus en el que se ha incorporado dicho ADN;

45 (C) una etapa de permitir que las células de insecto infectadas con dicho virus expresen la proteína codificada por dicho ADN; y

(D) una etapa de recuperar el factor C como una solución y eliminar el virus utilizando una membrana de filtración de fibras huecas que tiene un tamaño de poro de 500 kDa.

50 [2] Un procedimiento para producir un factor C de cangrejo herradura que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO.: 2 o que tiene una identidad no inferior al 90% de la longitud total de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO.: 2 y que tiene actividad de factor C, que 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 las células de insecto como huésped:

55 comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas (A) a (D):

(A) una etapa de incorporar el ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del factor C en un vector;

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

60 (C) una etapa de permitir que las células de insecto, en las que se ha incorporado dicho ADN, expresen la proteína codificada por dicho ADN; y

(D) una etapa de recuperar el factor C como una solución.

65 Utilizando el factor C de cangrejo herradura de la presente invención, se pueden 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, tal como se describe en la

presente memoria descriptiva, 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.

## 5 Descripción breve de los dibujos

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

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.

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

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

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

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

15 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.

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.

20 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.

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

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

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

## 30 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".

35 "reacción en cascada".

### (1) Agente de medición de endotoxinas

40 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".

45 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.

50 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.

60 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.

5 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 10, 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.

30 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.

35 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.

55 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.

60 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.

65 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.*

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.

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 memoria descriptiva** 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.

“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.

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 memoria descriptiva 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.

“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 el enzima de coagulación de la presente memoria descriptiva 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.

Se puede añadir un péptido arbitrario o similar al factor B de la presente memoria descriptiva y/o a la enzima procoagulante de la presente descripción, siempre que los factores tengan la actividad del factor B y la actividad de la enzima procoagulante, respectivamente. Entre los ejemplos de dicho péptido se incluyen secuencias de marcadores tales como el marcador His y el marcador V5. 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.

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".

5 Entre los ejemplos del sustrato para la detección se incluye coagulígeno. Debido al contacto del coagulígeno 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 coagulígeno 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 coagulígeno (Miyata, y otros, PROTEIN, NUCLEIC ACID AND  
10 ENZYME, Extra Edition, núm. 29, págs. 30-43 (1986)), se puede producir coagulígeno 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  
15 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  
20 (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  
25 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 memoria descriptiva.

65

## (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).

## &lt; Procedimiento viral &gt;

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 *nucleopolyhedrovirus* (NPV). Entre los ejemplos de NPV se incluyen AcNPV (NPV *Autographa californica*) y BmNPV (NPV *Bombyx 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.

## &lt; Procedimiento de línea celular de expresión estable &gt;

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.

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.

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.

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 **memoria descriptiva**, 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.

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.

### (3) Procedimiento para la medición de endotoxinas

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.

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.

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):

- (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.

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).

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. El procedimiento 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.

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, el procedimiento de la presente memoria descriptiva para la medición de endotoxinas es un procedimiento para la medición de endotoxinas en una sustancia de ensayo, procedimiento que comprende las siguientes etapas (A) a (D).

- (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;
- (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.

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 en contacto en la etapa B, el factor B puede ser recuperado para ser utilizado en la etapa C.

Se puede medir 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.

El procedimiento 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 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 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.

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

En el procedimiento 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.

En el procedimiento 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.

El sistema de reacción puede contener uno o más componentes arbitrarios que no sean el agente de medición de endotoxinas descrito en la presente memoria descriptiva, 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

## EJEMPLOS

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

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")

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

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.

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.

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*.

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 *BglII*.

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

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.

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.

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

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

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  $\mu\text{m}$  (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.

(1-1-5) Preparación del reactivo

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.

(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.

(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  $6 \times 10^5$  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.

10 Ejemplo 2: Propiedades y similares de las proteínas expresadas

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

15 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.

20 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).

25 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

35 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).

55 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.

60 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.

65 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.

5 (2-3) Comparación de la estabilidad del factor C expresado

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

10 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  
15 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.

20 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

25 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  
30 horas de cultivo mediante el procedimiento viral.

35 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

40 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.  
45

50 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.

55 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).

60 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

5 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.

10 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.

15 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.

20 (3-2) Medición utilizando el agente de medición de endotoxinas 2

25 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.

30 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.

35 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.

40 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.

50 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

55 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 eluida, para retornar el pH de la solución eluida a neutro.

- 5 (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 eluidas 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.

- 20 (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.

35 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

- 40 Mediante la presente invención, se puede producir un factor C de cangrejo herradura de forma sencilla y rápida con un bajo coste.

#### DESCRIPCIÓN DE LA LISTA DE SECUENCIAS

- 45 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  
 50 SEQ ID No.: 5 Secuencia de ADN del gen de la enzima procoagulante del cangrejo de herradura japonés  
 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  
 55 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  
 SEQ ID No.: 12 Secuencia de péptidos

#### 60 Lista de secuencias

<110> SEIKAGAKU CORPORATION

<120> Agente para la medición de endotoxinas

65 <130> OP-11070-PCT



ES 2 763 089 T3

<150> US61/447,556  
 <151> 2011-02-28

5 <160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
 10 <211> 3060  
 <212> ADN  
 <213> Tachypleus tridentatus

<220>  
 15 <221> CDS  
 <222> (1)..(3060)  
 <223>

<400> 1

20 atg gtc tta gog tgg 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  
 1 5 10 15  
 gcc caa caa atg cgt cca gtt cag tcc aga gga gta gat ctg ggc ttg 96  
 25 Ala Gln Gln Met Arg Pro Val Gln Ser Arg Gly Val Asp Leu Gly Leu  
 20 25 30  
 tgt gat gaa acg agg ttc gag tgt aag tgt gga gat cca ggc tat gtg 144  
 Cys Asp Glu Thr Arg Phe Glu Cys Lys Cys Gly Asp Pro Gly Tyr Val  
 35 40 45  
 30 ttc aac gtc cct atg aaa caa tgc acg tac ttc tat cga tgg agg cct 192  
 Phe Asn Val Pro Met Lys Gln Cys Thr Tyr Phe Tyr Arg Trp Arg Pro  
 50 55 60  
 tat tgt aaa cca tgt gat gac ctg gag gct aag gac att tgt cca aag 240  
 Tyr Cys Lys Pro Cys Asp Asp Leu Glu Ala Lys Asp Ile Cys Pro Lys  
 35 65 70 75 80  
 tac aaa cga tgt caa gag tgt aag gct ggt ctt gat agt tgt gtt act 288  
 Tyr Lys Arg Cys Gln Glu Cys Lys Ala Gly Leu Asp Ser Cys Val Thr  
 85 90 95  
 tgt cca cct aac aaa tat ggt act tgg tgt agc ggt gaa tgt caa tgt 336  
 40 Cys Pro Pro Asn Lys Tyr Gly Thr Trp Cys Ser Gly Glu Cys Gln Cys  
 100 105 110  
 aag aat gga ggt atc tgt gac cag agg aca gga gct tgt acc tgt cgt 384  
 Lys Asn Gly Gly Ile Cys Asp Gln Arg Thr Gly Ala Cys Thr Cys Arg

ES 2 763 089 T3

	115	120	125	
	gac aga tat gaa gga gcg cac tgt gaa att ctc aaa ggt tgt cct ctt			432
	Asp Arg Tyr Glu Gly Ala His Cys Glu Ile Leu Lys Gly Cys Pro Leu			
	130	135	140	
5	ctt cca tcg gat tct caa gtt cag gaa gtc aga aac cca cca gat aat			480
	Leu Pro Ser Asp Ser Gln Val Gln Glu Val Arg Asn Pro Pro Asp Asn			
	145	150	155	160
	ccc caa act att gac tac agc tgt tca cca ggg ttc aag ctt aaa ggc			528
	Pro Gln Thr Ile Asp Tyr Ser Cys Ser Pro Gly Phe Lys Leu Lys Gly			
10	165	170	175	
	gtg gca cga att agc tgt ctc cca aat gga cag tgg agt agc ttt cca			576
	Val Ala Arg Ile Ser Cys Leu Pro Asn Gly Gln Trp Ser Ser Phe Pro			
	180	185	190	
	ccc aaa tgt att cga gaa tgt gcc aag gtt tca tct cca gaa cac ggc			624
15	Pro Lys Cys Ile Arg Glu Cys Ala Lys Val Ser Ser Pro Glu His Gly			
	195	200	205	
	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	
20	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			
	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			
25	245	250	255	
	ttg gtc ttc tgt cct gac ctt gat cct gta aac cat gct gaa cac cag			816
	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
30	Val Lys Ile Gly Val Glu Gln Lys Tyr Gly Gln Phe Pro Gln Gly Thr			
	275	280	285	
	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			

ES 2 763 089 T3

	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			
	305	310	315	320
5	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
	Asp Phe Leu Asp Asp Val Gly Glu Pro Val Arg Ile His Cys Pro Ala			
10		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			
		355	360	365
	gaa ctt tcc tca gtg tgt cgt gca gcc atc cat gct ggc aag ctt cca			1152
15	Glu Leu Ser Ser Val Cys Arg Ala Ala Ile His Ala Gly Lys Leu Pro			
		370	375	380
	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
20	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			
		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			
25		420	425	430
	aga tca gga tgt cct gat gga tgg ttt gag gta gaa gag aac tgt gtg			1344
	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 gct caa ggt gtg tgt			1392
30	Tyr Val Thr Ser Lys Gln Arg Ala Trp Glu Arg Ala Gln Gly Val Cys			
		450	455	460
	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			

ES 2 763 089 T3

	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	
				485					490						495		
5	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
	Met	Asp	Arg	Ser	Asn	Val	Val	Leu	Asn	Asp	Asn	Leu	Thr	Phe	Trp	Ala	
10			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	
			530					535							540		
	gat	cag	ctg	cag	cct	gtg	tgg	aaa	acc	aag	tca	tgt	ttt	cag	ccc	tca	1680
15	Asp	Gln	Leu	Gln	Pro	Val	Trp	Lys	Thr	Lys	Ser	Cys	Phe	Gln	Pro	Ser	
			545					550							555		
	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		
	gat	gac	cct	gga	cca	ctg	gaa	aat	gga	cac	gcc	aca	ctt	cat	gga	caa	1776
20	Asp	Asp	Pro	Gly	Pro	Leu	Glu	Asn	Gly	His	Ala	Thr	Leu	His	Gly	Gln	
				580											585		
	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	
25			595					600							605		
	gtt	ctc	cac	tac	ctc	agt	gga	act	gag	acc	gta	act	tgt	aca	aca	aat	1872
	Val	Leu	His	Tyr	Leu	Ser	Gly	Thr	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Thr	Thr	Asn	
				610											615		
	ggc	aca	tgg	agt	gct	cct	aaa	cct	cga	tgt	atc	aaa	gtc	atc	acc	tgc	1920
30	Gly	Thr	Trp	Ser	Ala	Pro	Lys	Pro	Arg	Cys	Ile	Lys	Val	Ile	Thr	Cys	
				625											630		
	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	

ES 2 763 089 T3

	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			
	660	665	670	
5	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
	Pro Arg Ser Ser Gln Pro Ser Thr Val Asp Leu Ala Ser Lys Val Lys			
10	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			
	705	710	715	720
	gag tgg aga tac tac gaa cta ctt gga tct caa ggc aga aga tgt gac			2208
15	Glu Ser Arg Tyr Tyr Glu Leu Leu Gly Ser Gln Gly Arg Arg Cys Asp			
	725	730	735	
	tct aat gga aac tgg agt ggt cgg ccc gct 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	
20	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			
	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			
25	770	775	780	
	gca gac cac aat atg tgg ttt ctc cag tgt gga gga tcc cta ttg aat			2400
	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
30	Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Thr Tyr Ser Ala Thr			
	805	810	815	
	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			

ES 2 763 089 T3

	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			
	835	840	845	
5	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
	Asp Ile Ala Leu Ile Gln Leu Lys Thr Pro Val Thr Leu Thr Thr Arg			
10	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			
	885	890	895	
	aag gag gga aca tta gca gtg gtg aca ggt tgg ggt ttg aat gaa aac			2736
15	Lys Glu Gly Thr Leu Ala Val Val Thr Gly Trp Gly Leu Asn Glu Asn			
	900	905	910	
	aac aca tat tca gag atg att caa caa gct 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	
20	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			
	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			
25	945	950	955	960
	gcc tgc agt ggg gac agt gga gga cca tta gtg ttt gct gat gat tcc			2928
	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
30	Arg Thr Glu Arg Arg Trp Val Leu Glu Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser			
	980	985	990	
	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			

ES 2 763 089 T3

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  
           1010                      1015  
 5                      <210> 2  
                     <211> 1019  
                     <212> PRT  
                     <213> Tachypleus tridentatus  
 10                      <400> 2  
 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  
 15                      20                      25                      30  
 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  
 20 Tyr Cys Lys Pro Cys Asp Asp Leu Glu Ala Lys Asp Ile Cys Pro Lys  
                     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  
 25                      100                      105                      110  
 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  
 30 Leu Pro Ser Asp Ser Gln Val Gln Glu Val Arg Asn Pro Pro Asp Asn  
                     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  
 35                      180                      185                      190  
 Pro Lys Cys Ile Arg Glu Cys Ala Lys Val Ser Ser Pro Glu His Gly  
                     195                      200                      205

ES 2 763 089 T3

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  
 225 230 235 240  
 5 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  
 260 265 270  
 Val Lys Ile Gly Val Glu Gln Lys Tyr Gly Gln Phe Pro Gln Gly Thr  
 10 275 280 285  
 Glu Val Thr Tyr Thr Cys Ser Gly Asn Tyr Phe Leu Met Gly Phe Asn  
 290 295 300  
 Thr Leu Lys Cys Asn Pro Asp Gly Ser Trp Ser Gly Ser Gln Pro Ser  
 305 310 315 320  
 15 Cys Val Lys Val Ala Asp Arg Glu Val Asp Cys Asp Ser Lys Ala Val  
 325 330 335  
 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  
 20 355 360 365  
 Glu Leu Ser Ser Val Cys Arg Ala Ala Ile His Ala Gly Lys Leu Pro  
 370 375 380  
 Asn Ser Gly Gly Ala Val His Val Val Asn Asn Gly Pro Tyr Ser Asp  
 385 390 395 400  
 25 Phe Leu Gly Ser Asp Leu Asn Gly Ile Lys Ser Glu Glu Leu Lys Ser  
 405 410 415  
 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  
 30 435 440 445  
 Tyr Val Thr Ser Lys Gln Arg Ala Trp Glu Arg Ala Gln Gly Val Cys  
 450 455 460  
 Thr Asn Met Ala Ala Arg Leu Ala Val Leu Asp Lys Asp Leu Ile Pro



ES 2 763 089 T3

465                      470                      475                      480  
 Ser Ser Leu Thr Glu Thr Leu Arg Gly Lys Gly Leu Thr Thr Thr Trp  
    485                      490                      495  
 Ile Gly Leu His Arg Leu Asp Ala Glu Lys Pro Phe Val Trp Glu Leu  
 5                      500                      505                      510  
 Met Asp Arg Ser Asn Val Val Leu Asn Asp Asn Leu Thr Phe Trp Ala  
    515                      520                      525  
 Ser Gly Glu Pro Gly Asn Glu Thr Asn Cys Val Tyr Leu Asp Ile Arg  
    530                      535                      540  
 10 Asp Gln Leu Gln Pro Val Trp Lys Thr Lys Ser Cys Phe Gln Pro Ser  
 545                      550                      555                      560  
 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  
 15                      580                      585                      590  
 Ser Ile Asp Gly Phe Tyr Ala Gly Ser Ser Ile Arg Tyr Ser Cys Glu  
    595                      600                      605  
 Val Leu His Tyr Leu Ser Gly Thr Glu Thr Val Thr Cys Thr Thr Asn  
    610                      615                      620  
 20 Gly Thr Trp Ser Ala Pro Lys Pro Arg Cys Ile Lys Val Ile Thr Cys  
 625                      630                      635                      640  
 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  
 25                      660                      665                      670  
 Pro Arg Leu Pro Leu Pro Leu Ala Arg Ala Ala Lys Pro Pro Pro Lys  
    675                      680                      685  
 Pro Arg Ser Ser Gln Pro Ser Thr Val Asp Leu Ala Ser Lys Val Lys  
    690                      695                      700  
 30 Leu Pro Glu Gly His Tyr Arg Val Gly Ser Arg Ala Ile Tyr Thr Cys  
 705                      710                      715                      720  
 Glu Ser Arg Tyr Tyr Glu Leu Leu Gly Ser Gln Gly Arg Arg Cys Asp  
    725                      730                      735

ES 2 763 089 T3

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  
 755 760 765  
 5 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  
 785 790 795 800  
 Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Thr Tyr Ser Ala Thr  
 10 805 810 815  
 Ala Glu Ile Ile Asp Pro Ser Gln Phe Lys Ile Tyr Leu Gly Lys Tyr  
 820 825 830  
 Tyr Arg Asp Asp Ser Arg Asp Asp Asp Tyr Val Gln Val Arg Glu Ala  
 835 840 845  
 15 Leu Glu Ile His Val Asn Pro Asn Tyr Asp Pro Gly Asn Leu Asn Phe  
 850 855 860  
 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  
 20 885 890 895  
 Lys Glu Gly Thr Leu Ala Val Val Thr Gly Trp Gly Leu Asn Glu Asn  
 900 905 910  
 Asn Thr Tyr Ser Glu Met Ile Gln Gln Ala Val Leu Pro Val Val Ala  
 915 920 925  
 25 Ala Ser Thr Cys Glu Glu Gly Tyr Lys Glu Ala Asp Leu Pro Leu Thr  
 930 935 940  
 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  
 30 965 970 975  
 Arg Thr Glu Arg Arg Trp Val Leu Glu Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser  
 980 985 990  
 Pro Ser Gly Cys Gly Lys Ala Asn Gln Tyr Gly Gly Phe Thr Lys Val

ES 2 763 089 T3

	995		1000		1005	
	Asn Val	Phe Leu Ser Trp Ile	Arg Gln Phe Ile			
	1010		1015			
5	<210> 3 <211> 1203 <212> ADN <213> Tachypleus tridentatus					
10	<220> <221> CDS <222> (1)..(1203) <223>					
15	<400> 3 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
20	Leu Gly Asn Lys Val Ser Arg Val Gly Val Leu Phe Pro Lys Thr Arg					
	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			
25	tcc ctc ata gac tgt cct agt gtc ttg gct acg ttg aag gac agt ttt					192
	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					
30	65	70	75	80		
	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
35	Ile Ser Thr Lys Glu Pro Lys Leu Pro Arg Leu His Ile Ser Gly Cys					
	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			
40	tca cca ata ctt cct ccg ata tct act cct caa aat tca aca ggt ggg					432

ES 2 763 089 T3

	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
	Arg	Gly	Ile	Ile	Ala	Gly	Gly	Val	Glu	Ala	Lys	Ile	Gly	Ala	Trp	Pro	
5	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			
	tgt	gct	ggt	agc	ata	atc	agt	aac	aag	tac	att	ttg	tca	gct	gcc	cac	576
10	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	
			195					200					205				
15	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
	Asp	Val	Ile	Ile	His	Pro	His	Tyr	Val	Glu	Lys	Glu	Asn	Tyr	Asn	Asp	
20	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			
	aat	cct	ata	tgt	ctc	cct	gat	cca	gag	aca	gta	acg	gat	cca	tta	aaa	816
25	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	
			275					280					285				
30	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					
	gat	aaa	tgt	gat	caa	gcc	tat	gag	aaa	ctc	aac	acc	cct	tca	cta	aaa	960

ES 2 763 089 T3

<p>5</p> <p>10</p> <p>15</p> <p>20</p> <p>25</p> <p>30</p> <p>35</p>	<p>Asp Lys Cys Asp Gln Ala Tyr Glu Lys Leu Asn Thr Pro Ser Leu Lys</p> <p>305 310 315 320</p> <p>Asn Gly Ile Thr Asn Asn Phe Leu Cys Ala Gly Leu Glu Glu Gly Gly</p> <p>325 330 335</p> <p>Lys Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Leu Val Asn</p> <p>340 345 350</p> <p>Asn Thr Arg Trp Ile Val Val Gly Val Val Ser Phe Gly His Lys Cys</p> <p>355 360 365</p> <p>Ala Glu Glu Gly Tyr Pro Gly Val Tyr Ser Arg Val Ala Ser Tyr Leu</p> <p>370 375 380</p> <p>Asp Trp Ile Ala Lys Val Thr Asn Ser Leu Asp His Ala Val Thr Asn</p> <p>385 390 395 400</p> <p>Met Thr Trp Ile Cys Val Ile Thr Leu Phe Ala Leu Ala Ser Ala Thr</p> <p>1 5 10 15</p> <p>Leu Gly Asn Lys Val Ser Arg Val Gly Val Leu Phe Pro Lys Thr Arg</p> <p>20 25 30</p> <p>Asn Asp Asn Glu Cys Thr Ala Arg Gly Gly Leu Lys Gly Ser Cys Lys</p> <p>35 40 45</p> <p>Ser Leu Ile Asp Cys Pro Ser Val Leu Ala Thr Leu Lys Asp Ser Phe</p> <p>50 55 60</p> <p>Pro Val Val Cys Ser Trp Asn Gly Arg Phe Gln Pro Ile Val Cys Cys</p> <p>65 70 75 80</p> <p>Pro Asp Ala Ile Ala Pro Pro Pro Val Thr Thr Thr Ala Val Thr Val</p> <p>85 90 95</p>	<p>1008</p> <p>1056</p> <p>1104</p> <p>1152</p> <p>1200</p> <p>1203</p>
--	---	---

ES 2 763 089 T3

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  
                   115                  120                  125  
 5 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  
 Trp Met Ala Ala Val Phe Val Lys Asn Phe Gly Ile Gly Arg Phe His  
 10                  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  
                   195                  200                  205  
 15 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  
 Ile Ala Ile Ile Glu Leu Lys Glu Glu Leu Asn Phe Thr Asp Leu Val  
 20                  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  
                   275                  280                  285  
 25 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  
 305                  310                  315                  320  
 Asn Gly Ile Thr Asn Asn Phe Leu Cys Ala Gly Leu Glu Glu Gly Gly  
 30                  325                  330                  335  
 Lys Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Leu Val Asn  
                   340                  345                  350  
 Asn Thr Arg Trp Ile Val Val Gly Val Val Ser Phe Gly His Lys Cys

ES 2 763 089 T3

	355		360		365														
	Ala	Glu	Glu	Gly	Tyr	Pro	Gly	Val	Tyr	Ser	Arg	Val	Ala	Ser	Tyr	Leu			
	370						375						380						
	Asp	Trp	Ile	Ala	Lys	Val	Thr	Asn	Ser	Leu	Asp	His	Ala	Val	Thr	Asn			
5	385					390					395					400			
	<210>	5																	
	<211>	1128																	
	<212>	ADN																	
10	<213>	Tachypleus	tridentatus																
	<220>																		
	<221>	CDS																	
	<222>	(1)..(1128)																	
15	<223>																		
	<400>	5																	
	atg	ttg	gtg	aat	aac	gtg	ttt	tca	cta	ctg	tgt	ttc	cca	ctc	ttg	atg			48
20	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			
				20						25					30				
25	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				
	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			
30	50					55					60								
	tat	aat	tta	ctc	aaa	gaa	tca	ata	tgc	ggc	ttt	gaa	ggc	ata	aca	ccc			240
	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
35	Lys	Val	Cys	Cys	Pro	Lys	Ser	Ser	His	Val	Ile	Ser	Ser	Thr	Gln	Ala			
						85					90				95				
	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				
40	aat	ctt	cat	gaa	gtg	tgt	gga	att	cac	aat	act	aca	act	acc	agg	att			384

ES 2 763 089 T3

Asn Leu His Glu Val Cys Gly Ile His Asn Thr Thr Thr Thr Arg Ile  
           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  
 5      130                          135                          140  
 gtc tac ata aaa caa gga gga atc aga agt gtt cag tgt ggt ggc gca 480  
 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 tcg cac tgt gtt gta aac 528  
 10  Leu Val Thr Asn Arg His Val Ile Thr Ala Ser His Cys Val Val Asn  
                           165                          170                          175  
 agt gca gga aca gat gtg atg cca gct gat gta ttc tcg gtt cgt ctg 576  
 Ser Ala Gly Thr Asp Val Met Pro Ala Asp Val Phe Ser Val Arg Leu  
                           180                          185                          190  
 15  ggt gaa cac aat tta tac agt acc gat gac gat tcg aat cca ata gat 624  
 Gly Glu His Asn Leu Tyr Ser Thr Asp Asp Asp Ser Asn Pro Ile Asp  
                           195                          200                          205  
 ttt gca gtt acg tcg 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  
 20      210                          215                          220  
 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  
 25  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  
 30  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



ES 2 763 089 T3

Ile Trp Glu His Glu Ala Cys Arg Gln Ala Tyr Glu Lys Asp Leu Asn  
 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  
 5 305 310 315 320  
 gct tgc cag ggt gat tct gga ggt cca atg atg ttg cct gtt aaa acc 1008  
 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  
 10 Gly Glu Phe Tyr Leu Ile Gly Ile Val Ser Phe Gly Lys Lys Cys Ala  
 340 345 350  
 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  
 15 tgg att gca gaa cat atg gtg tag 1128  
 Trp Ile Ala Glu His Met Val  
 370 375  
 <210> 6  
 20 <211> 375  
 <212> PRT  
 <213> Tachypleus tridentatus  
 <400> 6  
 25 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  
 30 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  
 35 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

ES 2 763 089 T3

100 105 110  
 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  
 5 130 135 140  
 Val Tyr Ile Lys Gln Gly Gly Ile Arg Ser Val Gln Cys Gly Gly Ala  
 145 150 155 160  
 Leu Val Thr Asn Arg His Val Ile Thr Ala Ser His Cys Val Val Asn  
 165 170 175  
 10 Ser Ala Gly Thr Asp Val Met Pro Ala Asp Val Phe Ser Val Arg Leu  
 180 185 190  
 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  
 15 210 215 220  
 Tyr Leu Asn Asp Ile Ala Ile Leu Thr Leu Asn Asp Thr Val Thr Phe  
 225 230 235 240  
 Thr Asp Arg Ile Arg Pro Ile Cys Leu Pro Tyr Arg Lys Leu Arg Tyr  
 245 250 255  
 20 Asp Asp Leu Ala Met Arg Lys Pro Phe Ile Thr Gly Trp Gly Thr Thr  
 260 265 270  
 Ala Phe Asn Gly Pro Ser Ser Ala Val Leu Arg Glu Val Gln Leu Pro  
 275 280 285  
 Ile Trp Glu His Glu Ala Cys Arg Gln Ala Tyr Glu Lys Asp Leu Asn  
 25 290 295 300  
 Ile Thr Asn Val Tyr Met Cys Ala Gly Phe Ala Asp Gly Gly Lys Asp  
 305 310 315 320  
 Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Met Met Leu Pro Val Lys Thr  
 325 330 335  
 30 Gly Glu Phe Tyr Leu Ile Gly Ile Val Ser Phe Gly Lys Lys Cys Ala  
 340 345 350  
 Leu Pro Gly Phe Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Glu Phe Leu Asp  
 355 360 365

ES 2 763 089 T3

Trp Ile Ala Glu His Met Val

370

375

5 <210> 7  
 <211> 3078  
 <212> ADN  
 <213> Tachypleus tridentatus

10 <400> 7

10 atggtccttag cgtcgttttt ggtgtctggt ttagttctag ggatactagc ccaacaaatg 60  
 cgtccagttc agtccagagg agtagatctg ggcttgtgtg atgaaacgag gttcgagtgt 120  
 aagtgtggag atccaggcta tgtgttcaac gtccctatga aacaatgcac gtacttctat 180  
 cgatggaggc cttattgtaa accatgtgat gacctggagg ctaaggacat ttgtccaaag 240

15 taaaaacgat gtcaagagtg taaggctggt cttgatagtt gtgttacttg tccacctaac 300  
 aaatatggta cttggtgtag cgggtgaatgt caatgtaaga atggaggat ctgtgaccag 360  
 aggacaggag cttgtacctg tcgtgacaga tatgaaggag cgcactgtga aattctcaaa 420  
 ggtgtcctc ttottccatc ggattctcaa gttcaggaag tcagaaacc accagataat 480  
 ccccaacta ttgactacag ctgttcacca gggttcaagc ttaaaggcgt ggcacgaatt 540

20 agctgtctcc caaatggaca gtggagtagc tttccacca aatgtattcg agaatgtgcc 600  
 aaggtttcat ctocagaaca cgggaaagtg aatgctocta gtggcaatat gatagaaggg 660  
 gctactttac gtttctcatg tgatagtccc tactacttga ttggtcaaga aacattaacc 720  
 tgccagggta atggtcagtg gagtggacaa ataccacaat gtaagaagtt ggtcttctgt 780  
 cctgaccttg atcctgtaaa ccatgctgaa caccaggta aaattggtgt ggaacaaaaa 840

25 tatggtcagt ttctcaagg cactgaagtg acctatacgt gttcgggtaa ctacttcttg 900  
 atgggtttta acaccttaaa atgtaaccct gatgggtcct ggtcaggatc acagccatcc 960  
 tgtgttaaag tggcagacag agaggtcgac tgtgacagta aagctgtaga cttcttggat 1020  
 gatgttggtg aacctgtcag gatccactgt cctgctggct gttctttgac agctgttact 1080  
 gtgtggggta cagccatata ccacgaactt tctcagtggt gtcgtgcagc catccatgct 1140

30 ggcaagcttc caaactctgg aggggcggtg catgtagtga acaatggccc ctactcggac 1200  
 tttctgggta gtgacctgaa tgggataaaa tcggaagagt tgaagtctct tgcccgcagt 1260  
 tttcgatttg attatgtcag ttcatccaca gcaggtagat caggatgtcc tgatggatgg 1320  
 tttgaggtag aagagaactg tgtgtacgtt acatcaaac agagagcctg ggaaagagct 1380  
 caaggtgtgt gtaccaatat ggctgctcgt cttgctgtgc tagacaaaga tctaattccg 1440

35 agttccttga ctgagactct acgagggaaa gggtaacaa ccacatggat aggattgcac 1500  
 agactagatg ctgagaagcc ctttgtttgg gagctaattg atcgtagtaa tgtggttctg 1560  
 aatgataacc taacattctg ggcctctggc gaacctgga atgaaactaa ctgtgtatat 1620  
 ctggacatcc gagatcagct gcagcctgtg tggaaaacca agtcatgttt tcagccctca 1680

ES 2 763 089 T3

agctttgctt gcatgatgga tttgtcagac agaaataaag ccaaatgcga tgaccctgga 1740  
 ccaactgaaa atggacacgc cacacttcat ggacaaagta ttgatgggtt ctatgctggt 1800  
 tcttctataa ggtacagctg tgaggttctc cactacctca gtggaactga gaccgtaact 1860  
 tgtacaacaa atggcacatg gaggctcct aaacctogat gtatcaaagt catcacctgc 1920  
 5 caaaaccctc ctgtaccatc atatggttct gtggaaatca aacccccaaag toggacaaac 1980  
 tcgatcagtc gtgttgggtc accttcttg aggttgccac gtttaccct cccattagcc 2040  
 agagcagcca aacctcctcc aaaacctaga tctcacaac cctctactgt ggacttggct 2100  
 tctaaagtta aactacctga aggtcattac cgggtagggt ctcgagccat ttacacgtgc 2160  
 gagtcogagat actacgaact acttggatct caaggcagaa gatgtgactc taatgaaac 2220  
 10 tggagtggtc ggcccgctag ctgtattcca gtttggac ggtcagactc tctctgttct 2280  
 ccttctatct ggaatgggaa ttctacagaa ataggtcagt ggccgtggca ggcaggaatc 2340  
 tctcgatggc ttgcagacca caatatgtgg tttctccagt gtggaggatc cctattgaat 2400  
 gagaaatgga tcgtcactgc tgcccactgt gtcacctact ctgotactgc tgagataatt 2460  
 gatcccagtc agtttaaaat ctatctgggc aagtactacc gtgatgacag tagagacgat 2520  
 15 gactactgac aagtaagaga ggctctcgag atccacgtaa atcctaacta cgaccccggc 2580  
 aatctcaact ttgacatagc cctaattcaa ctgaaaactc ctgttacttt gacaacacga 2640  
 gtccaaccaa totgtctgcc tactgacatc acaacaagag aacacttgaa ggagggaaca 2700  
 tttagcagtg tgacaggttg gggtttgaat gaaaacaaca catattcaga gatgattcaa 2760  
 caagctgtgc tacctgttgt tgcagcaagc acctgtgaag aggggtacaa ggaagcagac 2820  
 20 ttaccactga cagtaacaga gaacatgttc tgtgcaggtt acaagaaggg acgttatgat 2880  
 gcctgcagtg gggacagtg aggaccatta gtgtttgctg atgattcccg taccgaaagg 2940  
 cggtggttct tggaagggat tgtcagctgg ggcagtocca gtggatgttg caaggctaac 3000  
 caglatgggg gottcactaa agttaacgtt tttctatcat ggattaggca gttcattcat 3060  
 catcaccatc accattga 3078  
 25 <210> 8  
 <211> 1203  
 <212> ADN  
 <213> Tachypleus tridentatus  
 30 <400> 8  
 atgacctgga totgctgat caccctgttc gctctggctt ccgctaccct gggcaacaag 60  
 gtgtcccgtg tgggtgtcct gttcccaag acccgtaacg acaacgagtg caccgctcgt 120  
 35 ggtggtctga agggctcctg caagtccctg atcgactgcc cctccgtgct ggctaccctg 180  
 aaggactcct tcccgtcgt gtgctcctgg aacggctggt tccagcccat cgtgtgctgc 240  
 cccgacgcta tcgctcccc ccctgtgacc accaccgctg tgaccgtgat ctccaccaag 300  
 gagcccaagc tgccccgtct gcacatctcc ggttgcggca agcgcaaggt caagatcgac 360

ES 2 763 089 T3

atcaccaccg tgggccgttc cggttccccc atcctgcccc ccatctccac cccccagaac 420  
 tccactgggtg gtcgtggtat catcgctggc ggtgtcgagg ctaagatcgg tgcttggccc 480  
 tggatggctg ctgtgttcgt gaagaacttc ggtatcggtc gcttccactg cgctggttcc 540  
 atcatctcca acaagtacat cctgtccgct gctcacgctt tcctcatcgg tggtcgcaag 600  
 5 ctgaccccca cccgtctggc tgtgctgtg ggtggtcact acatcaagcg tggccaggag 660  
 taccocgtca aggacgtgat catccacccc cactacgtgg agaaggagaa ctacaacgac 720  
 atgccatca tcgagctgaa ggaggagctg aacttcaccg acctggtcaa ccccatctgc 780  
 ctgcccgacc ccgagactgt gaccgaccct ctgaaggacc gtatcgtgac cgctgctggc 840  
 tggggcgacc tggacttctc cggttcccggt tcccagggtc tgcgtgaggt gtccatcccc 900  
 10 gtggtgcccc tggacaagtg cgaccaggct tacgagaagc tgaacacccc ctccctgaag 960  
 aacggtatta ccaacaactt cctctgcgcc ggactcgagg aggggtggcaa ggacgcttgc 1020  
 cagggcgact ccggtggtcc cctgatgctg gtcaacaaca cccgttggat cgtcgtgggt 1080  
 gtcgtgtcct tcggtcacia gtgcgctgag gagggttacc ccggcgtcta ctcccgtgtg 1140  
 gttcctacc tggactggat cgctaaggtc accaactccc tggaccacgc tgtcaccaac 1200  
 15 taa 1203  
 <210> 9  
 <211> 1128  
 <212> ADN  
 20 <213> Tachypleus tridentatus  
 <400> 9  
 atgctggtca acaacgtgtt ctccctgctg tgcttcccc tgctgatgtc cgtcgtgctg 60  
 25 tgctccaccc tgtcccgtca gcgtcgtcag ttcgtgttcc ccgacgaaga ggagctgtgc 120  
 tccaaccgtt tcaccgagga gggcacttgc aagaacgtgc tggactgccg tatcctgctg 180  
 cagaagaacg actacaacct cctgaaggag tccatctgcg gtttcgaggg tatcactccc 240  
 aaggtctgct gccccaagtc ctcccacgtg atctccagca cccaggctcc ccccagact 300  
 accaccaccg agcgtcccc caagcagatc ccccccaacc tccacgaggt ctgcggtatc 360  
 30 cacaacacca ccaccaccg tatcatcggg ggtcgcgagg ctcccatcgg tgcttggccc 420  
 tggatgaccg ctgtgtacat caagcagggt ggtatccggt ccgtgcagtg cggaggtgct 480  
 ctggtcacca accgtcacgt gatcaccgct tcccactgcg tggtaactc cgctggcacc 540  
 gacgtgatgc ccgctgacgt gttctctgtg cgtctgggcg agcacaacct gtactccacc 600  
 gacgacgact ccaaccccat cgacttcgct gtgacctccg tgaagcacca cgagcacttc 660  
 35 gtgctggcta cctacctgaa cgacatcgtc atcctgactc tgaacgacac cgtgaccttc 720  
 accgaccgta tccgtcccat ctgcctgccc taccgcaagc tgcgttacga cgacctggt 780  
 atgcgcaagc cottcatcac oggctggggc accaccgctt tcaacggtcc ctccctccgct 840  
 gtgctgctg aggtgcagct gcccatctgg gagcacgagg cttgccgtca ggcttacgag 900

ES 2 763 089 T3

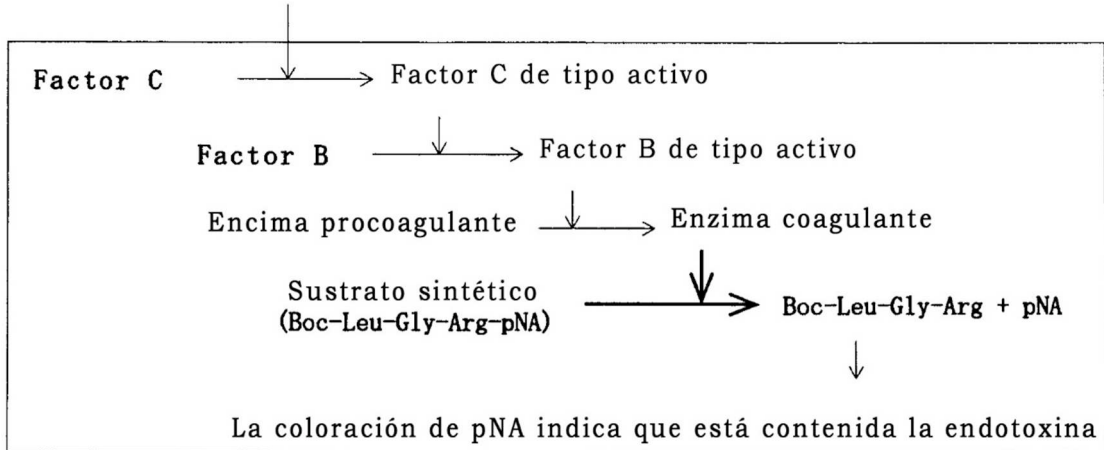
aaggacctga acatcaccaa cgtgtacatg tgcgctggtt tcgctgacgg tggcaaggac 960  
 gcttgccagg gogactccgg tggccccatg atgctgcccg tcaagaccgg cgagttctac 1020  
 ctgatoggta tcgtgtcctt oggcaagaag tgcgctctgc ccggtttccc cggtgtctac 1080  
 accaaggcca ccgagttcct cgactggatc gccgagcaca tgggtgtaa 1128  
 5  
 <210> 10  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 10  
 <220>  
 <223> cebador FC-N-Pst  
 <400> 10  
 15  
 caactgcaga tggctttagc gtcgtttttg 30  
 <210> 11  
 <211> 33  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> cebador FC-notag-R-Bam  
 25  
 <400> 11  
 caggatcctc aatgaactg octaatccat gat 33  
 30 <210> 12  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> péptido  
 <400> 12  
 40 Ile Glu Gly Arg  
 1

**REIVINDICACIONES**

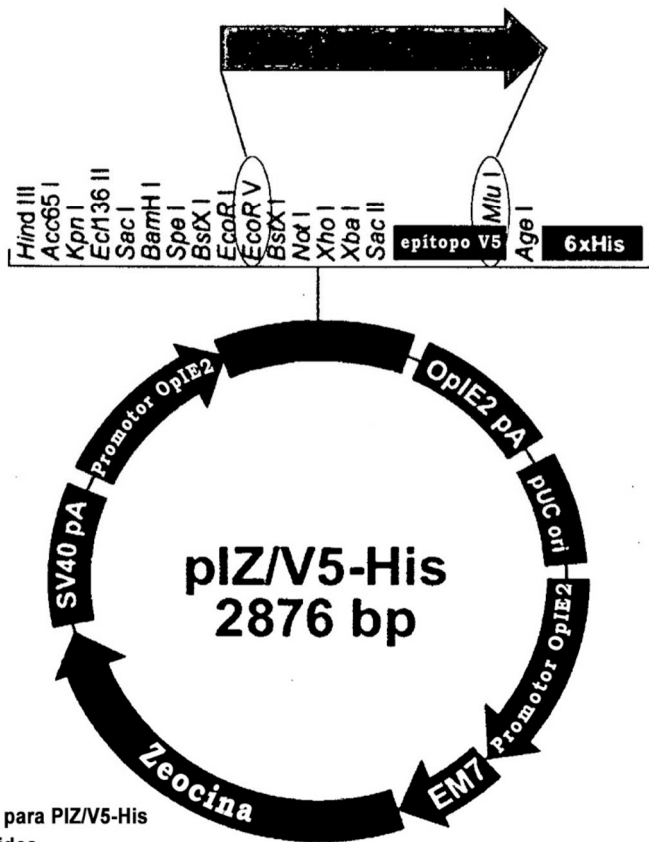
1. Procedimiento para producir un factor C de cangrejo herradura que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No.: 2 o que tiene una identidad no inferior al 90% de la longitud total de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No.: 2 y que tiene actividad de factor C, que 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 las células de insecto como huésped:  
comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas (A) a (D):
- 5
- 10 (A) una etapa de incorporar ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del factor C en un ADN viral;  
(B) una etapa de infectar células de insecto con el virus en el que se ha incorporado dicho ADN;  
(C) una etapa de permitir que las células de insecto infectadas con dicho virus expresen la proteína codificada por dicho ADN; y  
(D) una etapa de recuperar el factor C como una solución y eliminar el virus utilizando una membrana de  
15 filtración de fibras huecas que tiene un tamaño de poro de 500 kDa.
2. Procedimiento para producir un factor C de cangrejo herradura que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO.: 2 o que tiene una identidad no inferior al 90% de la longitud total de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO.: 2 y que tiene actividad de factor C, que 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 las células de insecto como huésped:  
comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas (A) a (D):
- 20
- 25 (A) una etapa de incorporar ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del factor C en un vector;  
(B) una etapa de introducir el vector, en el que se ha incorporado dicho ADN, en células de insecto para incorporar dicho ADN en el cromosoma de las células de insecto;  
(C) una etapa para permitir que las células de insecto, en las que se ha incorporado dicho ADN, expresen la proteína codificada por dicho ADN; y  
(D) una etapa para recuperar el factor C como una solución.

[Fig.1]

Muestra de ensayo que contiene endotoxina



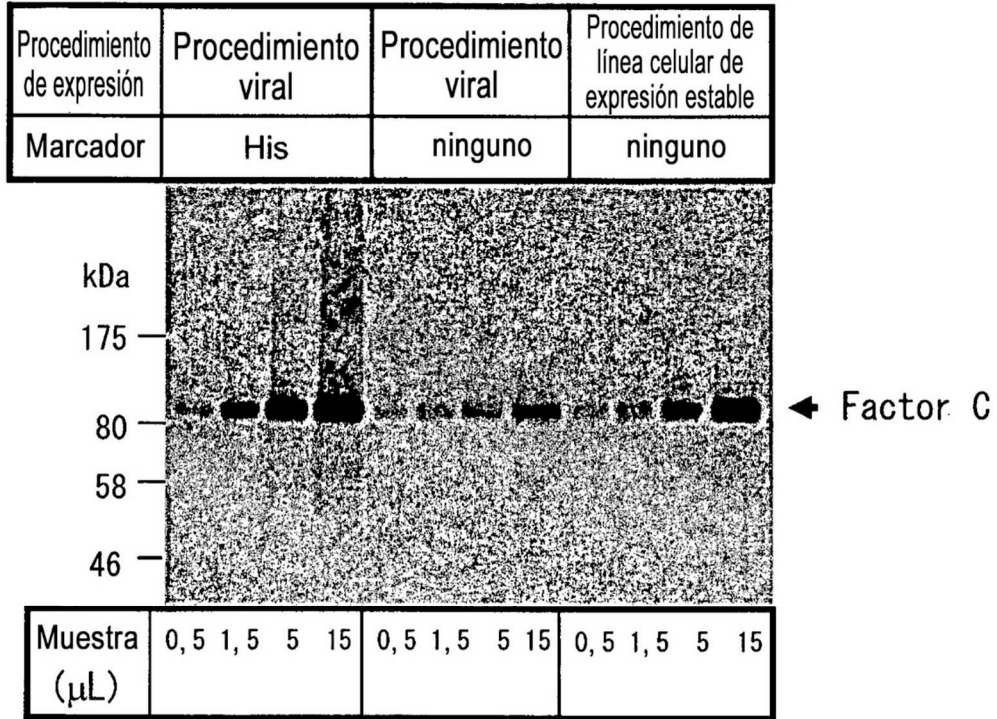
[Fig.2]



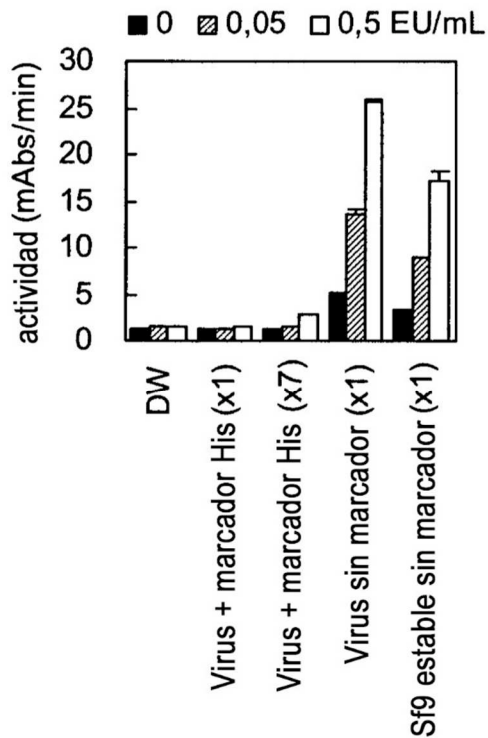
Comentarios para pIZ/V5-His  
2876 nucleótidos



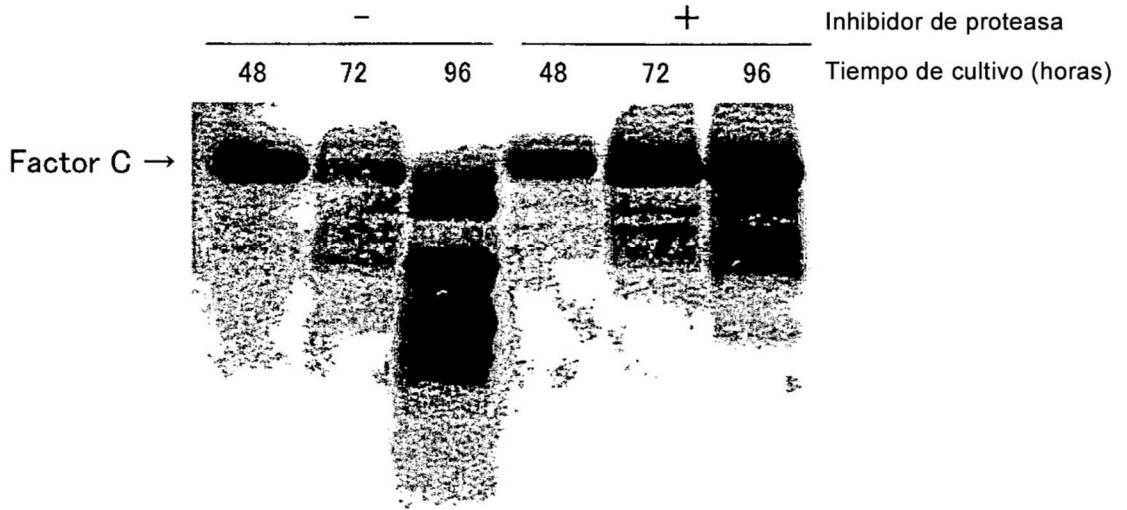
[Fig. 3]



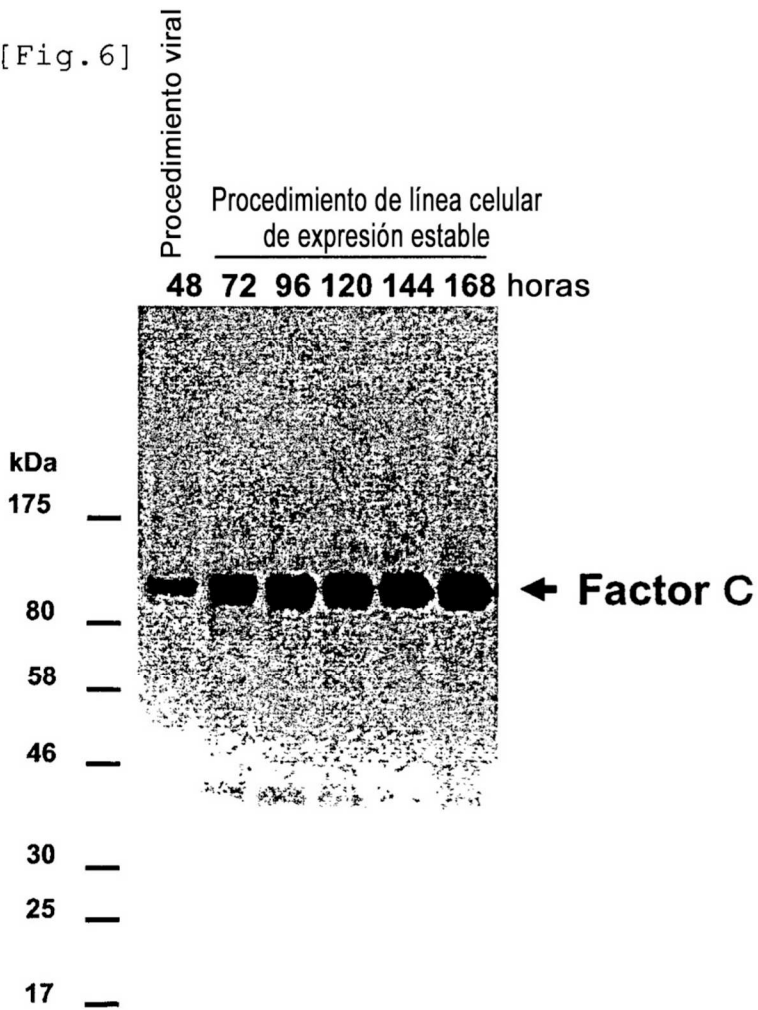
[Fig. 4]



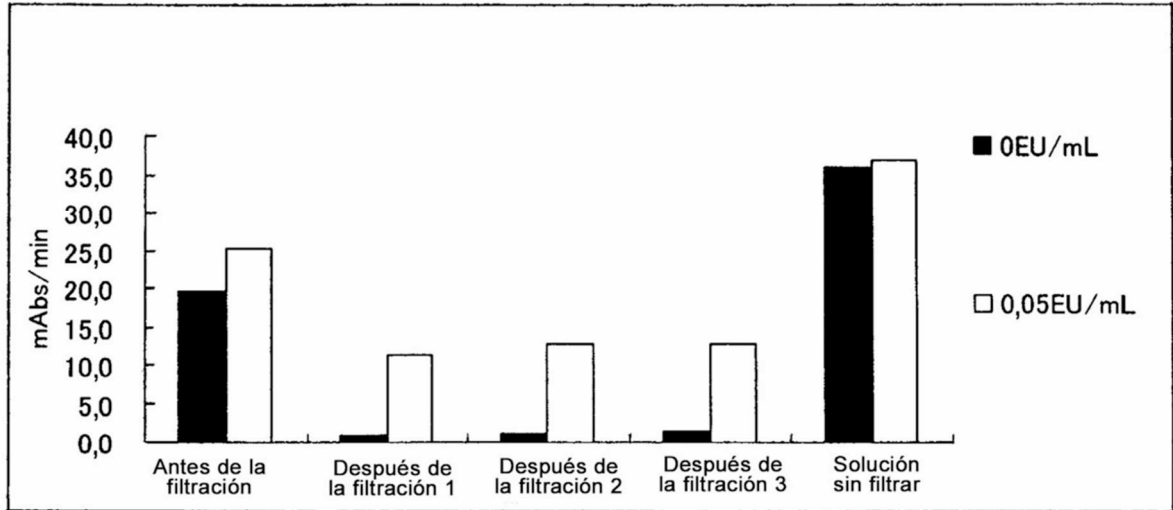
[Fig. 5]



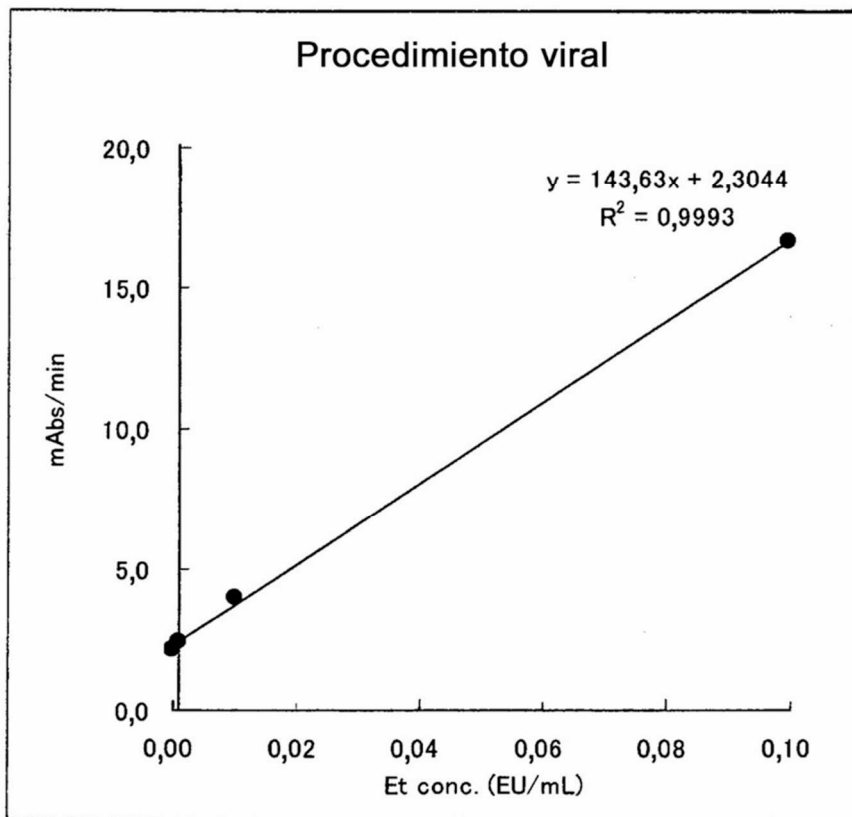
[Fig. 6]



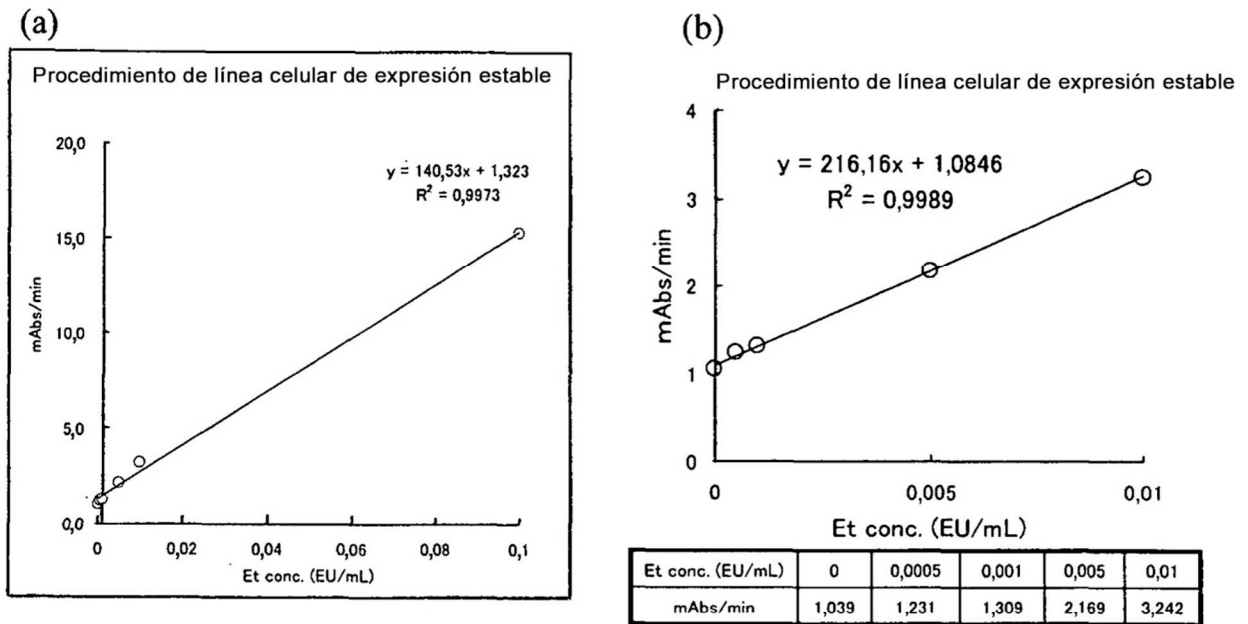
[Fig.7]



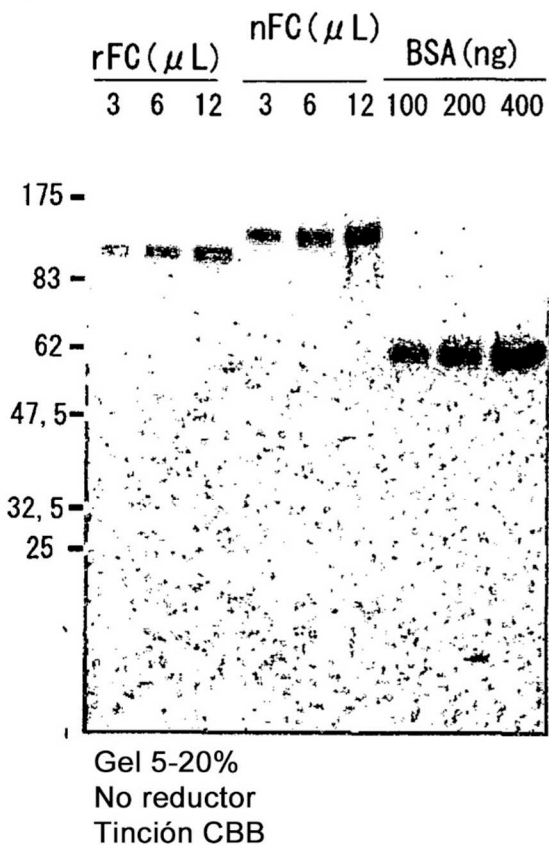
[Fig.8]



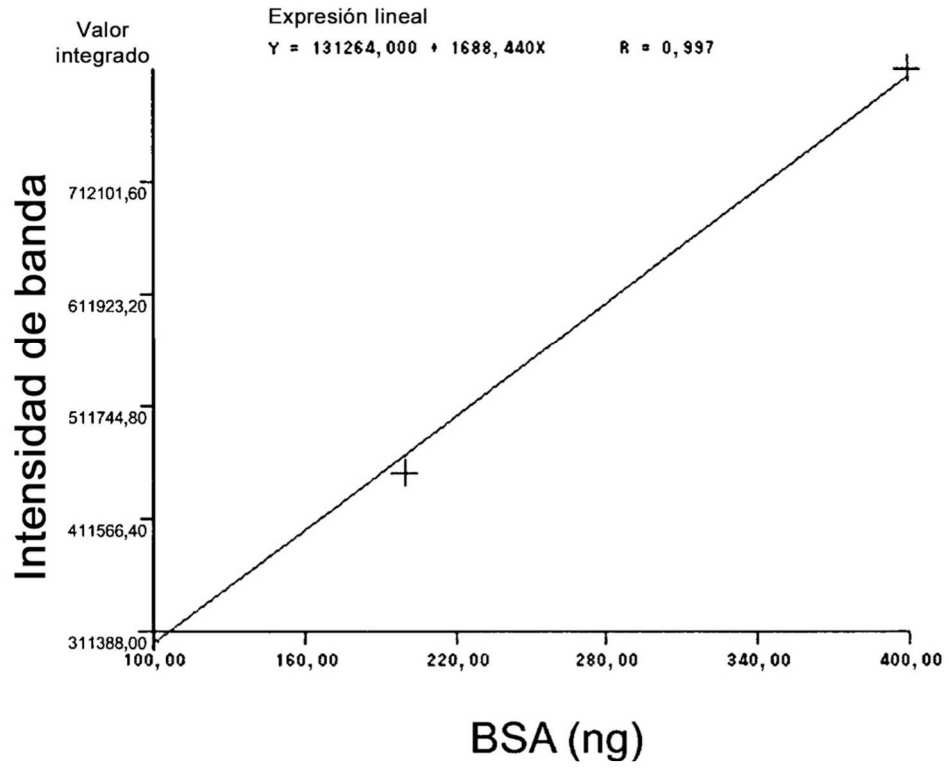
[Fig.9]



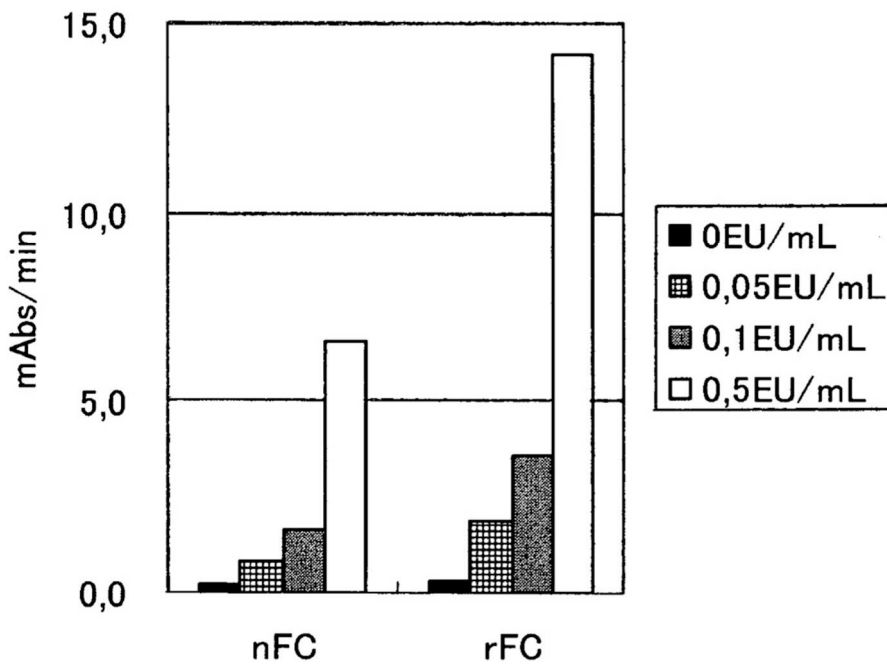
[Fig.10]



[Fig.11]



[Fig.12]



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

5 *Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.*

**Documentos de patentes citados en la descripción**

- 10
- WO 2008004674 A
  - US 6849426 B
  - EP 2050820 A
  - WO 03002976 A
  - US 61447556 A

**Literatura no patente citada en la descripción**

- **IWANAGA S.** *Curr Opin Immunol.*, February 1993, vol. 5 (1), 74-82
- **NAKAMURA T. et al.** *J Biochem.*, March 1986, vol. 99 (3), 847-57
- **MIYATA et al.** PROTEIN, NUCLEIC ACID AND ENZYME. 1986, 30-43