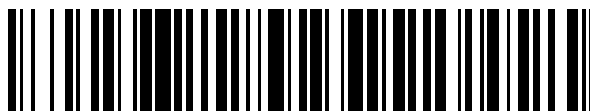


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 510**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/579 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2013 E 18190686 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.02.2020 EP 3441466**

54 Título: **Método para producir un nuevo Factor C recombinante, método para mitigar la inhibición de la reacción en ensayos de endotoxina, y método para medir endotoxina**

30 Prioridad:

10.12.2012 JP 2012269840

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

28.09.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MIZUMURA, HIKARU;
ODA, TOSHIO y
KAWABATA, SHUN-ICHIRO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 784 510 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

Método para producir un nuevo Factor C recombinante, método para mitigar la inhibición de la reacción en ensayos de endotoxina, y método para medir endotoxina

5 La presente invención se refiere a un método para mitigar una inhibición de reacción en un ensayo de endotoxina en presencia de un ion salino, a un método para producir un Factor C recombinante para uso en dicho método, y a un método para medir endotoxina.

10 La endotoxina es un lipopolisacárido que está presente en la membrana externa de las bacterias Gram negativas y es conocido como un pirógeno fuerte. Además, se sabe que incluso una cantidad muy pequeña de endotoxina provoca varios estados patológicos a través de una infección bacteriana. Tales estados incluyen no solo fiebre, sino que liberan también una citocina inflamatoria concomitante con la activación de macrófagos, inducción de shock endotóxico y similares. Por lo tanto, es esencial la detección de endotoxina en productos farmacéuticos tales como un inyectable, agua, dispositivos médicos y similares. Por otro lado, la endotoxina es considerada como una causa principal de shock implicado en una infección con bacterias Gram negativas. Por lo tanto, se puede determinar la presencia de infección y un efecto terapéutico a través de un análisis de endotoxina en sangre.

15 Por otra parte, se sabe que el cangrejo herradura americano (*Limulus polyphemus*) experimenta coagulación sanguínea cuando se le infecta con una bacteria Gram negativa. Este fenómeno se ha empleado tradicionalmente para la detección de endotoxina.

20 Específicamente, se conoce un método para medir endotoxina utilizando un extracto de hematocito de un cangrejo herradura (es decir, un lisado de amebocitos de un cangrejo herradura, en adelante también referido como un lisado, para simplificar) (véase, por ejemplo, el documento no de patente 1). Este método se conoce como una "prueba de limulus", que utiliza una reacción en cascada de diversas proteínas presentes en el lisado, teniendo lugar dicha reacción a través del contacto entre endotoxina y el lisado. La Fig. 1 muestra el esquema de la reacción en cascada.

25 Cuando la endotoxina entra en contacto con el lisado, el Factor C, que es un zimógeno de serina proteasa presente en el lisado, se activa para formar así el Factor C activado. El Factor C activado así formado activa el Factor B presente en el lisado, para formar así el Factor B activado. El Factor B activado así formado activa la enzima procoagulante presente en el lisado, para así formar una enzima de coagulación correspondiente.

La enzima de coagulación hidroliza un sitio específico de una molécula de coagulógeno presente en el lisado, de este modo se forma un gel de coagulina y así el lisado se coagula. Por lo tanto, se puede medir la endotoxina midiendo la reacción de coagulación del lisado.

30 Como alternativa, se puede medir endotoxina también mediante una reacción de coloración entre la enzima de coagulación y un sustrato sintético. Por ejemplo, la enzima de coagulación actúa sobre t-butoxicarbonil-leucil-glicil-arginil-pNA (Boc-Leu-Gly-Arg-pNA), que es un sustrato sintético, para hidrolizar los enlaces amino del mismo y de este modo se libera pNA. Por lo tanto, cuando el sustrato sintético se ha añadido al sistema de reacción, la endotoxina se puede medir mediante la medición de la absorbancia (a 405 nm) de la sustancia colorante (pNA).

35 Además, se sabe que un sistema de reacción en cascada se puede reconstituir utilizando el Factor C, el Factor B y una enzima procoagulante, que se purifican a partir de un lisado del cangrejo herradura japonés (documento no de patente 2).

40 Sin embargo, para utilizar tal lisado, o Factor C, Factor B y enzima procoagulante purificados del lisado, se deben capturar cangrejos herradura y recoger su sangre. Por lo tanto, desde el punto de vista de la protección de los recursos biológicos, es difícil encontrar suministro de tales ingredientes de forma inagotable. En tales circunstancias, se demanda una técnica que pueda producir estos ingredientes mediante ingeniería genética, para así reconstituir un sistema de reacción en cascada.

45 Por ejemplo, se conoce un caso en el que se expresan Factor C, Factor B y enzima procoagulante en células de insecto como células huésped, para de este modo reconstituir un sistema de reacción en cascada (documentos de patente 1 y 2). Sin embargo, se ha señalado que, dado que el sistema reconstituido contiene cloruro sódico, sulfato de magnesio o cloruro cálcico en el sistema de reacción, se suprime la reacción en cascada (documento de patente 1).

50 Como alternativa, se conoce un caso que utiliza células de mamífero como células huésped, en donde el Factor C derivado del cangrejo herradura singapurense (*Carcinoscorpius rotundicauda*) se expresa en COS-1, que es una línea celular derivada de células de riñón de mono verde africano, como células huésped. Sin embargo, se ha señalado que cuando se utilizaba COS-1 como hospedador, el Factor C expresado era insoluble (documentos de no patente 3 y 4). Es decir, no se conoce un caso donde el Factor C funcional se produzca utilizando células de mamífero como células huésped.

55 En este contexto, la patente de Estados Unidos nº. 5.858.706 describe el Factor C recombinante y métodos para producirlo. Además, Nakamura *et al.* (Nakamura, T. *et al.*; *Eur. J., Biochem.*, 154; 1986; pp. 551-521) describe el Factor C derivado de hemocitos de *Limulus* sp. Además, Dwarakanath *et al.* (Dwarakanath, R. S. *et al.*; *Biotechnology Letters*,

19(4); 1997; pp. 357-361) describe células recombinantes COS-1 que expresan el Factor C de *Carcinoscorpius rotundicauda*.

Documentos de patente

Documento de patente 1: WO 2008/004674, panfleto

5 Documento de patente 2: WO 2012/118226, panfleto

Documentos no de patente

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

Documento no de patente 2: Nakamura T., *et al.*, J, Biochem. Mar; 99(3): 847-57 (1986)

Documento no de patente 3: Roopashree S. Dwarakanath, *et al.*, Biotechnology letters 19(4): 357-361 (1997)

10 Documento no de patente 4: Jing Wang, Bow Ho y Jeak L. Ding, Biotechnology letters 23: 71-76 (2001)

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para mitigar una inhibición de reacción en ensayo de endotoxina en presencia de un ion salino, un método para producir un Factor C recombinante para uso en dicho método, y un método para medir endotoxina.

15 Por otra parte, los inyectables para administración *in vivo* generalmente contienen diversas sales (iones). En la producción de tales inyectables, es obligatoria la detección de endotoxina por la farmacopea del país correspondiente. En tales circunstancias, en un aspecto, otro objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema de reacción en cascada reconstituido que no sea susceptible de inhibición de la reacción incluso en la presencia de una sal (ion).

20 Los presentes inventores han encontrado que se puede producir un Factor C recombinante de cangrejo herradura utilizando células humanas o células de hámster chino como células huéspedes y que se puede medir endotoxina utilizando el Factor C recombinante así producido mientras se mitiga la inhibición de la reacción en presencia de una sal (ion). La presente invención se ha conseguido basándose en estos hallazgos.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a los siguientes puntos:

1. Un método para mitigar una inhibición de reacción en ensayo de endotoxina en presencia de un ion salino, comprendiendo el método:

25 mezclar un Factor C de cangrejo de herradura producido por una célula humana o una célula de hámster chino como célula huésped con una muestra de ensayo que contiene el ion salino,

en donde el Factor C contiene ácido siálico terminal enlazado en (α -2,3) en una cantidad mayor, en comparación con un Factor C de cangrejo herradura expresado usando Sf9 como célula huésped, y

en donde el Factor C exhibe una mayor actividad residual

30 (i) en presencia de citrato de sodio 21 mM, y/o

(ii) en presencia de hidrogenocarbonato de sodio 52 mM, y/o

(iii) en presencia de cloruro de sodio 214 mM, y/o

(iv) en presencia de sulfato de magnesio 16 mM,

en comparación con un Factor C de cangrejo herradura expresado en Sf9 como célula huésped.

35 2. El método según el punto 1, en el que el ion salino se selecciona del grupo que consiste en ion sodio, ion potasio, ion calcio y ion magnesio.

3. El método de acuerdo con el punto 1 o el punto 2, en el que el Factor C de cangrejo herradura es una proteína que se muestra en los siguientes (A), (B), (C) o (D):

(A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;

40 (B) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% o más con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y que tiene actividad de Factor C;

(C) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4;

(D) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% o más con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y que tiene actividad de Factor C.

4. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3, en el que el cangrejo herradura se selecciona del grupo que consiste en *Tachypleus tridentatus*, *Limulus polyphemus*, *Carcinoscorpius rotundicauda* y *Tachypleus gigas*.
5. Un método para producir un Factor C de cangrejo herradura soluble en agua para usar en el ensayo de endotoxinas en presencia de un ion salino, comprendiendo el método:
 - 5 expresar el Factor C de cangrejo herradura en una célula humana o una célula de hámster chino como célula huésped, en donde el Factor C contiene ácido siálico terminal enlazado en (α -2,3) en una mayor cantidad, en comparación con un Factor C de cangrejo herradura expresado usando Sf9 como célula huésped, y en donde el Factor C exhibe una mayor actividad residual
 - (i) en presencia de citrato de sodio 21 mM, y/o
 - 10 (ii) en presencia de hidrogenocarbonato de sodio 52 mM, y/o
 - (iii) en presencia de cloruro de sodio 214 mM, y/o
 - (iv) en presencia de sulfato de magnesio 16 mM,en comparación con un Factor C cangrejo herradura expresado en Sf9 como célula huésped.
6. El método según el punto 5, comprendiendo el método:
 - 15 recuperar el Factor C de cangrejo herradura expresado como una solución.
7. El método según el punto 5 o el punto 6, en el que el ion salino se selecciona del grupo que consiste en ion sodio, ion potasio, ion calcio y ion magnesio.
8. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 5 a 7, en el que el Factor C de cangrejo herradura es una proteína que se muestra en los siguientes (A), (B), (C) o (D):
 - 20 (A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;
 - (B) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% o más con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y que tiene actividad de Factor C;
 - (C) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4;
 - 25 (D) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% o más con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y que tiene actividad de Factor C.
9. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 5 a 8, en el que el cangrejo herradura se selecciona del grupo que consiste en *Tachypleus tridentatus*, *Limulus polyphemus*, *Carcinoscorpius rotundicauda*, y *Tachypleus gigas*.
10. Un método para medir la endotoxina en una muestra de ensayo, comprendiendo el método:
 - 30 una etapa de mezclar un agente de ensayo que comprende un Factor C de cangrejo herradura producido por una célula humana o una célula de hámster chino como célula huésped y la muestra de ensayo, y una etapa para medir el progreso de una reacción en cascada, en el que el Factor C de cangrejo herradura contiene ácido siálico terminal enlazado (α -2,3) en una mayor cantidad en comparación con un Factor C de cangrejo herradura expresado en Sf9 como célula huésped,
 - 35 en donde la muestra de ensayo contiene iones de sodio, y en donde la cantidad contenida del ion en la muestra de ensayo es tal que la concentración del ion sodio obtenida a partir de la muestra de ensayo llega a 20 mM o más, como una concentración final en el sistema de reacción después de mezclar la muestra de ensayo con el agente de ensayo.
11. El método de acuerdo con el ítem 10, en el que el Factor C de cangrejo herradura es una proteína que se muestra en los siguientes (A), (B), (C) o (D):
 - 40 (A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;
 - (B) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% o más con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y que tiene actividad del Factor C;

(C) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4;

(D) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% o más con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y que tiene actividad de Factor C.

5 12. El método según el punto 10 o el punto 11, en el que el cangrejo herradura se selecciona del grupo que consiste en *Tachypleus tridentatus*, *Limulus polyphemus*, *Carcinoscorpius rotundicauda*, y *Tachypleus gigas*.

Las figuras muestran:

[Fig. 1] Un diagrama que muestra un sistema de reacción en cascada de la prueba de limulus.

10 [Fig. 2] Una fotografía que muestra los resultados de una transferencia de Western de cuatro tipos de Factor C (Sf9, CHO, HEK y TAL) derivados del cangrejo herradura japonés (*Tachypleus tridentatus*), en condiciones no reductoras.

[Fig. 3] Una fotografía (SDS-PAGE) que muestra el peso molecular de un Factor C nativo (TAL) derivado del cangrejo herradura japonés (*Tachypleus tridentatus*) y de un Factor C recombinante (CHO).

[Fig. 4] Un esquema de la medición de la actividad del Factor C.

[Fig. 5] Un diagrama que muestra un sistema de reacción en cascada reconstituido.

15 [Fig. 6] Una tabla y un gráfico que muestra la actividad de los cuatro tipos de Factor C (Sf9, CHO, HEK y TAL) derivados del cangrejo herradura japonés (*Tachypleus tridentatus*).

[Fig. 7] Una tabla y un gráfico que muestra la actividad de inhibición por inyectables de los cuatro tipos de Factor C (Sf9, CHO, HEK y TAL) derivados del cangrejo herradura japonés (*Tachypleus tridentatus*).

20 [Fig. 8] Alineamiento del Factor C de *Tachypleus tridentatus* (TtFC) y el Factor C de *Carcinoscorpius rotundicauda* (834CrID4) (continúa en la Fig. 9). Están subrayadas las secuencias consenso que pueden experimentar una modificación de la cadena de azúcar de tipo N (cadena de azúcar ligada a N).

[Fig. 9] Alineamiento del Factor C de *Tachypleus tridentatus* (TtFC) y el Factor C of *Carcinoscorpius rotundicauda* (834CrID4) (continúa de la Fig. 8). Están subrayadas las secuencias consenso que pueden experimentar una modificación de la cadena de azúcar de tipo N (cadena de azúcar ligada a N).

25 [Fig. 10] Una representación esquemática de sitios de reacción entre el Factor C y anticuerpos específicos en condiciones reductoras y no reductoras.

[Fig. 11] Una fotografía (SDS-PAGE) que muestra el peso molecular de los cuatro tipos de Factor C purificados derivados del cangrejo herradura japonés (*Tachypleus tridentatus*).

30 [Fig. 12] Una fotografía (transferencia de Western) que muestra el peso molecular de los cuatro tipos de Factor C purificado derivados del cangrejo herradura japonés (*Tachypleus tridentatus*).

[Fig. 13] Una fotografía (transferencia de Western) que muestra los resultados de la eliminación de la cadena de azúcar de tipo N, por glicopeptidasa F, de los cuatro tipos de Factor C purificado derivados del cangrejo herradura japonés (*Tachypleus tridentatus*).

35 [Fig. 14] (a) Una fotografía (transferencia de lectinas) que muestra los resultados de la detección de la cadena de azúcar de tipo N de los cuatro tipos de Factor C purificado derivados del cangrejo herradura japonés (*Tachypleus tridentatus*); (b) una tabla que muestra la especificidad de unión de la lectina; y (c) una representación esquemática de estructuras de cadena de azúcar de tipo N de un Factor C recombinante, asumidos por los resultados experimentales e informes de documentos.

(1) Factor C

40 El Factor C descrito en la presente memoria es un Factor C derivado de un cangrejo herradura. El Factor C descrito en la presente memoria es una proteína recombinante. La expresión "proteína recombinante" se refiere a una proteína obtenida mediante la introducción de un gen que codifica la proteína en una célula huésped y la expresión heteróloga del gen. El Factor C descrito en la presente memoria tiene actividad de Factor C.

45 Los ejemplos de cangrejo herradura incluyen *Tachypleus tridentatus* (cangrejo herradura japonés), *Limulus polyphemus* (cangrejo herradura americano), *Carcinoscorpius rotundicauda* (cangrejo herradura (singapurensis) del sudeste asiático) y *Tachypleus gigas* (cangrejo herradura del sudeste asiático). Entre ellos, son preferibles *Tachypleus tridentatus* (cangrejo herradura japonés) y *Carcinoscorpius rotundicauda* (cangrejo herradura (singapurensis) del sudeste asiático) como una fuente de Factor C. Además, entre ellos, es más preferible *Tachypleus tridentatus* (cangrejo herradura japonés) como fuente de Factor C. La secuencia de aminoácidos del Factor C derivado de

50 *Tachypleus tridentatus* se muestra en la SEQ ID NO: 2. La secuencia de nucleótidos de un gen que codifica el Factor

C derivado de *Tachypleus tridentatus* se muestra en la SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos del Factor C derivado de *Carcinoscorpius rotundicauda* se muestra en la SEQ ID NO: 4. La secuencia de nucleótidos de un gen que codifica el Factor C derivado de *Carcinoscorpius rotundicauda* se muestra en la SEQ ID NO: 3.

El Factor C descrito en la presente memoria puede experimentar una modificación de la cadena de azúcar de tipo N (cadena de azúcar ligada a N). La expresión "cadena de azúcar de tipo N" se refiere a una cadena de azúcar que está unida a un resto de asparagina de una proteína. En el Factor C derivado de *Tachypleus tridentatus* y el Factor C derivado de *Carcinoscorpius rotundicauda*, se conservan los restos de aminoácido que pueden experimentar una modificación de la cadena de azúcar de tipo N. Las Figs. 8 y 9 muestran los alineamientos y secuencias consenso (Asn-Xaa-Ser/Thr, en donde Xaa representa cualquier resto de aminoácido) que puede experimentar una modificación de la cadena de azúcar de tipo N de ambos tipos de Factor C. Por lo tanto, en particular, se piensa que el Factor C derivado de *Carcinoscorpius rotundicauda* es un Factor C tan adecuado como el Factor C derivado de *Tachypleus tridentatus*.

El Factor C descrito en la presente memoria puede contener un ácido siálico. Los ejemplos de ácido siálico incluyen el ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) y el ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc). La expresión "que contiene un ácido siálico" se refiere al estado en el que un ácido siálico está unido al Factor C descrito en la presente memoria. El ácido siálico puede estar unido a Factor C directa o indirectamente. En un caso, una cadena de azúcar que contiene un ácido siálico puede estar unida a Factor C, con lo que el ácido siálico puede estar indirectamente unido a Factor C. El ácido siálico puede ser, por ejemplo, un ácido siálico unido (α -2,3), más específicamente, un ácido siálico terminal unido (α -2,3). El término "ácido siálico unido (α -2,3)" se refiere a un ácido siálico unido a un azúcar a través de enlace glucosídico (α -2,3). El término "ácido siálico terminal unido (α -2,3)" se refiere a un ácido siálico que está unido a un azúcar a través de enlace glucosídico (α -2,3) y que se encuentra en un extremo de la cadena de azúcar. Un ejemplo de la cadena de azúcar es una cadena de azúcar de tipo N (cadena de azúcar ligada a N). Se puede añadir ácido siálico a Factor C a través de, por ejemplo, expresión de Factor C en una célula huésped que puede añadir una cadena de azúcar que contenga ácido siálico a una proteína a través de modificación después de traducción. Entre los ejemplos de tal célula huésped se incluyen células de mamífero. Se puede detectar ácido siálico a través de, por ejemplo, análisis de cadena de azúcar. El análisis de cadena de azúcar puede llevarse a cabo a través de una técnica conocida. Por ejemplo, el análisis de cadena de azúcar puede llevarse a cabo utilizando lectina o un anticuerpo que reconoce una cadena de azúcar. Específicamente, por ejemplo, un ácido siálico terminal unido (α -2,3) puede detectarse específicamente a través de transferencia de lectinas utilizando aglutinina de *Maackia amurensis* (MAM).

El Factor C descrito en la presente memoria puede contener ácido siálico en una cantidad mayor, en comparación con un Factor C control. La expresión "que contiene ácido siálico en una cantidad mayor, en comparación con un Factor C control" se refiere al estado en el que la cantidad de ácido siálico unido al Factor C descrito en la presente memoria es mayor que la cantidad de ácido siálico unido al Factor C control, en términos de la cantidad por mol de ácido siálico por molécula de Factor C. Por ejemplo, la cantidad de ácido siálico unido al Factor C descrito en la presente memoria puede ser 1,1 veces o mayor, 1,2 veces o mayor, 1,3 veces o mayor, 1,5 veces o mayor, 2,0 veces o mayor, 2,5 veces o mayor, o 3,0 veces o mayor que la cantidad de ácido siálico unido al Factor C control, en términos de la cantidad por mol de ácido siálico por molécula de Factor C.

Entre los ejemplos de Factor C control se incluyen un Factor C recombinante expresado en la célula de insecto Sf9 y un Factor C nativo. La expresión "Factor C expresado en Sf9 como célula huésped" se refiere a Factor C obtenible a través de la expresión de un gen que codifica Factor C que consiste en la misma secuencia de aminoácidos que la del Factor C descrito en la presente memoria, en Sf9 como célula huésped. La expresión "Factor C nativo" se refiere a Factor C aislado y purificado de un lisado de cangrejo herradura. El Factor C nativo puede ser Factor C aislado y purificado de un lisado de un cangrejo herradura del cual se deriva el Factor C descrito en la presente memoria. Es decir, específicamente, por ejemplo, cuando el Factor C descrito en la presente memoria es un Factor C recombinante de *Tachypleus tridentatus* o una variante del mismo, el Factor C nativo puede ser Factor C aislado y purificado de un lisado de *Tachypleus tridentatus*.

Si "el Factor C descrito en la presente memoria contiene ácido siálico en una cantidad mayor, en comparación con un Factor C control" o no, puede determinarse a través de la comparación entre la cantidad de ácido siálico del Factor C descrito en la presente memoria y la del Factor C control. La cantidad de ácido siálico puede determinarse mediante, por ejemplo, análisis de cadena de azúcar. El análisis de cadena de azúcar puede llevarse a cabo a través de una técnica conocida. Por ejemplo, el análisis de cadena de azúcar puede llevarse a cabo utilizando lectina o un anticuerpo que reconoce una cadena de azúcar. Específicamente, por ejemplo, un ácido siálico terminal ligado a (α -2,3) puede cuantificarse específicamente a través de transferencia de lectinas utilizando aglutinina de *Maackia amurensis* (MAM). Puede confirmarse que cuanto más elevada es la reactividad en la transferencia de lectinas utilizando MAM, mayor es la cantidad de ácido siálico terminal unido (α -2,3), es decir, mayor es la cantidad de ácido siálico terminal unido (α -2,3) que contiene el Factor C. En otras palabras, el Factor C descrito en la presente memoria puede presentar reactividad más elevada, en comparación con el Factor C control, en la transferencia de lectinas utilizando MAM. La expresión "presentan reactividad más elevada, en comparación con el Factor C control, en la transferencia de lectinas utilizando MAM" se refiere a la afirmación de que, cuando la misma cantidad del Factor C descrito en la presente memoria y el Factor C control se someten a transferencia de lectinas utilizando MAM, la intensidad de detección (tal como el grado de coloración) de la mancha atribuida al Factor C descrito en la presente memoria es más elevada que la de la mancha atribuida al Factor C control.

El Factor C descrito en la presente memoria puede no tener una etiqueta His-tag añadida en el extremo C terminal. Asimismo, el Factor C descrito en la presente memoria puede no tener una etiqueta V5-tag añadida en el extremo C terminal. Asimismo, el Factor C descrito en la presente memoria puede no tener un péptido añadido en el extremo N terminal. Asimismo, el Factor C descrito en la presente memoria puede no tener un péptido añadido en ninguno de los extremos N-terminal y C-terminal,

Siempre que el Factor C descrito en la presente memoria tenga actividad de Factor C, el Factor C puede ser una variante de cualquiera de las proteínas de Factor C de los cangrejos herradura mencionados anteriormente (p. ej. una proteína que tenga una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o 4). Tal variante incluye, por ejemplo, un homólogo y un producto modificado artificialmente del Factor C anteriormente mencionado. En particular, la secuencia de aminoácidos de la variante no se encuentra necesariamente en un cangrejo herradura real. Es decir, el Factor C "de un cangrejo herradura o derivado de un cangrejo herradura" incluye una variante del Factor C encontrado en un cangrejo herradura y tiene una secuencia de aminoácidos que no se encuentra en ningún cangrejo herradura.

La actividad del Factor C se refiere a una actividad tal que el Factor C se activa en presencia de endotoxina para convertir el Factor B en Factor B activado. Si "el Factor C descrito en la presente memoria tiene actividad de Factor C" puede confirmarse, por ejemplo, combinando el Factor C descrito en la presente memoria con un Factor B adecuado y una enzima procoagulante adecuada en presencia de endotoxina y detectando el progreso de la reacción en cascada. Específicamente, la proteína de la SEQ ID NO: 6 y la proteína de la SEQ ID NO: 8 pueden utilizarse como un Factor B adecuado y una enzima procoagulante adecuada, respectivamente. El progreso de la reacción en cascada puede determinarse utilizando el sustrato para detección mencionado más adelante.

Siempre que el Factor C descrito en la presente memoria tenga actividad de Factor C, el Factor C descrito en la presente memoria puede ser una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del Factor C anteriormente mencionada tal como la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o 4, pero que incluye sustitución, eliminación, inserción o adición de uno o más restos de aminoácido. Aunque el significado de la expresión "uno o varios" varía dependiendo de las posiciones de los restos de aminoácido en la estructura tridimensional de la proteína y de los tipos de los restos de aminoácido, el término se refiere específicamente a preferiblemente 1 a 20, más preferiblemente 1 a 10, todavía más preferiblemente 1 a 5, en particular preferiblemente 1 a 3. La sustitución, eliminación, inserción o adición de uno o más restos de aminoácido es una variación conservadora en donde la función de la proteína se mantiene apropiadamente. Una variación conservadora típica es la sustitución. La sustitución conservadora es una variación entre Phe, Trp y Tyr, en el caso en donde la sustitución tiene lugar en un resto de aminoácido aromático; una variación entre Leu, Ile y Val, en el caso en donde la sustitución tiene lugar en un resto de aminoácido hidrofóbico; una variación entre Gln y Asn, en el caso en donde la sustitución tiene lugar en un resto de aminoácido polar; una variación entre Lys, Arg y His, en el caso en donde la sustitución tiene lugar en un resto de aminoácido básico; una variación entre Asp y Glu, en el caso en donde la sustitución tiene lugar en un resto de aminoácido ácido; o una variación entre Ser y Thr, en el caso en donde la sustitución tiene lugar en un resto de aminoácido que tiene un grupo hidroxilo. Entre los ejemplos de la sustitución que pueden ser reconocidos como de sustitución conservadora se incluyen una sustitución de Ala por Ser o Thr; una sustitución de Arg por Gln, His o Lys; una sustitución de Asn por Glu, Gln, Lys, His o Asp; una sustitución de Asp por Asn, Glu o Gln; una sustitución de Cys por Ser o Ala; una sustitución de Gln por Asn, Glu, Lys, His, Asp o Arg; una sustitución de Gln por Gly, Asn, Gln, Lys o Asp; una sustitución de Gly por Pro; una sustitución de His por Asn, Lys, Gln, Arg o Tyr; una sustitución de Ile por Leu, Met, Val o Phe; una sustitución de Leu por Ile, Met, Val o Phe; una sustitución de Lys por Asn, Glu, Gln, His o Arg; una sustitución de Met por Ile, Leu, Val o Phe; una sustitución de Phe por Trp, Tyr, Met, Ile o Leu; una sustitución de Ser por Thr o Ala; una sustitución de Thr por Ser o Ala; una sustitución de Trp por Phe o Tyr; una sustitución de Tyr por His, Phe o Trp; y una sustitución de Val por Met, Ile o Leu. La sustitución mencionada anteriormente, eliminación, inserción, adición o similar de uno o más restos de aminoácido también incluye variaciones que suceden naturalmente tales como aquellas basadas en diferencias individuales entre cangrejos herradura y la variedad y especie de los cangrejos herradura, de los que se deriva el gen.

El Factor C descrito en la presente memoria puede también ser una proteína que tiene una homología o identidad del 80% o superior, preferiblemente del 90 % o superior, más preferiblemente del 95 % o superior, aún más preferiblemente del 97 % o superior, en particular preferiblemente del 99% o superior con respecto a la secuencia completa de aminoácidos del Factor C (p. ej., la secuencia completa de aminoácido mostrada en la SEQ ID NO: 2 o 4) y que tiene actividad de Factor C.

El gen que codifica el Factor C descrito en la presente memoria no está especialmente limitado, siempre que el gen codifique el Factor C mencionado anteriormente. El gen que codifica el Factor C descrito en la presente memoria puede ser un ADN que codifica una proteína que tiene actividad de Factor C, en donde el fragmento de ADN está hibridado con una sonda preparada a partir de una secuencia génica conocida, p. ej., con la secuencia complementaria a la totalidad o a una parte de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o 3, en condiciones restrictivas. Como se emplea en esta memoria, la expresión "condiciones restrictivas" generalmente se refiere a las condiciones bajo las cuales se forma un híbrido específico, pero no se forma un híbrido no específico. Un ejemplo de tales condiciones son las condiciones en las que ADN que tienen una elevada homología, p. ej., una homología del 80 % o más elevada, preferiblemente del 90 % o superior, más preferiblemente del 95 % o superior, aún más preferiblemente del 97 % o superior, en particular preferiblemente del 99 % o más elevada, se hibridan entre sí y ADN que tienen una

homología inferior que el nivel anterior no se hibridan entre sí. Otro ejemplo de las condiciones son las condiciones empleadas generalmente en el lavado de la hibridación Southern; es decir, lavado una vez, preferiblemente de 2 a 3 veces, a temperatura y concentración salina correspondientes a 60 °C, SSC 1×, SDS 0,1 %, preferiblemente 60 °C, SSC 0,1×, SDS 0,1 %, más preferiblemente 68 °C, SSC 0,1×, SDS 0,1 %.

En el gen que codifica el Factor C descrito en la presente memoria, se puede sustituir cualquier codón por su codón equivalente. Por ejemplo, la combinación de codones del gen que codifica el Factor C descrito en la presente memoria se puede modificar de tal manera que la combinación de codones se optimice para expresión en una célula de mamífero. La optimización puede realizarse mediante el empleo de, por ejemplo, un servicio de contrato convencional. En particular, el gen que codifica el Factor C descrito en la presente memoria puede ser una variante de un ADN en el que la combinación de codones esté optimizada para expresión en una célula de mamífero.

Las descripciones mencionadas acerca de las variantes de genes y proteínas pueden aplicarse también con los cambios debidos al Factor B, la enzima procoagulante y el gen que la codifica.

El Factor C descrito en la presente memoria puede tener un peso molecular de 115 kDa a 140 kDa, de 115 kDa a 130 kDa, de 120 kDa a 130 kDa o de 120 kDa a 128 kDa, medido mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) en una condición no reductora. Asimismo, el Factor C descrito en la presente memoria puede tener un peso molecular de 127 kDa $\pm$ 5 kDa, 128 kDa $\pm$ 2 kDa, 127 kDa $\pm$ 2 kDa, 126 kDa $\pm$ 2 kDa o 127 kDa $\pm$ 1 kDa, medido mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) en una condición no reductora. Asimismo, el Factor C descrito en la presente memoria puede tener un peso molecular de 128 kDa o 126 kDa, medido mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) en una condición no reductora.

El Factor C descrito en la presente memoria puede tener baja susceptibilidad a la inhibición de actividad por un ion. La expresión "baja susceptibilidad a inhibición de actividad por un ion" se refiere a la afirmación de que el Factor C descrito en la presente memoria presenta una elevada actividad residual en la presencia de un ion, en comparación con un Factor C control. Entre los ejemplos de Factor C control se incluyen un Factor C recombinante expresado en la célula de insecto Sf9 y un Factor C nativo. El significado de la expresión "que presenta una elevada actividad residual" no está especialmente limitado, siempre que la actividad residual del Factor C descrito en la presente memoria sea más elevada que la del Factor C control. La expresión "que presenta una elevada actividad residual" puede referirse, por ejemplo, a la afirmación de que la actividad residual del Factor C descrito en la presente memoria es 1,1 veces o más, 1,2 veces o más, 1,3 veces o más, 1,5 veces o más, 2,0 veces o más, 2,5 veces o más o 3,0 veces o más veces mayor que la actividad residual del Factor C control. Entre los ejemplos específicos de "baja susceptibilidad a inhibición de actividad por un ion" se incluye la propiedad de que el Factor C descrito en la presente memoria presenta una actividad residual más elevada en presencia de citrato sódico 21 mM, en comparación con el Factor C control; la propiedad de que el Factor C descrito en la presente memoria presenta una actividad residual más elevada en presencia de hidrogenocarbonato de sodio 52 mM, en comparación con el Factor C control; la propiedad de que el Factor C descrito en la presente memoria presenta una actividad residual más elevada en presencia de cloruro sódico 214 mM, en comparación con el Factor C control; la propiedad de que el Factor C descrito en la presente memoria muestra una actividad residual más elevada en presencia de sulfato de magnesio 16 mM, en comparación con el Factor C control; la propiedad de que el Factor C descrito en la presente memoria presenta una actividad residual más elevada en presencia de cloruro cálcico 2,5 mM, en comparación con el Factor C control. Entre los ejemplos específicos de "baja susceptibilidad a inhibición de actividad por un ion" adicionalmente se incluye la propiedad de que el Factor C descrito en la presente memoria presenta una actividad residual del 10 % o más elevada o del 20 % o más elevada en presencia de citrato sódico 21 mM, en comparación con el Factor C control; la propiedad de que el Factor C descrito en la presente memoria presenta una actividad residual del 25 % o más elevada o del 35 % o más elevada en presencia de hidrogenocarbonato de sodio 52 mM, en comparación con el Factor C control; la propiedad de que el Factor C descrito en la presente memoria presenta una actividad residual del 25 % o más elevada o del 35 % o más elevada en presencia de cloruro sódico 214 mM, en comparación con el Factor C control; la propiedad de que el Factor C descrito en la presente memoria presenta una actividad residual del 15 % o más elevada o del 25 % o más elevada en presencia de sulfato de magnesio 16 mM, en comparación con el Factor C control; la propiedad de que el Factor C descrito en la presente memoria presenta una actividad residual del 35 % o más elevada o del 45 % o más elevada en presencia de cloruro cálcico 2,5 mM, en comparación con el Factor C control. El Factor C descrito en la presente memoria puede tener una cualquiera de las propiedades anteriores por separado o dos o más de las propiedades anteriores combinadas. La "actividad residual" se define como una reactividad relativa (%) observada para un espécimen de medición (concentración de endotoxina: 0,05 EU/ml) preparado añadiendo endotoxina a un espécimen de prueba que contiene iones, con respecto a la reactividad observada para otro espécimen de medición (concentración de endotoxina: 0,05 EU/ml) preparado añadiendo endotoxina a agua inyectable como 100 %, en el sistema de ensayo mostrado en la Fig. 4.

El Factor C descrito en la presente memoria puede ser soluble en agua. Como se emplea en esta memoria, la expresión "soluble en agua" se refiere a la afirmación de que, cuando el Factor C descrito en la presente memoria se expresa en una célula huésped adecuada, el Factor C así expresado se detecta en una fracción soluble. La expresión "detectado en una fracción soluble" puede referirse a la afirmación de que el 20 %, el 50 % o más, el 80 % o más, el 90 % o más, o el 95 % o más del Factor C expresado se detecta en una fracción soluble.

(2) Método para producir Factor C

El Factor C descrito en la presente memoria puede producirse mediante, por ejemplo, expresión en una célula de mamífero como un hospedador. Es decir, en la presente memoria se describe un método para producir un Factor C de cangrejo herradura, comprendiendo el método expresar el Factor C de cangrejo herradura en una célula de mamífero como célula huésped. El Factor C producible mediante el método de producción descrito en la presente memoria es una realización del Factor C descrito en la presente memoria.

La célula de mamífero no está especialmente limitada, siempre que la célula pueda expresar funcionalmente un Factor C de cangrejo herradura. El término "expresión funcional" se refiere a la afirmación de que el Factor C expresado presenta actividad de Factor C. Específicamente, la célula de mamífero puede ser una célula distinta de una célula COS-1. La célula de mamífero es preferiblemente una célula de un mamífero seleccionada del grupo consistente en un roedor y un primate. Entre los ejemplos de roedor se incluyen, pero no se limitan necesariamente a hámster chino, hámster, ratón, rata y conejillo de Indias. De estos, es preferible el hámster chino. Entre los ejemplos de célula de hámster chino se incluye la línea celular de ovario de hámster chino (CHO). Entre los ejemplos de CHO se incluyen CHO DG44 y CHO K1. Entre los ejemplos de primate se incluyen, pero no se limitan necesariamente a ser humano, mono y chimpancé. El primate puede ser un primate distinto del mono. De estos, es preferible el ser humano. Entre los ejemplos de célula humana se incluye la línea celular de riñón humano embrionario (HEK). Entre los ejemplos de HEK se incluye HEK293.

Cuando la célula de mamífero retiene un gen que codifica el Factor C, la célula puede expresar Factor C. El gen que codifica el Factor C puede estar retenido en la célula de mamífero, de tal manera que puede expresarse bajo el control de un promotor que funciona en la célula. En la célula de mamífero, el gen que codifica el Factor C, por ejemplo, puede estar presente en un vector tal como un plásmido que experimenta replicación autónoma fuera de un cromosoma o puede introducirse en un cromosoma. La técnica de introducción del gen que codifica el Factor C en una célula de mamífero no está especialmente limitada. Entre los ejemplos del vector que experimenta replicación autónoma fuera de un cromosoma se incluye el pCA7 (Makoto Takeda, *et al.*, J., *Viol.* 79(22): 14346-54 (2005) 5. Como alternativa, el gen que codifica el Factor C puede introducirse en un cromosoma de una célula de mamífero utilizando el vector pCI-Neo (producto de Promega). La célula de mamífero puede retener una copia, o dos o más copias, del gen que codifica el Factor C.

Las condiciones de cultivo en las que se cultiva una célula de mamífero no están especialmente limitadas, siempre que la célula de mamífero pueda proliferar. Se pueden utilizar condiciones generalmente empleadas en el cultivo de células de mamífero, después de haberse realizado modificaciones apropiadas, si fuera necesario. Un medio de cultivo que generalmente se utiliza en cultivo de células de mamífero puede emplearse como medio de cultivo en la presente memoria. Específicamente, puede utilizarse un medio RPMI 1640 (producto de Sigma) o un medio DMEM (producto de Sigma). El cultivo puede realizarse, por ejemplo, como un cultivo estático de 36 °C a 38 °C con alimentación de 5 % CO₂.

Si se ha expresado funcionalmente o no el Factor C puede confirmarse midiendo actividad del Factor C. La expresión del Factor C puede también confirmarse midiendo la cantidad de ARNm formado a través de la transcripción de un gen que codifica el Factor C o detectando Factor C a través de transferencia de Western usando un anticuerpo.

El Factor C expresado puede recuperarse como una solución que contiene Factor C y puede utilizarse como un componente del agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria. La solución que contiene Factor C puede ser, por ejemplo, un caldo de cultivo, un sobrenadante de cultivo, un extracto celular alterado, una mezcla de los mismos o similar. El Factor C puede utilizarse después de purificarse hasta un punto deseado o puede utilizarse sin ninguna purificación. Como se describe en la presente memoria, incluso cuando un sobrenadante de cultivo celular que contiene el Factor C expresado se utiliza tal cual sin ninguna purificación, puede alcanzarse un rendimiento de ensayo de endotoxina satisfactorio. La purificación de Factor C puede realizarse a través de, por ejemplo, una técnica de purificación de proteínas conocida. Entre los ejemplos de tales técnicas se incluyen la precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de hidroxiapatita y demás. En el caso donde se añade una etiqueta tal como His-tag al Factor C, el Factor C puede ser purificado a través de cromatografía de afinidad basada en la afinidad por la etiqueta. Una solución que contiene Factor C puede utilizarse después de haberse filtrado mediante un filtro. Por ejemplo, puede utilizarse como filtro un filtro de 0,22-µm.

(3) Agente de ensayo de endotoxina

El Factor C descrito en la presente memoria puede utilizarse en ensayos de endotoxina. Es decir, En la presente memoria se describe un agente de ensayo de endotoxina que contiene el Factor C descrito en la presente memoria. El agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria puede contener adicionalmente un factor o factores aparte del Factor C, dependiendo de la modalidad de ensayo de endotoxina.

Por ejemplo, el Factor C descrito en la presente memoria puede utilizarse en combinación con Factor B y enzima procoagulante, para ensayo de endotoxina. En otras palabras, una realización del agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria es un agente de ensayo de endotoxina que contiene el Factor C descrito en la presente

memoria, Factor B y enzima procoagulante. En este caso, puede medirse endotoxina detectando enzima de coagulación, que es el producto final de la reacción en cascada.

Como alternativa, puede medirse endotoxina detectando una etapa intermedia de la reacción en cascada. En este caso, es suficiente con que el agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria contenga un factor o factores implicados desde el principio de la reacción en cascada hasta la etapa intermedia relevante. Específicamente, por ejemplo, cuando la endotoxina se mide mediante la detección del Factor C activado, que es un intermedio de la reacción en cascada, es suficiente con que el agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria contenga Factor C.

El Factor B descrito en la presente memoria es un Factor B derivado de un cangrejo herradura. La enzima procoagulante descrita en la presente memoria es una enzima procoagulante derivada de un cangrejo herradura. Los ejemplos de cangrejo herradura incluyen *Tachypleus tridentatus* (cangrejo herradura japonés), *Limulus polyphemus* (cangrejo herradura americano), *Carcinoscorpius rotundicauda* (cangrejo herradura (singapurensis) del sudeste asiático) y *Tachypleus gigas* (cangrejo herradura del sudeste asiático). Entre ellos, se prefiere el *Tachypleus tridentatus* (cangrejo herradura japonés) como fuente de Factor B y de enzima procoagulante.

La secuencia de aminoácidos del Factor B de *Tachypleus tridentatus* y la de la enzima procoagulante de *Tachypleus tridentatus* se muestran en la SEQ ID NO: 6 y 8, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de un gen que codifica el Factor B de *Tachypleus tridentatus* y la de un gen que codifica la enzima procoagulante de *Tachypleus tridentatus* se muestran en la SEQ ID NO: 5 y 7, respectivamente.

El Factor B descrito en la presente memoria puede ser una variante de cualquiera de las proteínas de Factor B de cangrejo herradura mencionadas anteriormente (p. ej. una proteína que tenga la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6), siempre que la variante tenga actividad de Factor B. Tal variante incluye, por ejemplo, un homólogo y un producto modificado artificialmente del Factor B mencionado anteriormente. El gen que codifica el Factor B descrito en la presente memoria no está especialmente limitado, siempre que el gen codifique el Factor B mencionado anteriormente. Las descripciones mencionadas anteriormente sobre las variantes de Factor C y el gen que codifica el Factor C pueden también aplicarse con los cambios debidos a las variantes de Factor B y el gen que codifica el Factor B.

La actividad de Factor B se refiere a una actividad tal que el Factor B se activa en presencia del Factor C activado para convertir la enzima procoagulante en la forma activada de la misma, es decir, la correspondiente enzima de coagulación. Si "el Factor B descrito en la presente memoria tiene actividad de Factor B" se puede confirmar, por ejemplo, combinando el Factor B descrito en la presente memoria con un Factor C adecuado y una enzima procoagulante adecuada en presencia de endotoxina y detectando el progreso de la reacción en cascada. Específicamente, la proteína de la SEQ ID NO: 2 y la proteína de la SEQ ID NO: 8 pueden utilizarse como un Factor C adecuado y una enzima procoagulante adecuada, respectivamente. El progreso de la reacción en cascada puede determinarse utilizando el sustrato para detección mencionado más adelante.

La enzima procoagulante descrita en la presente memoria puede ser una variante de cualquiera de las enzimas procoagulantes de cangrejo herradura mencionadas anteriormente (p. ej. una proteína que tenga la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 8), siempre que la variante tenga actividad de enzima procoagulante. Tal variante incluye, por ejemplo, un producto homólogo y modificado artificialmente de la enzima procoagulante mencionada anteriormente. El gen que codifica la enzima procoagulante descrita en la presente memoria no está especialmente limitado, siempre que el gen codifique la enzima procoagulante mencionada anteriormente. Las descripciones mencionadas anteriormente sobre las variantes de Factor C y el gen que codifica el Factor C pueden también aplicarse con los cambios debidos a las variantes de la enzima procoagulante y el gen que codifica enzima procoagulante.

La actividad de la enzima procoagulante es tal que la enzima procoagulante se convierte en la forma activada de la misma, es decir, la correspondiente enzima de coagulación, en presencia de Factor B activado, para reaccionar con el sustrato para detección mencionado más adelante. La actividad de reacción con el sustrato de detección se refiere a, por ejemplo, una actividad de reacción con un coagulígeno para inducir coagulación o una actividad de reacción con el sustrato descrito más adelante representado por X-Y-Z (en donde X representa un grupo de protección, Y representa un péptido y Z representa un colorante unido a Y a través de un enlace amida), para así liberar el colorante Z (p. ej. una actividad de reacción con Boc-Leu-Gly-Arg-pNA, para así liberar pNA). Si "la enzima procoagulante descrita en la presente memoria tiene la actividad de enzima procoagulante" se puede confirmar, por ejemplo, combinando la enzima procoagulante descrita en la presente memoria con un Factor C adecuado y un Factor B adecuado en presencia de endotoxina y detectando el progreso de la reacción en cascada. Específicamente, la proteína de la SEQ ID NO: 2 y la proteína de la SEQ ID NO: 6 pueden utilizarse como un Factor C adecuado y un Factor B adecuado, respectivamente. El progreso de la reacción en cascada puede medirse utilizando el sustrato para detección mencionado más adelante.

Siempre que el Factor B descrito en la presente memoria y la enzima procoagulante descrita en la presente memoria tenga actividad de Factor B y actividad de enzima procoagulante, respectivamente, el Factor B descrito en la presente memoria y/o la enzima procoagulante descritos en la presente memoria pueden tener cualquier péptido o similar

añadido al mismo. Entre los ejemplos de tales péptidos se incluyen secuencias de etiquetas tales como His-tag y V5-tag. De forma similar al Factor C descrito en la presente memoria, el Factor B descrito en la presente memoria y/o la enzima procoagulante descrita en la presente memoria pueden no tener etiqueta His-tag añadida al extremo C terminal; pueden no tener una etiqueta V5-tag añadida en el extremo C terminal; pueden no tener un péptido añadido en el extremo C terminal; pueden no tener un péptido añadido en el extremo N terminal; o pueden no tener un péptido añadido en ninguno de los extremos N-terminal y C-terminal.

En el gen que codifica el Factor B descrito en la presente memoria y/o el gen que codifica la enzima procoagulante descrito en la presente memoria, se puede sustituir cualquier codón por su codón equivalente. Por ejemplo, la combinación de codones del gen que codifica el Factor B descrito en la presente memoria y/o el gen que codifica la enzima procoagulante descrita en la presente memoria puede modificarse de tal manera que la combinación de codones se optimice para expresión en una célula huésped. Un ejemplo de ADN que codifica el Factor B de SEQ ID NO: 6 y cuya combinación de codones está optimizada para expresión en una célula de insecto es un ADN de SEQ ID NO: 9. En particular, el gen que codifica el Factor B descrito en la presente memoria y/o el gen que codifica la enzima procoagulante descrita en la presente memoria pueden ser una variante de un ADN en la que la combinación de codones esté optimizada para expresión en una célula huésped.

El Factor B descrito en la presente memoria y la enzima procoagulante descrita en la presente memoria pueden, cada uno, ser una proteína nativa o una proteína recombinante.

Un Factor B nativo y una enzima procoagulante nativa pueden, cada uno, obtenerse del extracto de hematocito de los diferentes cangrejos herradura mencionados anteriormente. Estos factores se pueden utilizar después de purificarse hasta un punto deseado. La purificación puede realizarse a través de, por ejemplo, una técnica conocida (Nakamura *et al.*, J. Biochem. 1986 Mar; 99(3): 847-57).

El Factor B recombinante y la enzima procoagulante recombinante pueden, cada uno, obtenerse a través de expresión en una célula huésped. La célula huésped no está especialmente limitada, siempre que pueda expresarse un factor de interés. Por ejemplo, puede emplearse una célula huésped utilizada generalmente para expresión heteróloga de proteínas. Entre los ejemplos de la célula huésped se incluyen células de insecto, células animales, células de plantas, levaduras y bacterias. Entre ellos, una célula eucariota es preferible desde el punto de vista de la modificación después de la traducción. Específicamente, son más preferibles una célula de insecto y una célula animal.

Entre los ejemplos de células animales se incluyen células de mamífero. En el caso en donde se utiliza una célula animal tal como una célula de mamífero, las descripciones anteriores acerca de la producción de Factor C descritas en la presente memoria pueden también aplicarse con los cambios debidos a la producción del Factor B y la enzima procoagulante.

Entre los ejemplos de células de insecto se incluyen Sf9, Sf21, SF+ y High-Five. De estos, es preferible Sf9 como célula de insecto.

La técnica para expresar un factor de interés en una célula de insecto como un hospedador no está especialmente limitada, siempre que pueda expresarse el factor de interés. Por ejemplo, pueden utilizarse adecuadamente técnicas generalmente empleadas para expresión heteróloga de proteínas. Por ejemplo, un factor de interés se puede expresar infectando una célula de insecto con un virus en el cual se ha incorporado un gen que codifica el factor (denominándose la técnica un "método de virus"). Asimismo, por ejemplo, un factor de interés se puede expresar incorporando en una célula de insecto un vector en el cual se ha incorporado un gen que codifica el factor, para incorporar, de este modo, el gen en un cromosoma de la célula huésped (la técnica se denomina un "método que expresa una línea celular establemente").

<Método de virus>

El virus empleado en el método de virus no es especialmente limitado, siempre que una línea celular de insecto pueda infectarse con el virus, para así expresar un factor de interés. Puede utilizarse adecuadamente un virus generalmente empleado para expresión de proteínas en células de insecto. Entre los ejemplos de tales virus se incluyen los baculovirus. De los baculovirus son preferibles los nucleopolihedrovirus (NPV). Entre los ejemplos de NPV se incluyen *Autographa californica* NPV (AcNPV) y *Bombyx mori* NPV (BmNPV). De los NPV es preferible el AcNPV.

La incorporación de un ácido nucleico en un virus puede realizarse a través de un método convencional. Por ejemplo, la incorporación de un ácido nucleico en un virus puede realizarse a través de recombinación homóloga mediante el uso de un vector de transferencia. Entre los ejemplos de vectores de transferencia se incluye pPSC8 (producto de Protein Sciences), pFastBac (producto de Life Technologies Corporation) y pVL1393 (producto de Pharmingen). Entre ellos, pPSC8 es un vector de transferencia preferido.

Una célula de insecto puede infectarse, mediante una técnica convencional, con el virus en el que se ha incorporado el gen que codifica un factor de interés, para obtener, de este modo, la célula de insecto que retiene el virus y expresa el factor.

<Método que expresa una línea celular establemente>

A través de la incorporación de un gen que codifica un factor de interés en un cromosoma de una célula de insecto, puede establecerse una línea celular que se expresa establemente que exprese establemente el factor. El método de establecimiento de la línea celular que se expresa establemente no es especialmente limitado y se puede emplear una técnica convencional. Por ejemplo, puede establecerse una línea celular que se expresa establemente utilizando plZ-V5 (producto de Life Technologies Corporation), de acuerdo con unas instrucciones para el usuario adjuntas al respecto.

Las condiciones en las que se cultiva una célula de insecto no son especialmente limitadas, siempre que la célula de insecto pueda proliferar. Pueden utilizarse condiciones generalmente empleadas en el cultivo de células de insecto, después de haberse realizado modificaciones apropiadas, si fuera necesario. Un medio de cultivo que generalmente se utiliza en cultivo de células de insecto puede ser empleado como el medio de cultivo en la presente memoria. Entre los ejemplos de tal medio de cultivo se incluye un medio libre de suero para cultivar células de insecto. Específicamente, podría utilizarse adecuadamente un medio libre de suero Sf900III (producto de Life Technologies Corporation) o similar. El cultivo puede realizarse, por ejemplo, como cultivo agitado de 27 °C a 28 °C.

Si el factor de interés se ha expresado o no, puede confirmarse midiendo la actividad del factor. La expresión de un factor de interés puede también confirmarse midiendo la cantidad de ARNm formado a través de la transcripción de un gen que codifica el factor o detectando el factor a través de transferencia de Western usando un anticuerpo.

El factor expresado puede recuperarse como una solución que contiene el factor y puede utilizarse como un componente del agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria. La solución que contiene el factor puede ser, por ejemplo, un caldo de cultivo, un sobrenadante de cultivo, un extracto celular alterado, una mezcla de los mismos o similar. El factor puede utilizarse después de purificarlo hasta un punto deseado o puede utilizarse sin ninguna purificación. Como se describe en la presente memoria, incluso cuando un cultivo celular sobrenadante que contiene el factor expresado se utiliza tal cual sin ninguna purificación, puede alcanzarse un rendimiento de ensayo de endotoxina satisfactorio. La purificación del factor puede realizarse a través de, por ejemplo, una técnica de purificación de proteínas conocida. Entre los ejemplos de tales técnicas se incluyen la precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de hidroxipatita y demás. En el caso donde se añade una etiqueta tal como His-tag al factor, el factor puede ser purificado a través de cromatografía de afinidad basada en la afinidad por la etiqueta. Una solución que contiene el factor puede utilizarse después de haberse filtrado mediante un filtro. Por ejemplo, puede utilizarse como filtro un filtro de 0,22-µm.

En el caso de se produzca cada factor mediante el método de virus, preferiblemente se elimina el virus. El método de eliminación del virus no es especialmente limitado y puede emplearse una técnica convencional. Por ejemplo, el virus puede eliminarse mediante una membrana de filtrado de fibra hueca que tiene un tamaño de poro de 500 kDa.

Como se describe en la presente memoria, el Factor C descrito en la presente memoria, el Factor B descrito en la presente memoria y la enzima procoagulante descrita en la presente memoria pueden expresarse separadamente en células de expresión establecidas individualmente.

El agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria puede contener, por ejemplo, solo el Factor C descrito en la presente memoria. Como alternativa, el agente puede contener, por ejemplo, solo el Factor C descrito en la presente memoria, el Factor B descrito en la presente memoria y la enzima procoagulante descrita en la presente memoria.

El agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria puede contener adicionalmente un sustrato para detectar el progreso de la reacción en cascada. Como se emplea en esta memoria, se puede aludir a tal sustrato como un sustrato de detección.

Entre los ejemplos de sustrato de detección se incluye el coagulígeno. El coagulígeno es un sustrato de detección con respecto a la enzima de coagulación, que es el producto final de la reacción en cascada. Cuando el coagulígeno entra en contacto con la enzima de coagulación, se forma la coagulina, un producto coagulado. Se puede determinar el progreso de la reacción de coagulación midiendo la turbidez de la mezcla de la reacción. Se puede recuperar coagulígeno de un extracto de hematocito de un cangrejo herradura (es decir, lisado). Dado que se ha determinado la secuencia de nucleótidos de un gen que codifica coagulígeno (Miyata *et al*, Protein Nucleic acid Enzyme, extra issue, n.º 29; p. 30-43; 1986), se puede producir también coagulígeno genéticamente de acuerdo con una técnica convencional.

El sustrato de detección puede ser un sustrato sintético. El sustrato sintético no es especialmente limitado, siempre que tenga una propiedad adecuada para la detección de la reacción en cascada. Entre los ejemplos de "propiedad adecuada para la detección de la reacción en cascada" se incluyen una propiedad para detectar la presencia de enzima de coagulación y una propiedad para detectar una etapa intermedia de la reacción en cascada. Entre los ejemplos de la "propiedad para detectar la presencia de enzima de coagulación" se incluyen una propiedad de colorear por reacción catalítica con la enzima de coagulación y una propiedad de generar fluorescencia por reacción catalítica con la enzima de coagulación. Entre los ejemplos de la "propiedad para detectar una etapa intermedia de la reacción

en cascada" se incluyen una propiedad de colorear por reacción catalítica de un intermediario de reacción en cascada tal como un Factor C activado y una propiedad de generar fluorescencia por reacción catalítica de un intermediario de reacción en cascada tal como es un Factor C activado. Entre los ejemplos de sustrato sintético se incluye un sustrato representado por la fórmula X-Y-Z (en donde X representa un grupo de protección, Y representa un péptido y Z representa un colorante unido a Y a través de un enlace amida). Cuando hay endotoxina en el sistema de reacción, se escinde un enlace amida Y-Z por la reacción catalítica de la enzima de coagulación o un intermediario, que se produce en la reacción en cascada, para liberar el colorante Z, por lo cual se genera coloración o fluorescencia. El grupo de protección X no es especialmente limitado y puede utilizarse adecuadamente un grupo de protección para péptido conocido. Entre los ejemplos de un grupo de protección se incluyen un grupo t-butoxicarbonil y un grupo benzoilo. El colorante Z no es especialmente limitado y puede ser un colorante detectable bajo luz visible o puede ser un colorante fluorescente. Entre los ejemplos de colorante Z se incluyen p-nitroanilina (pNA), 7-metoxicumarina-4-ácido acético (MCA), 2,4-dinitroanilina (DNP) y colorantes de dansilo. Entre los ejemplos de péptido Y se incluyen Leu-Gly-Arg (LGR), Ile-Glu-Gly-Arg (IEGR) (SEQ ID NO: 10), Val-Pro-Arg (VPR) y Asp-Pro-Arg (DPR). Puede seleccionarse apropiadamente un sustrato sintético que reacciona con la enzima de coagulación o el intermediario como el sustrato sintético según la modalidad de ensayo de endotoxina. Por ejemplo, desde el punto de vista de especificidad de sustrato, un sustrato que comprende LGR como péptido Y puede utilizarse adecuadamente para detectar la enzima de coagulación y un sustrato que comprende VPR o DPR como péptido Y puede ser utilizado adecuadamente para detectar Factor C activado. El colorante Z liberado puede determinarse mediante una técnica según la propiedad del colorante diana.

El agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria puede adicionalmente contener un componente adicional aparte de los factores relevantes y un sustrato de detección, siempre que el agente de ensayo pueda emplearse para ensayo de endotoxina. El componente adicional no es especialmente limitado y puede seleccionarse considerando la estabilidad durante el almacenamiento, facilidad de manejo, estabilidad de los factores y sustrato de detección y demás.

El agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria puede formularse en cualquier preparación como un sólido, líquido o gel. En el proceso de formulación, pueden utilizarse aditivos como un excipiente, un aglutinante, un disgregante, un lubricante, un corrector de sabor, un diluyente y un solvente, los cuales se utilizan, generalmente, en formulación. El agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria puede utilizarse como es para ensayo de endotoxina. Como alternativa, el agente de ensayo puede utilizarse para ensayo de endotoxina después de diluirlo con o dispersado o disuelto en agua, suero fisiológico, tampón, etc. Obviamente, el agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria también incluye tal forma del agente diluida, dispersada, disuelta o proceso similar.

En el agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria, los factores y otros componentes pueden estar presentes como una mezcla o presentes por separado. Por ejemplo, los factores pueden mezclarse en cualquier proporción en la formulación o pueden formularse factores individuales separadamente.

Las concentraciones de los factores y otros componentes contenidos en el agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria no son especialmente limitados. Sin embargo, preferiblemente cada concentración se ajusta para caer dentro del intervalo de concentraciones adecuadas para ensayar endotoxina mencionadas más adelante. La concentración de cada factor en el agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria (como una solución preparada antes del contacto con un espécimen de prueba) puede ser, por ejemplo, 5 a 200 µg/ml y preferiblemente es 20 a 100 µg/ml, más preferiblemente 40 a 80 µg/ml, en particular preferiblemente 60 µg/ml aproximadamente. Asimismo, la concentración de cada factor en el agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria puede ajustarse según el método de producción del factor. Cuando se produce Factor C con una célula de roedor como una huésped, la concentración de Factor C en el agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria (como una solución preparada antes del contacto con un espécimen de prueba) puede ser también, por ejemplo, 5 a 200 µg/ml, 10 a 50 µg/ml, o 15 a 40 µg/ml. Cuando se produce Factor C con una célula de primate como una huésped, la concentración de Factor C en el agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria (como una solución preparada antes del contacto con un espécimen de prueba) puede ser también, por ejemplo, 5 a 200 µg/ml, 50 a 150 µg/ml, u 80 a 120 µg/ml. Las concentraciones anteriormente ejemplificadas pueden calcularse, por ejemplo, asumiendo que toda la especie proteica presente en el filtrado de un sobrenadante de cultivo que se ha obtenido mediante expresión de un factor de interés a través de la técnica anteriormente ejemplificada consiste en el factor de interés.

El agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria puede proporcionarse como un kit de ensayo de endotoxina. El kit de ensayo de endotoxina no es especialmente limitado, siempre que el kit comprenda el agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria. El kit de ensayo de endotoxina puede comprender adicionalmente, por ejemplo, uno o más elementos seleccionados de una endotoxina estándar, un envase de reacción (p. ej. un tubo o una microplaca), una instrucción y similares.

(4) Método de ensayo de endotoxina

Cuando un espécimen de prueba contiene endotoxina, la reacción en cascada transcurre mezclando el agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria con el espécimen de prueba. A través de la medición del

progreso de la reacción en cascada, puede medirse la endotoxina que contiene el espécimen de prueba. Es decir, se describe en la presente memoria un método para medir endotoxina en un espécimen de prueba, el método que comprende un paso de mezcla del agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria y el espécimen de prueba y un paso de medición del progreso de una reacción en cascada.

- 5 En una realización del método de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria (al que se puede aludir, en adelante, como la "primera realización"), todos los factores se mezclan con el espécimen de prueba. En la primera realización, los factores que contenían el agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria podían estar contenidos en el sistema de reacción desde el comienzo del paso de mezcla del agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria con el espécimen de prueba o podían añadirse sucesivamente en el sistema de
10 reacción.

Por ejemplo, el paso de mezclar el agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria con el espécimen de prueba puede comprender los siguientes pasos (A) a (C):

- (A) un paso de adición del Factor C descrito en la presente memoria al sistema de reacción;
- (B) un paso de adición del Factor B descrito en la presente memoria al sistema de reacción; y
- 15 (C) un paso de adición de la enzima procoagulante al sistema de reacción.

Los pasos (A) a (C) pueden realizarse separadamente, parcialmente de forma simultánea o totalmente de forma simultánea. Los pasos (A) a (C) pueden realizarse en cualquier orden. Por ejemplo, el paso (B) puede realizarse después del paso (A) y el paso (C) puede realizarse después del paso (B).

- 20 En la primera realización, el progreso de la reacción en cascada puede medirse añadiendo un sustrato de detección al sistema de reacción y midiendo la respuesta (coloración, coagulación, etc.) del sustrato. El sustrato de detección puede estar presente en el sistema de reacción desde el principio del paso de mezcla del agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria con el espécimen de prueba o puede añadirse al sistema de reacción durante el progreso del paso o después de completar el paso. Obviamente, la primera realización también incluye un método de ensayo de endotoxina que emplea el agente de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria el
25 cual contiene un sustrato de detección de antemano.

- En el método de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria, siempre que la reacción en cascada transcurra cuando el espécimen de prueba contenga endotoxina, el Factor B y la enzima procoagulante descritos en la presente memoria en sí no necesitan estar en contacto con el espécimen de prueba. Es decir, otra realización del método de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria (al que se puede aludir, en adelante, como una
30 "segunda realización") es un método para medir endotoxina presente en un espécimen de prueba, el método que comprende los siguientes pasos (A) a (D):

- (A) un paso de mezcla del Factor C descrito en la presente memoria con el espécimen de prueba;
- (B) un paso de mezcla del Factor B descrito en la presente memoria con el Factor C después de mezclarse con el paso (A);
- 35 (C) un paso de mezcla de la enzima procoagulante descrito en la presente memoria con el Factor B después de mezclarse con el paso (B); y
- (D) un paso de medida del progreso de una reacción en cascada.

- 40 En la segunda realización, los pasos (A) a (D) pueden realizarse separadamente, parcialmente de forma simultánea o totalmente de forma simultánea. Por ejemplo, el paso A puede estar iniciado y entonces pueden añadirse el Factor B y la enzima procoagulante al sistema de reacción durante el progreso del paso A o después de finalizar el paso A. Asimismo, el paso B puede estar iniciado y entonces puede añadirse la enzima procoagulante al sistema de reacción durante el progreso del paso B o después de finalizar el paso B. Como alternativa, los tres factores pueden incorporarse al sistema de reacción desde el comienzo del paso A. Todavía de manera alternativa, se puede recuperar el Factor C después del contacto del paso A y usarse en el paso B o recuperar el Factor B después del contacto del
45 paso B y usarse en el paso C.

En la segunda realización, el progreso de la cascada puede medirse añadiendo un sustrato de detección al sistema de reacción y midiendo la respuesta (coloración, coagulación, etc.) del sustrato. El sustrato de detección puede estar presente en el sistema de reacción desde el principio del paso A o puede añadirse al sistema de reacción durante el progreso del paso o después de completar el paso.

- 50 Como alternativa, puede medirse endotoxina detectando una etapa intermedia de la reacción en cascada. Específicamente, puede medirse endotoxina detectando Factor C activado, que es un intermediario de la reacción en cascada. Es decir, todavía puede ser otra realización del método de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria (al que se puede aludir, en adelante, como una "tercera realización") un método para medir endotoxina presente en un espécimen de prueba, el método que comprende un paso de mezcla del Factor C descrito en la

presente memoria con el espécimen de prueba y un paso de detección del Factor C activado. En la tercera realización, el Factor C activado puede detectarse añadiendo un sustrato de detección al sistema de reacción y midiendo la respuesta (coloración, etc.) del sustrato. El sustrato de detección puede estar presente en el sistema de reacción desde el principio del paso de mezcla del Factor C descrito en la presente memoria con el espécimen de prueba o puede añadirse al sistema de reacción durante el progreso del paso o después de completar el paso.

El método de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria, siempre que la reacción en cascada transcurra cuando el espécimen de prueba contenga endotoxina, puede comprender adicionalmente cualquier otro paso arbitrario. Por ejemplo, el método de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria puede comprender un paso de adición de un sustrato de detección al sistema de reacción o un paso de mezcla de enzima de coagulación o un intermediario, que se produjo por la reacción en cascada, con el sustrato de detección. Asimismo, por ejemplo, el método de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria puede comprender un paso de cálculo del nivel de endotoxina del espécimen de prueba basándose en la reacción del sustrato de detección.

En el método de ensayo de endotoxina descrito en la presente memoria, la reacción se lleva a cabo preferiblemente en un medio acuoso tal como agua o un tampón.

En el método de ensayo descrito en la presente memoria, la concentración de cada factor en la mezcla de reacción no es especialmente limitada, siempre que la reacción en cascada transcurra cuando el espécimen de prueba contenga endotoxina. La concentración de cada factor puede ajustarse adecuadamente según las propiedades del factor y demás. Por ejemplo, la concentración de cada factor, como una concentración final, puede ser, por ejemplo, 2,5 a 100 µg/ml y preferiblemente es 10 a 50 µg/ml, más preferiblemente 20 a 40 µg/ml, en particular preferiblemente 30 µg/ml aproximadamente. Asimismo, la concentración de cada factor en la mezcla de reacción puede ajustarse según el método de producción del factor. Cuando se produce Factor C con una célula de roedor como una huésped, la concentración de Factor C en la mezcla de reacción, como una concentración final, puede ser también, por ejemplo, 2,5 a 100 µg/ml, 5 a 25 µg/ml, o 7,5 a 20 µg/ml. Cuando se produce Factor C con una célula de primate como una huésped, la concentración de Factor C en la mezcla de reacción, como una concentración final, puede ser también, por ejemplo, 2,5 a 100 µg/ml, 25 a 75 µg/ml, o 40 a 60 µg/ml. Las concentraciones anteriormente ejemplificadas pueden calcularse, por ejemplo, asumiendo que toda la especie proteica presente en el filtrado de un sobrenadante de cultivo que se ha obtenido mediante expresión de un factor de interés a través de la técnica anteriormente ejemplificada consiste en el factor de interés.

En el método de ensayo descrito en la presente memoria, la concentración del sustrato de reacción en la mezcla de reacción no es especialmente limitada, siempre que la reacción en cascada transcurra cuando el espécimen de prueba contenga endotoxina. La concentración del sustrato de reacción puede ajustarse adecuadamente según las propiedades del factor y demás. En el caso de que el sustrato de detección sea un sustrato sintético, la concentración del sustrato de detección es, por ejemplo, generalmente 0,001 mM a 100 mM, preferiblemente 0,01 mM a 10 mM, como una concentración final.

En cualquier realización, siempre que la reacción en cascada transcurra cuando el espécimen de prueba contenga endotoxina, el sistema de reacción puede contener adicionalmente cualquier otro componente arbitrario, además de los factores, el sustrato de detección y el espécimen de prueba.

El pH de la mezcla de reacción no es especialmente limitado, siempre que la reacción en cascada transcurra cuando el espécimen de prueba contenga endotoxina. El pH de la mezcla de reacción puede ajustarse adecuadamente según las propiedades de los factores. El pH de la mezcla de reacción es, por ejemplo, generalmente 5 a 10, preferiblemente 7 a 8,5.

La temperatura de reacción no es especialmente limitada, siempre que la reacción en cascada transcurra cuando el espécimen de prueba contenga endotoxina. La temperatura de reacción puede ajustarse adecuadamente según las propiedades de los factores. La temperatura de reacción es, por ejemplo, generalmente 10 °C a 80 °C, preferiblemente 20 °C a 50 °C. Por ejemplo, la temperatura de reacción puede ser 37 °C.

El tiempo de reacción no es especialmente limitado. El tiempo de reacción puede ajustarse adecuadamente según diferentes condiciones tales como las propiedades de los factores y temperatura de reacción. El tiempo de reacción es, por ejemplo, generalmente de 5 minutos a 2 horas, preferiblemente de 15 minutos a 90 minutos. El tiempo de reacción puede ser, por ejemplo, 30 minutos a 40 minutos.

En cualquier realización, el espécimen de prueba, los factores y otros componentes pueden añadirse por separado o en cualquier combinación al sistema de reacción durante el transcurso de la reacción. Estos componentes pueden añadirse una vez o una pluralidad de veces o de una forma continua. Las condiciones de reacción pueden ser constantes desde el comienzo hasta el final o pueden variar durante el transcurso de la reacción.

El progreso de la reacción en cascada atribuible a la presencia de endotoxina puede medirse midiendo la respuesta (coloración, coagulación, etc.) del sustrato de detección, en donde puede medirse endotoxina en el espécimen de prueba. La respuesta (coloración, coagulación, etc.) del sustrato de detección puede medirse mediante una técnica de acuerdo con la propiedad del sustrato de detección empleado.

En el caso de medir cuantitativamente endotoxina, los datos de correlación entre el nivel de endotoxina y el alcance de la respuesta (coloración, coagulación, etc.) del sustrato de detección se obtienen utilizando una muestra de endotoxina estándar de concentración conocida y entonces la cantidad de endotoxina presente en la muestra se puede determinar cuantitativamente basándose en los datos de correlación obtenidos. El dato de correlación es, por ejemplo, una curva de calibrado. La cuantificación puede llevarse a cabo mediante un método cinético o un método de punto final.

El espécimen de prueba que puede someterse al ensayo de endotoxina no es especialmente limitado. Entre los ejemplos de espécimen se incluyen el agua para uso médico, productos farmacéuticos, soluciones de infusión, productos sanguíneos, equipos médicos, instrumentos médicos, cosméticos, comidas y bebidas, muestras ambientales (p. ej. aire, agua de río y suelo), muestras biológicas (p. ej. sangre, fluidos corporales y tejido), proteínas nativas, proteínas recombinantes, ácidos nucleicos y sacáridos. El espécimen de prueba puede ser, por ejemplo, un inyectable. Un inyectable se refiere a un agente que puede ser administrado al cuerpo biológico a través de inyección. Tal inyectable no es necesariamente fluido durante la distribución comercial y puede ser un producto liofilizado. El espécimen de prueba en sí o un extracto o líquido de lavado del mismo se puede mezclar, dispersar o disolver en el sistema de reacción, para así someterse al ensayo de endotoxina.

Como se ha descrito anteriormente, el Factor C descrito en la presente memoria puede tener baja susceptibilidad a la inhibición de actividad por un ion. Por lo tanto, en una realización descrita en la presente memoria, se puede medir adecuadamente endotoxina presente en un espécimen de prueba que contiene un ion.

En otras palabras, el espécimen de prueba descrita en la presente memoria puede ser un espécimen de prueba que contenga un ion. La expresión "que contenga un ion" se refiere al estado en el que el espécimen de prueba contiene una sustancia que está presente en forma de un ion durante el ensayo de endotoxina. Es decir, "ion" en la presente memoria puede referirse a especies que están presentes intrínsecamente en una forma ionizada en el espécimen de prueba o pueden ser especies que están presentes intrínsecamente en una forma de sal en el espécimen de prueba pero que están ionizadas durante el ensayo de endotoxina. El tipo de iones no es especialmente limitado. Un ejemplo de ion es un catión y un ejemplo de catión es un ion metálico. Entre los ejemplos de ion metálico se incluyen un ion metálico alcalino y un ion metálico alcalinotérreo. Entre los ejemplos específicos del ion metálico alcalino y del ion metálico alcalinotérreo se incluyen ion de sodio, ion de potasio, ion de calcio e ion de magnesio. La cantidad de ion contenida en el espécimen de prueba puede ser tal cantidad que, por ejemplo, la concentración del catión derivada del espécimen de prueba se convierta en 1 mM o superior, 2 mM o superior, 5 mM o superior, 10 mM o superior, 20 mM o superior, 50 mM o superior, o 100 mM o superior, como una concentración final en el sistema de reacción después de mezclar el espécimen de prueba con el agente de ensayo de endotoxina. Entre los ejemplos de sal se incluyen cloruro sódico, sulfato de magnesio, hidrogenocarbonato de sodio, citrato sódico, cloruro cálcico, cloruro potásico, iotalamato sódico, edetato disódico de calcio y fosfato dihidrogenado de sodio. La cantidad de sal contenida en el espécimen de prueba puede ser tal cantidad que, por ejemplo, la concentración de sal derivada del espécimen de prueba se convierta en 1 mM o superior, 2 mM o superior, 5 mM o superior, 10 mM o superior, 20 mM o superior, 50 mM o superior, o 100 mM o superior, como una concentración final en el sistema de reacción después de mezclar el espécimen de prueba con el agente de ensayo de endotoxina. El espécimen de prueba puede contener un tipo de ion (o sal) o dos o más tipos de iones (o sales).

Ejemplos

La presente invención se describirá a continuación más concretamente por medio de ejemplos. Sin embargo, estos son ejemplos meramente de la presente invención y el alcance de la presente invención no se limita a estos.

1. Preparación de proteínas de Factor C

(1) Expresión de Factor C en células de insecto (Sf9)

En esta sección, se preparó Factor C utilizando una célula de insecto Sf9 como una huésped de la siguiente manera.

Un ADN que codifica Factor C de cangrejo herradura japonés, *Tachypleus tridentatus*, se implantó entre el sitio de reconocimiento *EcoRV* y el sitio de reconocimiento *MluI* de pIZ-V5 (producto de Life Technologies Corporation), que es un vector para expresión en células de insecto, para así construir un plásmido de expresión de Factor C. La secuencia de nucleótidos de ADN se muestra en la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de Factor C codificado por el ADN se muestra en la SEQ ID NO: 2 (lo mismo se aplica a lo largo del ejemplo).

El plásmido de expresión de Factor C se introdujo en células Sf9 cultivadas mediante transfección utilizando el reactivo Celfectin (producto de Life Technologies Corporation). Las células Sf9 estuvieron en cultivo estático a 28 °C en un medio libre de suero Sf900 III (producto de Life Technologies Corporation) que contenía 300 a 600 µg/ml de Zeocin (producto de Life Technologies Corporation), en donde se seleccionaron cepas Sf9 en las que el plásmido de expresión se había incorporado al genoma.

Se aislaron candidatos para Sf9 en los que el gen del Factor C se había expresado establemente a través de la técnica del cilindro de clonación y se clonó una pluralidad de líneas celulares de Sf9. Los clones así obtenidos se cultivaron individualmente, para obtener de este modo sobrenadantes de cultivo. Se confirmó la secreción de proteína de Factor C recombinante en cada sobrenadante de cultivo a través de transferencia de Western mediante el uso de un

anticuerpo antiFactor C (anticuerpo 2C12; Yoshiki Miura, *et al.*, J., Biochem. 112: 476-481 (1992)). Asimismo, se confirmó la actividad de Factor C (propiedad de activarse por endotoxina) en el sobrenadante de cultivo a través de la medición de actividad mediante el uso de un sustrato sintético Boc-LGR-pNA. En particular, el procedimiento de medición de actividad se describe en "4. Medición de actividad" más adelante (lo mismo se aplica a lo largo del ejemplo). Basados en los resultados del transferencia de Western y la medición de actividad, se seleccionó una línea celular Sf9 con elevada expresión de Factor C.

La línea celular Sf9 con elevada expresión de Factor C fue cultivada en suspensión (28 °C) en un medio Sf900 que contenía 1x penicilina/estreptomicina (producto de Life Technologies Corporation) y 50 µg/ml de Zeocin para una fase posterior de la fase de crecimiento logarítmico (6 a 8×10⁶ células/ml). Así, se centrifugó el cultivo (3.000×g, 30 minutos, 4 °C), para de este modo recuperar un sobrenadante de cultivo. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,22-µm y la fracción así recuperada (es decir, filtrada) se utilizó como un Factor C recombinante (Sf9).

(2) Expresión de Factor C en células de mamífero (CHO DG44)

En esta sección, el Factor C se preparó utilizando CHO DG44, que es una línea celular de ovario de hámster chino, como una huésped a través del siguiente procedimiento.

Un ADN que codifica Factor C de cangrejo herradura japonés, *Tachypleus tridentatus*, se implantó entre el sitio de reconocimiento *EcoRI* y el sitio de reconocimiento *Xba* de pCI-neo (producto de Promega), que es un vector para expresión en células de mamífero, para así construir un plásmido de expresión de Factor C. Se añadió una secuencia Kozak (GCCACC) justo antes del inicio del codón de iniciación del Factor C.

Se incorporaron el plásmido de expresión de Factor C y un plásmido de expresión de dhfr a células CHO DG44 cultivadas mediante transfección simultánea utilizando un reactivo de lipofección (Lipofectamine LTX) (producto de Life Technologies Corporation). Las células CHO DG44 estuvieron en cultivo estático a 37 °C en alimentación de 5% CO₂ en un medio RPMI 1640 (5 % suero dializado, que contiene 1x penicilina/estreptomicina) (producto de Sigma) adicionado con 1 mg/ml de Geneticin (producto de Life Technologies Corporation), en donde se seleccionaron cepas CHO DG44 en las que el plásmido de expresión se habían incorporado al genoma.

Quince días después de la transfección simultánea, se añadió MTX (metotrexato) (producto de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) al medio de cultivo. Se elevó la concentración de MTX escalonadamente de 50 nM a 5.000 nM durante tres meses y se seleccionaron líneas celulares CHO DG44 con elevada expresión de Factor C como policlones. La amplificación eficaz del gen del Factor C incorporado en virtud del MTX se confirmó por detección de Factor C en un sobrenadante de cultivo mediante transferencia de Western utilizando un anticuerpo 2C12 y cuantificando la cantidad de ARNm transcripcional de Factor C mediante PCR en tiempo real.

El grupo de líneas celulares CHO DG44 con elevada expresión de Factor C se diluyó por el medio para obtener una concentración celular de 0,5 células/pocillo y la dilución se inoculó en una placa de 96 pocillos. Desde aproximadamente 10 a 20 días después de la inoculación, las colonias de células formadas se sometieron sucesivamente a cultivos de expansión, en donde se clonaron líneas celulares de CHO DG44 con elevada expresión de Factor C. La cantidad de ARNm transcripcional de Factor C se confirmó mediante PCR en tiempo real. La cantidad de proteína de Factor C secretada al medio se confirmó mediante transferencia de Western utilizando un anticuerpo 2C12. Se confirmó la actividad de Factor C (propiedad de activarse por endotoxina) en el sobrenadante de cultivo a través de la medición de actividad utilizando un sustrato sintético Boc-LGR-pNA. Basándose en estos resultados, se seleccionó una línea celular de CHO DG44 con elevada expresión de Factor C monoclonal.

La línea celular de CHO DG44 con elevada expresión de Factor C (monoclonal) estaba condicionada en un medio completo sintético libre de suero que contenía 5 µM MTX y por consiguiente flotaba. La línea celular se cultivó a 37 °C en alimentación de 5 % CO₂ para una fase posterior de la fase de crecimiento logarítmico. El cultivo en flotación así obtenido se centrifugó (3.000×g, 30 minutos, 4 °C), para de este modo recuperar un sobrenadante de cultivo. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,22-µm y la fracción así recuperada (es decir, filtrada) se utilizó como un Factor C recombinante (CHO).

(3) Expresión de Factor C en células de mamífero (HEK293)

En esta sección, el Factor C se preparó utilizando HEK293, que es una línea celular de riñón humano embrionario, como una huésped a través del siguiente procedimiento.

Un ADN que codifica Factor C de cangrejo herradura japonés, *Tachypleus tridentatus*, se implantó entre el sitio de reconocimiento *EcoRI* y el sitio de reconocimiento *XhoI* de pCA7 (Makoto Takeda, *et al.*, J. Virol. 79 (22): 14346-54 (2005)), que es un vector para expresión en células de mamífero, para así construir un plásmido de expresión de Factor C. Se añadió una secuencia Kozak (GCCACC) justo antes del inicio del codón de iniciación del Factor C.

Se incorporó el plásmido de expresión de Factor C en células HEK293 cultivadas mediante transfección utilizando polietilenimina (producto Sigma) (Hashiguti *et al.*, Expression of Recombinant Protein Using Cultured Human Cells - Standard Protocol by 293-type cells-, PSSJ Archives, 1, e017 (2008), http://www.pssj.jp/archives/Protocol/Expression/293_01/293_01_01.html). Las células HEK293 estuvieron en cultivo

estático en un medio DMEM (que contenía 10 % suero bovino fetal y 2 mM L-glutamina) (producto de Sigma) a 37 °C en alimentación de 5 % CO₂ sin reemplazo del medio. Cuatro días después de la transfección, el caldo de cultivo se recuperó y se centrifugó (3.300×g, 30 minutos, 4 °C), para de este modo recuperar un sobrenadante de cultivo. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,22-µm y la fracción así recuperada (es decir, filtrado) se utilizó como Factor C recombinante (HEK).

(4) Preparación de Factor C nativo (derivado de amebocito de *Tachypleus tridentatus*)

Se recuperó una fracción que contenía Factor B y Factor C de un extracto de amebocito de cangrejo herradura japonés, *Tachypleus tridentatus*, mediante cromatografía en columna a través de resina de sulfato de dextrano (Takanori Nakamura, *et al.*, Eur. J. Biochem. 154: 511-521 (1986)). La fracción (5 ml) estuvo sujeta a filtrado de gel a través de una columna (φ 2.2 cm x 97 cm) rellena con gel de Sepharose CL6B (producto de GE Healthcare). El filtrado de gel se realizó bajo casi las mismas condiciones que las empleadas en una técnica conocida (Jeak Ling Ding y Bow Ho, US 5,712,144; Jeak L. Ding, *et al.*, Biochem. Biophys. Acta 1202: 149-156). El flujo se ajustó a 15 ml/h y a 50 mM de tampón Tris (pH 8.0) que contenía 154 mM NaCl, 1 mM EDTA y se empleó como solvente DMSO 5 %.

Las fracciones eluidas de filtrado de gel (3,7 ml/tubo, 150 tubos) se sometieron a SDS-PAGE seguidas de tinción CBB y transferencia de Western usando un anticuerpo 2C12 y medición de actividad usando un sustrato sintético Boc-LGR-pNA, en donde se identificaron las fracciones que contenían proteína de Factor C. Estas fracciones que contenían la proteína de Factor C purificada se emplearon como Factor C nativo (TAL).

2. Preparación de Factor B recombinante y enzima procoagulante recombinante

Se implantó un ADN que codifica Factor B de cangrejo herradura japonés, *Tachypleus tridentatus*, se implantó entre el sitio de reconocimiento *EcoRV* y el sitio de reconocimiento *MluI* de pIZ-V5 (producto de Life Technologies Corporation), que es un vector para expresión en células de insecto, para así construir un plásmido de expresión de Factor B. La secuencia de nucleótidos de ADN se muestra en la SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos de Factor B codificado por el ADN se muestra en la SEQ ID NO: 6. En particular, la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 es una secuencia de nucleótidos optimizada para expresión en células de insecto.

Se implantó un ADN que codifica la enzima procoagulante de cangrejo herradura japonés, *Tachypleus tridentatus*, se implantó entre el sitio de reconocimiento *EcoRV* y el sitio de reconocimiento +I de pIZ-V5 (producto de Life Technologies Corporation), que es un vector para expresión en células de insecto, para así construir un plásmido de expresión de enzima procoagulante. La secuencia de nucleótidos de ADN se muestra en la SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de enzima procoagulante codificada por el ADN se muestra en la SEQ ID NO: 8.

A través del mismo método que se empleó en el caso del Factor C, los plásmidos de expresión se incorporaron cada uno en células Sf9, se seleccionaron clones de elevada expresión y se prepararon sobrenadantes de cultivo de los mismos. Los sobrenadantes de cultivo se filtraron individualmente a través de un filtro de 0,22-µm y las fracciones obtenidas (es decir, filtrados) se emplearon como un Factor B recombinante y una enzima procoagulante recombinante. La recuperación de factores se confirmó a través de transferencia de Western empleando un anticuerpo específico para cada factor y medición de actividad.

3. Comparación de pesos moleculares de proteínas de Factor C (1)

Los pesos moleculares de los cuatro tipos de proteínas de Factor C preparados anteriormente se compararon entre sí a través de SDS-PAGE y transferencia de Western.

Primeramente, cada Factor C en una cantidad mostrada en la Fig. 2 fue sometido a SDS-PAGE en una condición no reductora empleando un gel de gradiente 5 a 20 %. En la Fig. 2, Sf9, CHO y HEK indican el Factor C expresado en células Sf9, células CHO DG44 y células HEK293, respectivamente y TAL se refiere al Factor C nativo (en adelante sucede lo mismo). En particular, el Factor C se escinde en una cadena H y una cadena L en condiciones reductoras. En el presente ejemplo, el SDS-PAGE se llevó a cabo bajo una condición no reductora con el fin de comparar los pesos moleculares del Factor C en un estado intacto.

Después de la SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF (producto de Bio RAD) por medio de un secante semi-seco. La membrana de PVDF se recuperó y bloqueó con 5 % de leche desnatada y se trató entonces de forma secuencial con un anticuerpo primario (anticuerpo 2C12) y un anticuerpo secundario (HRP etiquetado anticuerpo anti-ratón cabra) (producto de Dako). Se hizo que las bandas atribuidas a Factor C emitieran luz con un reactivo de detección, SuperSignal West Dura (producto de Thermo Scientific) y la emisión de luz se grabó con una cámara CCD.

Se halló que los cuatro tipos de Factor C tenían diferentes pesos moleculares y que el peso molecular mayor fue en el caso de CHO, seguido de TAL, HEK y Sf9 en orden descendiente (Fig. 2).

Con respecto al cangrejo herradura singapurensis, *Carcinoscorpius rotundicauda*, se ha señalado que toda la proteína de Factor C nativo purificada de un extracto de amebocito y las proteínas de Factor C recombinante producidas en células de insecto Sf9 y S2 y en una línea celular COS-1 de riñón de mono verde africano como célula huésped, tienen

el mismo peso molecular de 132 kDa (Jeak Ling Ding y Bow Ho, US 5,712,144 y Jeak L. Ding, *et al.*, Biochem. Biophys. Acta 1202: 149-156 (1993) (para proteína de Factor C nativo); Jing Wang, *et al.*, J., Biol. Chem. 277(39): 36363-72 (2002) (para Sf9 y S2); y Roopashree S. Dwarakanath, *et al.*, Biotechnology letters 19(4): 357-361 (1997) (para COS-1)).

Por lo tanto, entre los cuatro tipos de proteínas de Factor C preparados anteriormente, se midió correctamente el peso molecular de cada CHO y TAL. Primeramente, el Factor C recombinante (CHO) se purificó de un modo similar al empleado en el caso del Factor C nativo (TAL). Así, se realizó una electroforesis (gel 15 %) (producto de GE Healthcare) en las mismas condiciones que las empleadas en una técnica conocida (Jeak Ling Ding y Bow Ho, US 5,712,144; y Jeak L. Ding, *et al.*, Biochem. Biophys. Acta 1202: 149-156) y el peso molecular de cada Factor C se determinó entonces mediante el gráfico de Ferguson. Como resultado, se encontró Factor C recombinante (CHO) con un peso molecular de 126 kDa y Factor C nativo (TAL) con un peso molecular de 123 kDa (Fig. 3). Por lo tanto, se encontró Factor C nativo (TAL) y Factor C recombinante (CHO) derivado de cangrejo herradura japonés, *Tachypleus tridentatus*, con un peso molecular más pequeño que el del Factor C derivado del cangrejo herradura singapurense, *Carcinoscorpius rotundicauda* (132 kDa).

La diferencia en el peso molecular entre los cuatro tipos de Factor C preparados anteriormente puede concebirse como atribuible a la diferencia en la modificación post-traducciona (modificación de cadena de azúcar) que depende del tipo de células huéspedes empleado. Por ejemplo, se sabe que el ácido siálico está unido a la cadena de azúcar de tipo N después de la traducción en células de mamífero, en donde una proteína recombinante producida en células de mamífero tiene mayores dimensiones que aquellas de proteína recombinante producida en células de insecto (Robert L. Harrison y Donald L. Jarvis, Methods in Molecular Biology 338: 341-356 (2007)). Esto apoya los resultados del presente ejemplo (Fig. 2).

4. Medición de actividad

Cada uno de los cuatro tipos de Factor C preparados anteriormente se combinó con otros factores y se llevó a cabo la medición de actividad mediante el siguiente procedimiento. La Fig. 4 muestra el esquema de la medición de actividad.

Como se muestra en la Fig. 4, se mezclaron materiales comunes aparte del Factor C (un Factor B recombinante, una enzima procoagulante recombinante, un sustrato sintético Boc-LGR-pNA y un tampón Tris), para así preparar una mezcla líquida común. Para la mezcla líquida común, se añadió Factor C en una cantidad especificada en la Fig. 6 y el volumen total se ajustó a 50 µl. La mezcla así obtenida se mezcló con 50 µl de una muestra (agua que contenía endotoxina estándar de farmacopea de Estados Unidos de América (USP-RSE) (producto de Seikagaku Corporation)) y la mezcla resultante se calentó a 37 °C durante 30 minutos. En este sistema de ensayo, se activa Factor C por endotoxina, para formar así el Factor C activado; se activa Factor B por el Factor C activado, para formar así el Factor B activado; se activó enzima procoagulante por el Factor B activado, para así formar una enzima de coagulación correspondiente; y la enzima de coagulación escinde un sustrato sintético Boc-LGR-pNA, en donde se libera p-nitroanilina (Fig. 5). El cambio en absorbancia (A 405 nm) atribuido a la formación de p-nitroanilina se midió de una forma dependiente del tiempo y se calculó la tasa de cambio de la absorbancia por unidad de tiempo (mAbs/min) y se utilizó como actividad de Factor C. La medición se realizó tres veces para cada muestra.

En el sistema de ensayo anterior, la concentración final de cada factor fue como sigue: Factor B recombinante 30 µg/ml, enzima procoagulante recombinante 30 µg/ml, Factor C recombinante (Sf9) 11,3 µg/ml, Factor C recombinante (CHO) 12 µg/ml, Factor C recombinante (HER) 51.5 µg/ml y Factor C (TAL) 0,25 µg/ml. Las concentraciones del ejemplo anterior (excepto para el caso de TAL) se calcularon asumiendo que toda la especie proteica presente en la muestra (es decir, filtrado) preparada mediante expresión de un factor de interés consistió en el factor de interés. Se midió la concentración del Factor C (TAL) después de la purificación del Factor C (TAL).

Como resultado, se constituyeron con éxito sistemas reconstituidos presentando cada uno casi actividad equivalente para los cuatro tipos de Factor C (Fig. 6). En cada sistema reconstituido, la actividad se incrementó con un incremento de concentración de endotoxina (0,05 y 0,1 EU/ml) de un espécimen.

Se señaló que el Factor C recombinante derivado de *Carcinoscorpius rotundicauda* y producido en una célula de mamífero COS-1 (132 kDa) se recupera en una fracción insoluble (Roopashree S. Dwarakanath, *et al.*, Biotechnology letters 19(4): 357-361 (1997); y Jing Wang, Bow Ho y Jeak L. Ding, Biotechnology letters 23: 71-76 (2001)). Asimismo, se señala que el Factor C recombinante derivado de *Carcinoscorpius rotundicauda* y producido en célula de insecto S2 (132 kDa) no presenta actividad de proteasa en respuesta a endotoxina (Jing Wang, *et al.*, J., Biol. Chem. 277 (39): 36363-72 (2002)). Se piensa que la falta de actividad del último Factor C (producido en S2) es atribuible a la diferencia en la estructura de cadena de azúcar del Factor C nativo derivado de *Carcinoscorpius rotundicauda* y el Factor C recombinante producido en célula de insecto Sf9, debido a diferente reactividad a lectina.

Por otra parte, en el presente ejemplo, se encontró que el Factor C recombinante derivado de *Tachypleus tridentatus* (Sf9, CHO y HER) presentó una actividad dependiente de endotoxina, incluso a pesar de que el peso molecular del mismo difiere de aquel del Factor C nativo (TAL); es decir, incluso a pesar de que la estructura de la cadena de azúcar del mismo difiere de aquel del Factor C nativo (TAL).

5. Inhibición de actividad por inyección

La endotoxina es una sustancia inductora de una fuerte reacción inmune. Por lo tanto, cuando un inyectable contaminado con endotoxina se administra en el cuerpo, se produce un efecto adverso grave. Por lo tanto, en la producción de inyectables, es obligatoria la detección de endotoxina por medio de un reactivo de lisado de amebocito de limulus por la farmacopea del país correspondiente, para confirmar así la no contaminación por endotoxina.

Por lo tanto, se compararon los cuatro tipos de Factor C preparados anteriormente en términos de reactividad a endotoxina en varios inyectables.

Como espécimen control, se usó agua de inyección que contenía endotoxina (concentración de endotoxina: 0,05 EU/ml). Los especímenes de medición utilizados fueron como sigue: dilución 4 veces del inyectable de cloruro sódico 10 p/v% (inyectable de cloruro sódico 10 %, producto de Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.); dilución 16 veces del inyectable de sulfato de magnesio 0,5 M (inyectable corrector sulfato de magnesio 1 mEq/ml, producto de Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd.); solución sin diluir de suero fisiológico (solución isotónica de cloruro sódico Otsuka, producto de Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.); dilución 8 veces del inyectable de hidrogenocarbonato de sodio 7 p/v% (inyectable Meylon 7 %, producto de Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.); dilución 8 veces del inyectable de citrato sódico 10 p/v% (inyectable de citrato sódico para transfusión, producto de Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd.); dilución 100 veces del inyectable de cloruro cálcico 0,5 M (inyectable corrector de cloruro cálcico 1 mEq/ml, producto de Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.); solución sin diluir de solución de Ringer (solución de Ringer "Fuso", producto de Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd.); y dilución 16 veces del inyectable de iotalamato sódico (inyectable Conray 400, producto de Daichi Sankyo Co., Ltd.), cada uno enriquecido con endotoxina (concentración de endotoxina: 0,05 EU/ml). Cuando el espécimen de medición fue 8 veces la dilución del inyectable de citrato sódico 10 w/v%, la concentración final de citrato sódico fue aproximadamente 21 mM. Cuando el espécimen de medición fue 8 veces la dilución del inyectable de hidrogenocarbonato de sodio 7 w/v%, la concentración final de hidrogenocarbonato de sodio fue aproximadamente 52 mM. Cuando el espécimen de medición fue 4 veces la dilución del inyectable de cloruro sódico 10 w/v%, la concentración final de cloruro sódico fue aproximadamente 214 mM. Cuando el espécimen de medición fue suero fisiológico sin diluir, la concentración final de cloruro sódico fue aproximadamente 77 mM. Cuando el espécimen de medición fue 16 veces la dilución del inyectable de sulfato de magnesio 0,5 M, la concentración final de sulfato de magnesio fue aproximadamente 16 mM. Cuando el espécimen de medición fue 100 veces la dilución del inyectable de cloruro cálcico 0,5 M, la concentración final de cloruro sódico fue aproximadamente 2,5 mM. Se midió la actividad de Factor C mediante el procedimiento mostrado en la Fig. 4. Se definió una actividad residual como una reactividad relativa (%) para endotoxina en un espécimen inyectable, con respecto a la reactividad para endotoxina en la correspondiente muestra control como 100 %. La medición se llevó a cabo cuatro veces para cada espécimen inyectable.

La Fig. 7 muestra los resultados. Cuando una inyección típica se empleó como un espécimen de medición, se inhibió la reacción con endotoxina, en comparación con el caso en el que se usó una inyección de agua. El grado de inhibición varió de acuerdo con el tipo de inyección y el tipo de hospedador para expresar Factor C. El Factor C recombinante (CHO) y el Factor C recombinante (HEK) mostraron una tendencia a tener baja susceptibilidad a la inhibición de la reacción para todos los inyectables probados, en comparación con el Factor C nativo (TAL). En particular, el Factor C recombinante (CHO) presentó la actividad residual más elevada en muchos casos. Por el contrario, el Factor C recombinante (Sf9) fue más susceptible a la inhibición de la reacción en muchos inyectables (7 inyectables, excepto la muestra nº. 6).

Los resultados de las pruebas indican que el Factor C expresado en células de mamífero pueden tener baja susceptibilidad a la inhibición de actividad por iones. Tal propiedad es particularmente ventajosa para detectar contaminación de endotoxina en la producción de inyectables.

6. Se sabe que la preparación de proteína de Factor C de anticuerpo A de proteína de Factor C específico de cadena L está presente como una cadena simple (cadena completa) en condiciones no reductoras y que se escinde en dos cadenas (cadena H y cadena L) en condiciones reductoras. Se ha señalado que el anticuerpo antiFactor C monoclonal (anticuerpo 2C12) reconoce la cadena completa y la cadena H (Yoshiki Miura, *et al.*, J. Biochem. 112: 476-481(1992)). Por lo tanto, se produjo un antígeno de péptido presente en la cadena L. Se inmunizó un conejo con el antígeno de péptido a través de un método convencional, en donde se produjo un anticuerpo policlonal que pudiera reconocer la cadena L y la cadena completa (anticuerpo FCL) (Fig. 10).

7. Purificación de proteínas de Factor C recombinantes

De acuerdo con el método empleado en "(4) Preparación de Factor C nativo (derivado de *Tachypleus tridentatus*)" de "1. Preparación de proteínas de Factor C", se purificaron tres tipos de proteínas de Factor C recombinante desde sobrenadantes de cultivo de células de mamífero (CHO DG44 y HEK293) y células de insecto (Sf9). En resumen, se sometió cada sobrenadante (100 a 300 ml) a cromatografía en columna a través de resina de sulfato de dextrano y se aislaron las fracciones eluidas que contenían el Factor C recombinante correspondiente mediante filtración en gel. Se confirmó la purificación de las proteínas de Factor C recombinante a través de SDS-PAGE y tinción CBB, transferencia de Western empleando el anticuerpo 2C12 y medición de actividad.

8. Comparación de pesos moleculares de proteínas de Factor C (2)

Se compararon de nuevo los pesos moleculares de los cuatro tipos de proteínas de Factor C entre sí a través de SDS-PAGE y transferencia de Western.

Los cuatro tipos de proteínas de Factor C purificadas, derivadas de un cangrejo herradura nativo (TAL), un sobrenadante de cultivo de CHO DG44 (CHO), un sobrenadante de cultivo de HEK293 (HEK) y un sobrenadante de cultivo de Sf9 (Sf9) se aplicaron a un solo gel (gel 15 %) para SDS-PAGE y se sometieron a tinción CBB (Fig. 11). Cada una de los cuatro tipos de proteínas de Factor C purificadas se presentó como una cadena sencilla (cadena completa) en condiciones no reductoras y se escindió en dos cadenas (cadena H y cadena L) en condiciones reductoras. Después de la transferencia a la membrana PVDF, se realizó un transferencia de Western utilizando el anticuerpo 2C12 y el anticuerpo FCL (Fig. 12). En relación con los sitios de reconocimiento de anticuerpo (Fig. 10), el anticuerpo 2C12 específicamente reconoció la cadena completa y la cadena H y el anticuerpo FCL específicamente reconoció la cadena completa y la cadena L. Las bandas de la tinción CBB mostradas en la Fig. 11 se identificaron como bandas derivadas de Factor C. Respecto al peso molecular de Factor C, CHO tuvo el peso molecular más grande; TAL y HEK tuvieron casi el mismo peso molecular; y Sf9 tuvo el peso molecular más pequeño, en todos los casos de la cadena completa en condiciones no reductoras y de las cadenas H y L en condiciones reductoras.

Para comparar con más precisión los pesos moleculares de los cuatro tipos de Factor C purificados, se realizó una electroforesis (gel 15 %, marcador LMW (producto de GE Healthcare)) en las mismas condiciones que las empleadas en una técnica conocida (Jeak Ling Ding y Bow Ho, US 5,712,144; y Jeak L. Ding, *et al.*, Biochem. Biophys. Acta 1202: 149-156), seguido de tinción CBB y los pesos moleculares fueron entonces determinados mediante el gráfico de Ferguson.

La tabla 1 muestra los resultados. En condiciones no reductoras, TAL tuvo un peso molecular de 124 kDa, que es casi análogo a los 123 kDa señalado por la referencia. El peso molecular de CHO fue más elevado, 128 kDa y el de HEK fue 124 kDa, que es análogo al de TAL. El peso molecular de Sf9 109 kDa, que es más pequeño que el de TAL. Como resultado, cuando el Factor C recombinante se expresó en células de insecto (Sf9), se encontró que el peso molecular del mismo era más pequeño que el del Factor C nativo (TAL), si bien el Factor C recombinante se expresó en células de mamífero (CHO, HEK), el peso molecular del mismo se encontró que era análogo o mayor que el del Factor C nativo (TAL). Esta tendencia fue también confirmada en el caso de la cadena H o de la cadena L en condiciones reductoras.

El peso molecular del Factor C nativo derivado de *Carcinoscorpius rotundicauda* (cangrejo herradura singapurensis) y del Factor C recombinante obtenido del mismo a través de expresión genética en células de insecto se ha señalado que tiene el mismo valor, 132 kDa, en condiciones no reductoras. Los cuatro tipos de Factor C purificado derivado de *Tachypleus tridentatus* (cangrejo herradura japonés) y obtenidos en el presente ejemplo presente tuvieron un peso molecular inferior a 132 kDa (Tabla 1).

[Tabla 1]

Especie de cangrejo herradura	Fuente	Peso molecular			Referencia
		Completa	H	L	
<i>Tachypleus tridentatus</i>	Lisado natural	124	85	42	Ejemplo presente
<i>Tachypleus tridentatus</i>	CHO DG44	128	88	43	Ejemplo presente
<i>Tachypleus tridentatus</i>	HEK293	124	85	42	Ejemplo presente
<i>Tachypleus tridentatus</i>	Sf9	109	75	39	Ejemplo presente
<i>Tachypleus tridentatus</i>	Lisado natural	123	80	43	Takanori Nakamura, <i>et al.</i> , Eur. J., Biochem. 154: 511-521 (1986)
<i>Carcinoscorpius rotundicauda</i>	Lisado natural	132	80	52	Jeak L. Ding, <i>et al.</i> , Biochem. Biophys. Acta 1202: 149-156 (1993)
<i>Carcinoscorpius rotundicauda</i>	Sf9 (+baculo virus)	132	Sin datos	Sin datos	Jing Wang, <i>et al.</i> , J., Biol. Chem. 277 (39): 36363-72 (2002)
<i>Carcinoscorpius rotundicauda</i>	S2	132	Sin datos	Sin datos	Jing Wang, <i>et al.</i> , J., Biol. Chem. 277 (39): 36363-72 (2002)

9. Confirmación de la modificación de la cadena de azúcar de tipo N

Los genes empleados en el presente ejemplo para expresar el Factor C recombinante fueron secuencias todas derivadas de *Tachypleus tridentatus* y los plásmidos de expresión se diseñaron de modo que no se añadió ninguna etiqueta a ningún extremo de ninguna secuencia. Por lo tanto, se piensa que las secuencias traducidas de aminoácidos de los cuatro tipos de Factor C obtenidos en el presente ejemplo son la misma. Además, se determinaron las secuencias parciales de los restos de aminoácido N-terminal del Factor C recombinante (HEK, Sf9). Estas secuencias de aminoácidos son idénticas a la secuencia del Factor C nativo de *Tachypleus tridentatus*, señalada por la referencia (datos no mostrados).

En general, se piensa que el peso molecular de una proteína varía considerablemente por modificación postraduccional. Además, se ha señalado también que la estructura de una cadena de azúcar de tipo N añadida a la proteína a través de modificación postraduccional difiere entre el caso de células de insecto y el caso de células de mamífero. Por lo tanto, para confirmar si la diferencia anteriormente observada en el peso molecular entre las proteínas de Factor C purificadas es atribuible a la diferencia en la estructura de la cadena de azúcar de tipo N, se trató cada una de las proteínas de Factor C con glicopeptidasa F. Se conoce que esta enzima escinde y elimina una cadena de azúcar de tipo N añadida a la proteína. Por lo tanto, cuando las proteínas de Factor C purificadas tienen el mismo peso molecular después del tratamiento con la enzima, es concebible que la cadena de azúcar de tipo N induce la diferencia en peso molecular entre las proteínas de Factor C.

De acuerdo con una instrucción adjunta, se trató cada proteína de Factor C purificada (1 µg) con 1 mU de glicopeptidasa F (producto de Takara) en condiciones de modificación en presencia de SDS y un agente reductor. Las muestras así tratadas se separaron a través de SDS-PAGE y se analizaron después mediante transferencia de Western. La Fig. 13 muestra los resultados. En todos los casos de los cuatro tipos de Factor C, el peso molecular de la cadena H decreció por el tratamiento de glicopeptidasa y se convirtió en el mismo valor. Por el contrario, aunque el peso molecular de la cadena L decreció después del tratamiento de glicopeptidasa en todos los casos de los cuatro tipos de Factor C, el peso molecular se convirtió en el mismo valor solo en los casos de CHO, HEK y TAL. Específicamente, entre cuatro tipos de cadena L, se encontró que la cadena L del Factor C derivada de Sf9 tenía un peso molecular mayor que el de los otros tres casos, después del tratamiento de glicopeptidasa. Por lo tanto, en la cadena L del Factor C derivado de Sf9, es concebible que ocurra una cierta modificación aparte de la modificación de la cadena de azúcar de tipo N, después de la traducción.

Por lo tanto, el análisis mencionado anteriormente indica que la diferencia en la modalidad de cadena de azúcar de tipo N después de la traducción juega un papel principal en proporcionar la diferencia en peso molecular del Factor C.

10. Análisis de la cadena de azúcar de tipo N de Factor C

En la modificación de la cadena de azúcar de tipo N de una proteína en células de mamífero, se añaden moléculas de azúcar escalonadamente a un residuo de asparagina de la proteína y finalmente, se forma una cadena de azúcar que contiene un ácido siálico terminal (es decir, tipo complejo). Por el contrario, en células de insecto, generalmente no se añade ácido siálico y se forma una cadena de azúcar que tiene una manosa terminal (es decir, tipo paucimanosa) (Robert L. Harrison y Donald L. Jarvis, *Methods in Molecular Biology* 338: 341-356 (2007)). Para confirmar la diferencia en la estructura de cadena de azúcar de tipo N entre los cuatro tipos de proteínas de Factor C purificadas, se realizó una transferencia de lectinas utilizando varias lectinas como lectinas de especificidad por ácido siálico terminal (p. ej. aglutinina de *Maackia amurensis* (MAM) y aglutinina de *Sambucus sieboldiana* (SSA)).

De dispusieron para dot blot en una membrana de nitrocelulosa una serie de diluciones de muestras (100, 25 y 6 ng) de cada uno de los cuatro tipos de Factor C purificado y una proteína de fetuina de bovino como control positivo y la membrana se bloqueó con BSA 3 %. Así, la membrana reaccionó secuencialmente con lectina etiquetada con biotina (producto de J-Oil Mills, Inc.) y HRP etiquetado con estreptavidina (producto de Thermo Scientific). Se eliminó la emisión de luz atribuida a la descomposición del sustrato HRP (producto de Thermo Scientific). En lugar de lectina, se utilizó un anticuerpo 2C12 antiFactor C como control, para de este modo confirmar que se transfirieron la mismas cantidades de los cuatro tipos de Factor C.

La Fig. 14(a) muestra los resultados de la transferencia de lectinas y la Fig. 14(b) muestra la especificidad de unión de las lectinas empleadas. Se adhirió aglutinina de *Lens culinaris* (LCA) (lectina de especificidad por fucosa) y aglutinina de *Canavalia ensiformis* (Con A) (tipo biantena, tipo manosa elevada y lectina tipo complejo de especificidad por cadena de azúcar) a todas las muestras; es decir, cuatro tipos de Factor C y fetuina. Por el contrario, MAM (lectina de especificidad por ácido siálico terminal unido (α -2,3)) se adhirió fuertemente a CHO y menos fuertemente a HEK. Tienen casi la misma reactividad débil TAL y fetuina, pero no reaccionaron con Sf9. SSA (lectina de especificidad por ácido siálico terminal unido (α -2,6)) reaccionó con HEK, TAL y fetuina, pero no reaccionó con CHO y Sf9.

El análisis anterior indica que la cadena de azúcar de tipo N de Factor C recombinante expresado en células de mamífero (CHO y HEK) contiene ácido siálico terminal unido (α -2,3) y que la cadena de azúcar de tipo N de Factor C recombinante expresado en células de insecto (Sf9) no contiene un ácido siálico terminal unido (α -2,3). La Fig. 14(c) muestra representaciones esquemáticas de la cadena de azúcar de tipo N de un Factor C recombinante, estimadas por los resultados de los experimentos anteriores y señalado por la referencia. Los resultados de los experimentos

anteriores sostienen que la diferencia en la modalidad de modificación postraducciona de cadena de azúcar de tipo N es atribuible principalmente a la diferencia en peso molecular del Factor C.

Según la presente invención, puede producirse un Factor C de cangrejo herradura recombinante de manera eficiente. En una realización de la presente invención, puede medirse endotoxina presente en un espécimen de prueba que contenga un ion, mientras se reduce la inhibición de reacción.

5

Lista de secuencias

SEQ ID NO: 1: Secuencia de ADN del gen de Factor C de cangrejo herradura japonés

SEQ ID NO: 2: Secuencia de aminoácidos del Factor C de cangrejo herradura japonés

SEQ ID NO: 3: Secuencia de ADN del gen de Factor C de cangrejo herradura (singapurense) del sudeste asiático

10 SEQ ID NO: 4: Secuencia de aminoácidos del Factor C de cangrejo herradura (singapurense) del sudeste asiático

SEQ ID NO: 5: Secuencia de ADN del gen de Factor B de cangrejo herradura japonés

SEQ ID NO: 6: Secuencia de aminoácidos del Factor B de cangrejo herradura japonés

SEQ ID NO: 7: Secuencia de ADN del gen de la enzima procoagulante de cangrejo herradura japonés

SEQ ID NO: 8: Secuencia de aminoácidos de la enzima procoagulante de cangrejo herradura japonés

15 SEQ ID NO: 9: Secuencia de ADN del gen de Factor B de cangrejo herradura japonés, conteniendo el gen un codón optimizado para expresión en células de insecto

SEQ ID NO: 10: Secuencia peptídica

Listado de secuencias

<110> SEIKAGAKU CORPORATION

20 <120> Nuevo Factor C recombinante y método para producir el mismo, y método para medir endotoxina

<130> S13987EU - py

<150> EP13862466.3

<151> 10.12.2013

<150> JP2012-269840

25 <151> 10.12.2012

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3060

30 <212> ADN

<213> Tachypleus tridentatus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3060)

35 <400> 1

ES 2 784 510 T3

atg gtc tta gcg tcg 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
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	
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 Leu Glu Ala Lys Asp Ile Cys Pro Lys	
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
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	
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	
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	
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 ggg	624

ES 2 784 510 T3

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					
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	
			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
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	
		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	
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	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	
			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
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					400	
ttt	ctg	ggt	agt	gac	ctg	aat	ggg	ata	aaa	tcg	gaa	gag	ttg	aag	tct	1248
Phe	Leu	Gly	Ser	Asp	Leu	Asn	Gly	Ile	Lys	Ser	Glu	Glu	Leu	Lys	Ser	
				405					410					415		
ctt	gcc	cgc	agt	ttt	cga	ttt	gat	tat	gtc	agt	tca	tcc	aca	gca	ggt	1296
Leu	Ala	Arg	Ser	Phe	Arg	Phe	Asp	Tyr	Val	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Gly	
			420					425					430			
aga	tca	gga	tgt	cct	gat	gga	tgg	ttt	gag	gta	gaa	gag	aac	tgt	gtg	1344
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
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	
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		
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	
		515					520					525				
tct	ggc	gaa	cct	gga	aat	gaa	act	aac	tgt	gta	tat	ctg	gac	atc	cga	1632

ES 2 784 510 T3

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
Asp	Gln	Leu	Gln	Pro	Val	Trp	Lys	Thr	Lys	Ser	Cys	Phe	Gln	Pro	Ser	
545					550					555					560	
agc	ttt	gct	tgc	atg	atg	gat	ttg	tca	gac	aga	aat	aaa	gcc	aaa	tgc	1728
Ser	Phe	Ala	Cys	Met	Met	Asp	Leu	Ser	Asp	Arg	Asn	Lys	Ala	Lys	Cys	
				565					570					575		
gat	gac	cct	gga	cca	ctg	gaa	aat	gga	cac	gcc	aca	ctt	cat	gga	caa	1776
Asp	Asp	Pro	Gly	Pro	Leu	Glu	Asn	Gly	His	Ala	Thr	Leu	His	Gly	Gln	
			580					585					590			
agt	att	gat	ggg	ttc	tat	gct	ggt	tct	tct	ata	agg	tac	agc	tgt	gag	1824
Ser	Ile	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Gly	Ser	Ser	Ile	Arg	Tyr	Ser	Cys	Glu	
		595				600				605						
gtt	ctc	cac	tac	ctc	agt	gga	act	gag	acc	gta	act	tgt	aca	aca	aat	1872
Val	Leu	His	Tyr	Leu	Ser	Gly	Thr	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Thr	Thr	Asn	
		610				615				620						
ggc	aca	tgg	agt	gct	cct	aaa	cct	cga	tgt	atc	aaa	gtc	atc	acc	tgc	1920
Gly	Thr	Trp	Ser	Ala	Pro	Lys	Pro	Arg	Cys	Ile	Lys	Val	Ile	Thr	Cys	
625					630					635					640	
caa	aac	cct	cct	gta	cca	tca	tat	ggt	tct	gtg	gaa	atc	aaa	ccc	cca	1968
Gln	Asn	Pro	Pro	Val	Pro	Ser	Tyr	Gly	Ser	Val	Glu	Ile	Lys	Pro	Pro	
				645					650					655		
agt	cgg	aca	aac	tgc	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			
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	
		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	tcg	aga	tac	tac	gaa	cta	ctt	gga	tct	caa	ggc	aga	aga	tgt	gac	2208
Glu	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Glu	Leu	Leu	Gly	Ser	Gln	Gly	Arg	Arg	Cys	Asp	
			725					730						735		
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			
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	
		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
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	
			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				
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

ES 2 784 510 T3

```

Asp Ile Ala Leu Ile Gln Leu Lys Thr Pro Val Thr Leu Thr Thr Arg
865          870          875          880
gtc caa cca atc tgt ctg cct act gac atc aca aca aga gaa cac ttg 2688
Val Gln Pro Ile Cys Leu Pro Thr Asp Ile Thr Thr Arg Glu His Leu
          885          890          895
aag gag gga aca tta gca gtg gtg aca ggt tgg ggt ttg aat gaa aac 2736
Lys Glu Gly Thr Leu Ala Val Val Thr Gly Trp Gly Leu Asn Glu Asn
          900          905          910
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
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
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
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
          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

```

<210> 2

<211> 1019

<212> PRT

5 <213> Tachypleus tridentatus

<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
          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
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
          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
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
          180          185          190
Pro Lys Cys Ile Arg Glu Cys Ala Lys Val Ser Ser Pro Glu His Gly
          195          200          205

```

ES 2 784 510 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
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
	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
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
	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
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
		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
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
		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				
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
		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				
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
		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				
Leu	Pro	Glu	Gly	His	Tyr	Arg	Val	Gly	Ser	Arg	Ala	Ile	Tyr	Thr	Cys

ES 2 784 510 T3

```

705          710          715          720
Glu Ser Arg Tyr Tyr Glu Leu Leu Gly Ser Gln Gly Arg Arg Cys Asp
          725          730          735
Ser Asn Gly Asn Trp Ser Gly Arg Pro Ala Ser Cys Ile Pro Val Cys
          740          745          750
Gly Arg Ser Asp Ser Pro Arg Ser Pro Phe Ile Trp Asn Gly Asn Ser
          755          760          765
Thr Glu Ile Gly Gln Trp Pro Trp Gln Ala Gly Ile Ser Arg Trp Leu
          770          775          780
Ala Asp His Asn Met Trp Phe Leu Gln Cys Gly Gly Ser Leu Leu Asn
          785          790          795          800
Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Thr Tyr Ser Ala Thr
          805          810          815
Ala Glu Ile Ile Asp Pro Ser Gln Phe Lys Ile Tyr Leu Gly Lys Tyr
          820          825          830
Tyr Arg Asp Asp Ser Arg Asp Asp Asp Tyr Val Gln Val Arg Glu Ala
          835          840          845
Leu Glu Ile His Val Asn Pro Asn Tyr Asp Pro Gly Asn Leu Asn Phe
          850          855          860
Asp Ile Ala Leu Ile Gln Leu Lys Thr Pro Val Thr Leu Thr Thr Arg
          865          870          875          880
Val Gln Pro Ile Cys Leu Pro Thr Asp Ile Thr Thr Arg Glu His Leu
          885          890          895
Lys Glu Gly Thr Leu Ala Val Val Thr Gly Trp Gly Leu Asn Glu Asn
          900          905          910
Asn Thr Tyr Ser Glu Met Ile Gln Gln Ala Val Leu Pro Val Val Ala
          915          920          925
Ala Ser Thr Cys Glu Glu Gly Tyr Lys Glu Ala Asp Leu Pro Leu Thr
          930          935          940
Val Thr Glu Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Lys Gly Arg Tyr Asp
          945          950          955          960
Ala Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Phe Ala Asp Asp Ser
          965          970          975
Arg Thr Glu Arg Arg Trp Val Leu Glu Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser
          980          985          990
Pro Ser Gly Cys Gly Lys Ala Asn Gln Tyr Gly Gly Phe Thr Lys Val
          995          1000          1005
Asn Val Phe Leu Ser Trp Ile Arg Gln Phe Ile
          1010          1015

```

<210> 3

<211> 3060

<212> ADN

5 <213> Carinoscorpius rotundicauda

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3060)

<400> 3

```

atg gtc tta gcg tcg ttt ttg gtg tct ggt tta gtt cta ggc cta cta      48
Met Val Leu Ala Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu
1          5          10          15
gcc caa aaa atg cgc cca gtt cag tcc aaa gga gta gat cta ggc ttg      96
Ala Gln Lys Met Arg Pro Val Gln Ser Lys Gly Val Asp Leu Gly Leu
          20          25          30
tgt gat gaa acg agg ttc gag tgt aag tgt ggc 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
ttc aac att cca gtg aaa caa tgt aca tac ttt tat cga tgg agg ccg      192
Phe Asn Ile Pro Val Lys Gln Cys Thr Tyr Phe Tyr Arg Trp Arg Pro

```

ES 2 784 510 T3

50	55	60	
tat tgt aaa cca tgt gat gac ctg gag gct aag gat att tgt cca aag			240
Tyr Cys Lys Pro Cys Asp Asp Leu Glu Ala Lys Asp Ile Cys Pro Lys			
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 cag tgt			336
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 gca tgt cgt			384
Lys Asn Gly Gly Ile Cys Asp Gln Arg Thr Gly Ala Cys Ala Cys Arg			
115	120	125	
gac aga tat gaa ggg gtg cac tgt gaa att ctc aaa ggt tgt cct ctt			432
Asp Arg Tyr Glu Gly Val His Cys Glu Ile Leu Lys Gly Cys Pro Leu			
130	135	140	
ctt cca tcg gat tct cag gtt cag gaa gtc aga aat 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 aag ggt			528
Pro Gln Thr Ile Asp Tyr Ser Cys Ser Pro Gly Phe Lys Leu Lys Gly			
165	170	175	
atg gca cga att agc tgt ctc cca aat gga cag tgg agt aac ttt cca			576
Met Ala Arg Ile Ser Cys Leu Pro Asn Gly Gln Trp Ser Asn Phe Pro			
180	185	190	
ccc aaa tgt att cga gaa tgt gcc atg gtt tca tct cca gaa cat ggg			624
Pro Lys Cys Ile Arg Glu Cys Ala Met Val Ser Ser Pro Glu His Gly			
195	200	205	
aaa gtg aat gct ctt agt ggt gat atg ata gaa ggg gct act tta cgg			672
Lys Val Asn Ala Leu Ser Gly Asp Met Ile Glu Gly Ala Thr Leu Arg			
210	215	220	
ttc tca tgt gat agt ccc 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
tgt cag ggt aat ggt cag tgg aat gga cag ata cca caa tgt aag aac			768
Cys Gln Gly Asn Gln Trp Asn Gly Gln Ile Pro Gln Cys Lys Asn			
245	250	255	
ttg gtc ttc tgt cct gac ctg gat cct gta aac cat gct gaa cac aag			816
Leu Val Phe Cys Pro Asp Leu Asp Pro Val Asn His Ala Glu His Lys			
260	265	270	
gtt aaa att ggt gtg gaa caa aaa tat ggt cag ttt cct caa ggc act			864
Val Lys Ile Gly Val Glu Gln Lys Tyr Gly Gln Phe Pro Gln Gly Thr			
275	280	285	
gaa gtg acc tat acg tgt tcg ggt aac tac ttc ttg atg ggt ttt gac			912
Glu Val Thr Tyr Thr Cys Ser Gly Asn Tyr Phe Leu Met Gly Phe Asp			
290	295	300	
acc tta aaa tgt aac cct gat ggg tct 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
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			
340	345	350	
ggc tgt tct ttg aca gct ggt act gtg tgg ggt aca gcc ata tac cat			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
Glu Leu Ser Ser Val Cys Arg Ala Ala Ile His Ala Gly Lys Leu Pro			
370	375	380	
aac tct gga gga gcg gtg cat gtt 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			

ES 2 784 510 T3

385	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	cgg	agt	ttc	cga	ttc	gat	tat	gtc	cgt	tcc	tcc	aca	gca	ggt	1296
	Leu	Ala	Arg	Ser	Phe	Arg	Phe	Asp	Tyr	Val	Arg	Ser	Ser	Thr	Ala	Gly	
				420					425					430			
	aaa	tca	gga	tgt	cct	gat	gga	tgg	ttt	gag	gta	gac	gag	aac	tgt	gtg	1344
	Lys	Ser	Gly	Cys	Pro	Asp	Gly	Trp	Phe	Glu	Val	Asp	Glu	Asn	Cys	Val	
			435					440					445				
	tac	gtt	aca	tca	aaa	cag	aga	gcc	tgg	gaa	aga	gct	caa	ggt	gtg	tgt	1392
	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	ctg	gac	aaa	gat	gta	att	cca	1440
	Thr	Asn	Met	Ala	Ala	Arg	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Lys	Asp	Val	Ile	Pro	
	465					470					475				480		
	aat	tcg	ttg	act	gag	act	cta	cga	ggg	aaa	ggg	tta	aca	acc	acg	tgg	1488
	Asn	Ser	Leu	Thr	Glu	Thr	Leu	Arg	Gly	Lys	Gly	Leu	Thr	Thr	Thr	Trp	
				485					490						495		
	ata	gga	ttg	cac	aga	cta	gat	gct	gag	aag	ccc	ttt	att	tgg	gag	tta	1536
	Ile	Gly	Leu	His	Arg	Leu	Asp	Ala	Glu	Lys	Pro	Phe	Ile	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	
			515				520					525					
	tct	ggc	gaa	cct	gga	aat	gaa	act	aac	tgt	gta	tat	atg	gac	atc	caa	1632
	Ser	Gly	Glu	Pro	Gly	Asn	Glu	Thr	Asn	Cys	Val	Tyr	Met	Asp	Ile	Gln	
		530				535					540						
	gat	cag	ttg	cag	tct	gtg	tgg	aaa	acc	aag	tca	tgt	ttt	cag	ccc	tca	1680
	Asp	Gln	Leu	Gln	Ser	Val	Trp	Lys	Thr	Lys	Ser	Cys	Phe	Gln	Pro	Ser	
	545				550			555							560		
	agt	ttt	gct	tgc	atg	atg	gat	ctg	tca	gac	aga	aat	aaa	gcc	aaa	tgc	1728
	Ser	Phe	Ala	Cys	Met	Met	Asp	Leu	Ser	Asp	Arg	Asn	Lys	Ala	Lys	Cys	
				565				570						575			
	gat	gat	cct	gga	tca	ctg	gaa	aat	gga	cac	gcc	aca	ctt	cat	gga	caa	1776
	Asp	Asp	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Asn	Gly	His	Ala	Thr	Leu	His	Gly	Gln	
				580				585					590				
	agt	att	gat	ggg	ttc	tat	gct	ggg	tct	tct	ata	agg	tac	agc	tgt	gag	1824
	Ser	Ile	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Gly	Ser	Ser	Ile	Arg	Tyr	Ser	Cys	Glu	
			595				600					605					
	gtt	ctc	cac	tac	ctc	agt	gga	act	gaa	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					620						
	ggc	aca	tgg	agt	gct	cct	aaa	cct	cga	tgt	atc	aaa	gtc	atc	acc	tgc	1920
	Gly	Thr	Trp	Ser	Ala	Pro	Lys	Pro	Arg	Cys	Ile	Lys	Val	Ile	Thr	Cys	
	625				630			635							640		
	caa	aac	ccc	cct	gta	cca	tca	tat	ggg	tct	gtg	gaa	atc	aaa	ccc	cca	1968
	Gln	Asn	Pro	Pro	Val	Pro	Ser	Tyr	Gly	Ser	Val	Glu	Ile	Lys	Pro	Pro	
				645				650						655			
	agt	cgg	aca	aac	tcg	ata	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			
	cca	cgg	tta	ccc	ctc	cca	tta	gct	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	tcg	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	
		690				695					700						
	cta	cct	gaa	ggg	cat	tac	cgg	gta	ggg	tct	cga	gcc	atc	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	tcg	aga	tac	tac	gaa	cta	ctt	gga	tct	caa	ggc	aga	aga	tgt	gac	2208
	Glu	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Glu	Leu	Leu	Gly	Ser	Gln	Gly	Arg	Arg	Cys	Asp	

ES 2 784 510 T3

	725	730	735	
tct aat gga aac tgg agt ggt cgg cca gcg agc tgt att cca gtt tgt				2256
Ser Asn Gly Asn Trp Ser Gly Arg Pro Ala Ser Cys Ile Pro Val Cys				
	740	745	750	
gga cgg tca gac tct cct cgt tct cct ttt 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 aga tgg ctt				2352
Thr Glu Ile Gly Gln Trp Pro Trp Gln Ala Gly Ile Ser Arg Trp Leu				
	770	775	780	
gca gac cac aat atg tgg ttt ctc cag tgt gga gga tct cta ttg aat				2400
Ala Asp His Asn Met Trp Phe Leu Gln Cys Gly Gly Ser Leu Leu Asn				
	785	790	795	
gag aaa tgg atc gtc act gct gcc cac tgt gtc acc tac tct gct act				2448
Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Thr Tyr Ser Ala Thr				
	805	810	815	
gct gag att att gac ccc aat cag ttt aaa atg tat ctg ggc aag tac				2496
Ala Glu Ile Ile Asp Pro Asn Gln Phe Lys Met Tyr Leu Gly Lys Tyr				
	820	825	830	
tac cgt gat gac agt aga gac gat gac tat 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	
ctt gag atc cac gtg 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				
	865	870	875	
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
Lys Glu Gly Thr Leu Ala Val Val Thr Gly Trp Gly Leu Asn Glu Asn				
	900	905	910	
aac acc tat tca gag acg att caa caa gct gtg cta cct gtt gtt gca				2784
Asn Thr Tyr Ser Glu Thr Ile Gln Gln Ala Val Leu Pro Val Val Ala				
	915	920	925	
gcc 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				
	945	950	955	
gcc tgc agt ggg gac agt gga gga cct 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
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 gcg aac cag tac ggg ggc ttc act aaa gtt				3024
Pro Ser Gly Cys Gly Lys Ala Asn Gln Tyr Gly Gly Phe Thr Lys Val				
	995	1000	1005	
aac gtt ttc ctg tca tgg att agg cag ttc att tga				3060
Asn Val Phe Leu Ser Trp Ile Arg Gln Phe Ile				
	1010	1015		

<210> 4

<211> 1019

<212> PRT

5 <213> Carcinoscorpius rotundicauda

<400> 4

ES 2 784 510 T3

Met	Val	Leu	Ala	Ser	Phe	Leu	Val	Ser	Gly	Leu	Val	Leu	Gly	Leu	Leu
1				5					10					15	
Ala	Gln	Lys	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Ser	Lys	Gly	Val	Asp	Leu	Gly	Leu
			20					25					30		
Cys	Asp	Glu	Thr	Arg	Phe	Glu	Cys	Lys	Cys	Gly	Asp	Pro	Gly	Tyr	Val
		35					40				45				
Phe	Asn	Ile	Pro	Val	Lys	Gln	Cys	Thr	Tyr	Phe	Tyr	Arg	Trp	Arg	Pro
	50					55					60				
Tyr	Cys	Lys	Pro	Cys	Asp	Asp	Leu	Glu	Ala	Lys	Asp	Ile	Cys	Pro	Lys
65					70					75					80
Tyr	Lys	Arg	Cys	Gln	Glu	Cys	Lys	Ala	Gly	Leu	Asp	Ser	Cys	Val	Thr
				85					90					95	
Cys	Pro	Pro	Asn	Lys	Tyr	Gly	Thr	Trp	Cys	Ser	Gly	Glu	Cys	Gln	Cys
			100					105					110		
Lys	Asn	Gly	Gly	Ile	Cys	Asp	Gln	Arg	Thr	Gly	Ala	Cys	Ala	Cys	Arg
		115					120					125			
Asp	Arg	Tyr	Glu	Gly	Val	His	Cys	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly	Cys	Pro	Leu
130						135					140				
Leu	Pro	Ser	Asp	Ser	Gln	Val	Gln	Glu	Val	Arg	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn
145					150					155					160
Pro	Gln	Thr	Ile	Asp	Tyr	Ser	Cys	Ser	Pro	Gly	Phe	Lys	Leu	Lys	Gly
				165					170					175	
Met	Ala	Arg	Ile	Ser	Cys	Leu	Pro	Asn	Gly	Gln	Trp	Ser	Asn	Phe	Pro
			180					185					190		
Pro	Lys	Cys	Ile	Arg	Glu	Cys	Ala	Met	Val	Ser	Ser	Pro	Glu	His	Gly
		195					200					205			
Lys	Val	Asn	Ala	Leu	Ser	Gly	Asp	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
Cys	Gln	Gly	Asn	Gly	Gln	Trp	Asn	Gly	Gln	Ile	Pro	Gln	Cys	Lys	Asn
			245						250					255	
Leu	Val	Phe	Cys	Pro	Asp	Leu	Asp	Pro	Val	Asn	His	Ala	Glu	His	Lys
		260						265					270		
Val	Lys	Ile	Gly	Val	Glu	Gln	Lys	Tyr	Gly	Gln	Phe	Pro	Gln	Gly	Thr
		275					280					285			
Glu	Val	Thr	Tyr	Thr	Cys	Ser	Gly	Asn	Tyr	Phe	Leu	Met	Gly	Phe	Asp
	290					295					300				
Thr	Leu	Lys	Cys	Asn	Pro	Asp	Gly	Ser	Trp	Ser	Gly	Ser	Gln	Pro	Ser
305				310						315					320
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
		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
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	Arg	Ser	Ser	Thr	Ala	Gly
			420					425					430		
Lys	Ser	Gly	Cys	Pro	Asp	Gly	Trp	Phe	Glu	Val	Asp	Glu	Asn	Cys	Val
		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	Val	Ile	Pro
465					470					475					480
Asn	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	Ile	Trp	Glu	Leu

ES 2 784 510 T3

			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	Met	Asp	Ile	Gln	
	530					535					540					
Asp	Gln	Leu	Gln	Ser	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	Ser	Leu	Glu	Asn	Gly	His	Ala	Thr	Leu	His	Gly	Gln	
			580					585					590			
Ser	Ile	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Gly	Ser	Ser	Ile	Arg	Tyr	Ser	Cys	Glu	
		595					600					605				
Val	Leu	His	Tyr	Leu	Ser	Gly	Thr	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Thr	Thr	Asn	
	610					615					620					
Gly	Thr	Trp	Ser	Ala	Pro	Lys	Pro	Arg	Cys	Ile	Lys	Val	Ile	Thr	Cys	
625					630					635					640	
Gln	Asn	Pro	Pro	Val	Pro	Ser	Tyr	Gly	Ser	Val	Glu	Ile	Lys	Pro	Pro	
				645					650					655		
Ser	Arg	Thr	Asn	Ser	Ile	Ser	Arg	Val	Gly	Ser	Pro	Phe	Leu	Arg	Leu	
			660					665					670			
Pro	Arg	Leu	Pro	Leu	Pro	Leu	Ala	Arg	Ala	Ala	Lys	Pro	Pro	Pro	Lys	
		675					680					685				
Pro	Arg	Ser	Ser	Gln	Pro	Ser	Thr	Val	Asp	Leu	Ala	Ser	Lys	Val	Lys	
	690					695					700					
Leu	Pro	Glu	Gly	His	Tyr	Arg	Val	Gly	Ser	Arg	Ala	Ile	Tyr	Thr	Cys	
705					710					715					720	
Glu	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Glu	Leu	Leu	Gly	Ser	Gln	Gly	Arg	Arg	Cys	Asp	
				725				730						735		
Ser	Asn	Gly	Asn	Trp	Ser	Gly	Arg	Pro	Ala	Ser	Cys	Ile	Pro	Val	Cys	
			740					745					750			
Gly	Arg	Ser	Asp	Ser	Pro	Arg	Ser	Pro	Phe	Ile	Trp	Asn	Gly	Asn	Ser	
		755					760					765				
Thr	Glu	Ile	Gly	Gln	Trp	Pro	Trp	Gln	Ala	Gly	Ile	Ser	Arg	Trp	Leu	
					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	
				805					810					815		
Ala	Glu	Ile	Ile	Asp	Pro	Asn	Gln	Phe	Lys	Met	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				

<210> 5
<211> 1203
<212> ADN
<213> *Tachypleus tridentatus*
<220>
<221> CDS

ES 2 784 510 T3

<222> (1)..(1203)

<400> 5

atg acg tgg ata tgt gtg ata acg ttg ttt gct ctg gct tct gct acg	48
Met Thr Trp Ile Cys Val Ile Thr Leu Phe Ala Leu Ala Ser Ala Thr	
1 5 10 15	
ttg ggt aac aaa gtt agt aga gtg ggg gtc ctc ttc ccc aag aca cgg	96
Leu Gly Asn Lys Val Ser Arg Val Gly Val Leu Phe Pro Lys Thr Arg	
20 25 30	
aac gac aat gag tgt aca gca aga ggg gga ttg aaa gga tcc tgc aaa	144
Asn Asp Asn Glu Cys Thr Ala Arg Gly Gly Leu Lys Gly Ser Cys Lys	
35 40 45	
tcc ctc ata gac tgt cct agt gtc ttg gct acg ttg aag gac agt ttt	192
Ser Leu Ile Asp Cys Pro Ser Val Leu Ala Thr Lys Asp Ser Phe	
50 55 60	
cct gtc gtt tgc tct tgg aat ggt cga ttt cag cct att gtc tgc tgt	240
Pro Val Val Cys Ser Trp Asn Gly Arg Phe Gln Pro Ile Val Cys Cys	
65 70 75 80	
cct gat gca ata gca cca cct gta acc aca aca gct gta act gta	288
Pro Asp Ala Ile Ala Pro Pro Val Thr Thr Thr Ala Val Thr Val	
85 90 95	
ata tct aca aaa gaa cca aag ctt cca aga tta cat ata tca ggt tgt	336
Ile Ser Thr Lys Glu Pro Lys Leu Pro Arg Leu His Ile Ser Gly Cys	
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	
tca cca ata ctt cct ccg ata tct act cct caa aat tca aca ggt ggg	432
Ser Pro Ile Leu Pro Pro Ile Ser Thr Pro Gln Asn Ser Thr Gly Gly	
130 135 140	
aga gga att att gct gga ggc gta gaa gcc aaa att ggc gcg tgg cct	480
Arg Gly Ile Ile Ala Gly Gly Val Glu Ala Lys Ile Gly Ala Trp Pro	
145 150 155 160	
tggt 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
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	
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	
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

ES 2 784 510 T3

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	ggg	864
Asp	Arg	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Trp	Gly	Asp	Leu	Asp	Phe	Ser	Gly	
		275					280				285					
cca	cgg	agc	caa	gtt	cta	cgt	gag	gta	agc	atc	cca	gtt	gtt	cca	gtt	912
Pro	Arg	Ser	Gln	Val	Leu	Arg	Glu	Val	Ser	Ile	Pro	Val	Val	Pro	Val	
	290					295					300					
gat	aaa	tgt	gat	caa	gcc	tat	gag	aaa	ctc	aac	acc	cct	tca	cta	aaa	960
Asp	Lys	Cys	Asp	Gln	Ala	Tyr	Glu	Lys	Leu	Asn	Thr	Pro	Ser	Leu	Lys	
305				310						315					320	
aat	ggg	ata	acg	aat	aac	ttc	ctt	tgc	gct	gga	ttg	gaa	gaa	gga	ggg	1008
Asn	Gly	Ile	Thr	Asn	Asn	Phe	Leu	Cys	Ala	Gly	Leu	Glu	Glu	Gly	Gly	
			325						330					335		
aaa	gac	gct	tgc	caa	ggc	gat	tct	ggt	gga	ccg	ttg	atg	cta	gtg	aac	1056
Lys	Asp	Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Met	Leu	Val	Asn	
		340						345					350			
aac	act	agg	tgg	ata	gta	gta	gga	gtt	gtg	tcg	ttc	ggg	cac	aag	tgt	1104
Asn	Thr	Arg	Trp	Ile	Val	Val	Gly	Val	Val	Ser	Phe	Gly	His	Lys	Cys	
	355					360						365				
gcc	gag	gaa	gga	tat	cct	ggt	gtg	tac	tcg	cgc	gta	gcg	agt	tac	cta	1152
Ala	Glu	Glu	Gly	Tyr	Pro	Gly	Val	Tyr	Ser	Arg	Val	Ala	Ser	Tyr	Leu	
	370					375					380					
gac	tgg	atc	gcg	aaa	gtt	acg	aac	tcg	tta	gat	cat	gcc	gtc	act	aac	1200
Asp	Trp	Ile	Ala	Lys	Val	Thr	Asn	Ser	Leu	Asp	His	Ala	Val	Thr	Asn	
385				390						395					400	
taa																1203

<210> 6

<211> 400

<212> PRT

5 <213> Tachypleus tridentatus

<400> 6

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

Asp Val Ile Ile His Pro His Tyr Val Glu Lys Glu Asn Tyr Asn Asp
 225 230 235 240
 Ile Ala Ile Ile Glu Leu Lys Glu Glu Leu Asn Phe Thr Asp Leu Val
 245 250 255
 Asn Pro Ile Cys Leu Pro Asp Pro Glu Thr Val Thr Asp Pro Leu Lys
 260 265 270
 Asp Arg Ile Val Thr Ala Ala Gly Trp Gly Asp Leu Asp Phe Ser Gly
 275 280 285
 Pro Arg Ser Gln Val Leu Arg Glu Val Ser Ile Pro Val Val Pro Val
 290 295 300
 Asp Lys Cys Asp Gln Ala Tyr Glu Lys Leu Asn Thr Pro Ser Leu Lys
 305 310 315 320
 Asn Gly Ile Thr Asn Asn Phe Leu Cys Ala Gly Leu Glu Glu Gly Gly
 325 330 335
 Lys Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Leu Val Asn
 340 345 350
 Asn Thr Arg Trp Ile Val Val Gly Val Val Ser Phe Gly His Lys Cys
 355 360 365
 Ala Glu Glu Gly Tyr Pro Gly Val Tyr Ser Arg Val Ala Ser Tyr Leu
 370 375 380
 Asp Trp Ile Ala Lys Val Thr Asn Ser Leu Asp His Ala Val Thr Asn
 385 390 395 400

<210> 7

<211> 1128

<212> ADN

5 <213> Tachypleus tridentatus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1128)

<400> 7

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

ES 2 784 510 T3

```

145          150          155          160
ctt gtc act aac agg cac gtg att aca gct tcg cac tgt gtt gta aac      528
Leu Val Thr Asn Arg His Val Ile Thr Ala Ser His Cys Val Val Asn

          165          170          175
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
ggg 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

          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
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
gca ttt aac ggc cca tct agt gca gtg ttg aga gaa gta cag tta cca      864
Ala Phe Asn Gly Pro Ser Ser Ala Val Leu Arg Glu Val Gln Leu Pro

          275          280          285
ata tgg gaa cac gag gcc tgt aga cag gcc tac gag aag gat tta aat      912
Ile Trp Glu His Glu Ala Cys Arg Gln Ala Tyr Glu Lys Asp Leu Asn

          290          295          300
att aca aac gtg tat atg tgt gct ggc ttt gca gat ggc ggg aag gat      960
Ile Thr Asn Val Tyr Met Cys Ala Gly Phe Ala Asp Gly Gly Lys Asp

          305          310          315          320
gct tgc cag ggt gat tct gga ggt cca atg atg ttg cct gtt aaa acc      1008
Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Met Met Leu Pro Val Lys Thr

          325          330          335
gga gag ttt tat ctc att gga att gtg tct ttc gga aag aaa tgc gca      1056
Gly Glu Phe Tyr Leu Ile Gly Ile Val Ser Phe Gly Lys Lys Cys Ala

          340          345          350
ttg cct gga ttt cct ggg gtt tac aca aaa gtg aca gag ttt tta gat      1104
Leu Pro Gly Phe Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Glu Phe Leu Asp

          355          360          365
tgg att gca gaa cat atg gtg tag      1128
Trp Ile Ala Glu His Met Val

          370          375

```

<210> 8

<211> 375

<212> PRT

5 <213> Tachypleus tridentatus

<400> 8

```

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
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
65          70          75          80
Lys Val Cys Cys Pro Lys Ser Ser His Val Ile Ser Ser Thr Gln Ala
85          90          95

```

ES 2 784 510 T3

```

Pro Pro Glu Thr Thr Thr Thr Glu Arg Pro Pro Lys Gln Ile Pro Pro
      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
      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
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
      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
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
      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
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
Trp Ile Ala Glu His Met Val
      370      375

```

<210> 9

<211> 1203

<212> ADN

5 <213> Tachypleus tridentatus

<400> 9

```

atgacctgga tctgcgtgat caccctgttc gctctggcct ccgctaccct gggcaacaag      60
gtgtcccgtg tgggtgtcct gttcccgaag acccgtaacg acaacgagtg caccgctcgt      120
ggtggtctga agggctcctg caagtccctg atcgactgcc cctccgtgct ggctaccctg      180
aaggactcct tcccgcctgt gtgctcctgg aacggctcgt tccagcccat cgtgtgctgc      240
cccgacgcta tcgctcccc ccctgtgacc accaccgctg tgaccgtgat ctccaccaag      300
gagcccaagc tgccccgtct gcacatctcc ggttgccgca agcgcaaggt caagatcgac      360
atcaccaccg tgggccgttc cggttccccc atcctgcccc ccatctccac cccccagAAC      420
tccactgggt gtcgtggtat catcgctggc ggtgtcgagg ctaagatcgg tgcttggtcc      480
tggatggctg ctgtgttcgt gaagaacttc ggtatcggtc gtttccactg cgctgggttc      540
atcatctcca acaagtacat cctgtccgct gctcacgctt tcctcatcgg tggtcgcaag      600
ctgaccccca cccgtctggc tgtgcgtgtg ggtggctact acatcaagcg tggccaggag      660
taccocgtca aggacgtgat catccacccc cactacgtgg agaaggagaa ctacaacgac      720
atcgccatca tcgagctgaa ggaggagctg aacttcaccg acctggtcaa ccccatctgc      780
ctgccccgac ccgagactgt gaccgaccct ctgaaggacc gtatcgtgac cgctgctggc      840
tggggcgacc tggacttctc cgggtcccggt tcccagggtc tgctgaggt gtccatcccc      900
gtggtgcccg tggacaagtg cgaccaggct tacgagaagc tgaacacccc ctccctgaag      960
aacggtatta ccaacaactt cctctgcgcc ggactcgagg aggggtggcaa ggacgcttgc      1020
cagggcgact ccggtggtcc cctgatgctg gtcaacaaca cccgttggtg cgtcgtgggt      1080
gtcgtgtcct tcggtcacia gtgcgctgag gagggttacc ccggcgtcta ctcccgtgtg      1140

gcttcctacc tggactggat cgctaaggtc accaactccc tggaccacgc tgtcaccaac      1200
taa                                                1203

```

10 <210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 10

Ile Glu Gly Arg

1

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para mitigar una inhibición de reacción en ensayo de endotoxina en presencia de un ion salino, comprendiendo el método:
 - mezclar un Factor C de cangrejo herradura producido por una célula humana o una célula de hámster chino como célula huésped con una muestra de ensayo que contiene el ion salino,
 - en donde el Factor C contiene ácido siálico terminal enlazado en (α -2,3) en una mayor cantidad, en comparación con un Factor C de cangrejo herradura expresado usando Sf9 como célula huésped, y
 - en donde el Factor C presenta una actividad residual mayor
 - (i) en presencia de citrato sódico 21 mM, y/o
 - (ii) en presencia de hidrogenocarbonato de sodio 52 mM, y/o
 - (iii) en presencia de cloruro de sodio 214 mM, y/o
 - (iv) en presencia de sulfato de magnesio 16 mM,
 - en comparación con un Factor C de cangrejo herradura expresado en Sf9 como célula huésped.
2. El método según la reivindicación 1, en el que el ion salino se selecciona del grupo que consiste en ion sodio, ion potasio, ion calcio y ion magnesio.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el Factor C de cangrejo herradura es una proteína que se muestra en los siguientes (A), (B), (C) o (D):
 - (A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;
 - (B) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% o más con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y que tiene actividad de Factor C;
 - (C) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4;
 - (D) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% o más con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y que tiene actividad de Factor C.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cangrejo herradura se selecciona del grupo que consiste en *Tachypleus tridentatus*, *Limulus polyphemus*, *Carcinoscorpius rotundicauda* y *Tachypleus gigas*.
5. Un método para producir un Factor C de cangrejo herradura soluble en agua para usar en el ensayo de endotoxinas en presencia de un ion salino, comprendiendo el método:
 - expresar el Factor C de cangrejo herradura en una célula humana o una célula de hámster chino como célula huésped,
 - en donde el Factor C contiene ácido siálico terminal enlazado en (α -2,3) en una cantidad mayor, en comparación con un Factor C cangrejo herradura expresado usando Sf9 como célula huésped, y
 - en donde el Factor C exhibe una mayor actividad residual
 - (i) en presencia de citrato de sodio 21 mM, y/o
 - (ii) en presencia de hidrogenocarbonato de sodio 52 mM, y/o
 - (iii) en presencia de cloruro de sodio 214 mM, y/o
 - (iv) en presencia de sulfato de magnesio 16 mM,
 - en comparación con un Factor C de cangrejo herradura expresado en Sf9 como célula huésped.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende:
 - recuperar el Factor C de cangrejo herradura expresado como solución.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que el ion salino se selecciona del grupo que consiste en ion sodio, ion potasio, ion calcio y ion magnesio.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el Factor C de cangrejo herradura

es una proteína que se muestra en los siguientes (A), (B), (C) o (D):

(A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;

(B) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% o más con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y que tiene actividad de Factor C;

5 (C) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4;

(D) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% o más con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y que tiene actividad de Factor C.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que el cangrejo herradura se selecciona del grupo que consiste en *Tachypleus tridentatus*, *Limulus polyphemus*, *Carcinoscorpius rotundicauda*, *Tachypleus gigas*.

10 10. Un método para medir la endotoxina en una muestra de ensayo, comprendiendo el método:

una etapa de mezclar un agente de ensayo que comprende un Factor C de herradura producido por una célula humana o una célula de hámster chino como célula huésped y la muestra de ensayo, y

una etapa de medir el progreso de una reacción en cascada,

15 en donde el Factor C de cangrejo herradura contiene ácido siálico terminal enlazado en (α -2,3) en una mayor cantidad en comparación con un Factor C de cangrejo herradura expresado en Sf9 como célula huésped,

en donde la muestra de ensayo contiene iones de sodio, y

en donde la cantidad contenida del ion en la muestra de ensayo es tal que la concentración del ion sodio derivado de la muestra de ensayo llega a 20 mM o más, como una concentración final en el sistema de reacción después de mezclar la muestra de ensayo con el agente de ensayo.

20 11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el Factor C de cangrejo herradura es una proteína que se muestra en los siguientes (A), (B), (C) o (D):

(A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;

(B) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% o más con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y que tiene actividad de Factor C;

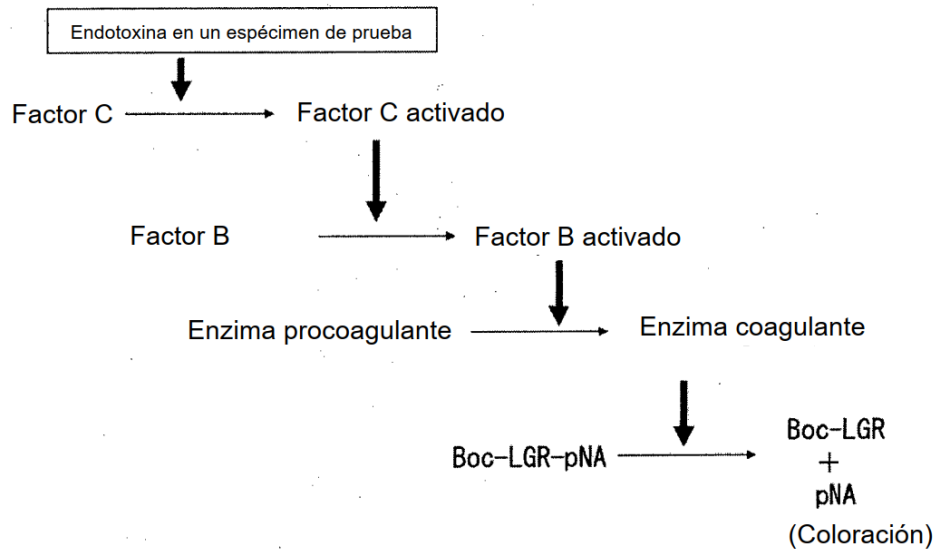
25 (C) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4;

(D) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% o más con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y que tiene actividad de Factor C.

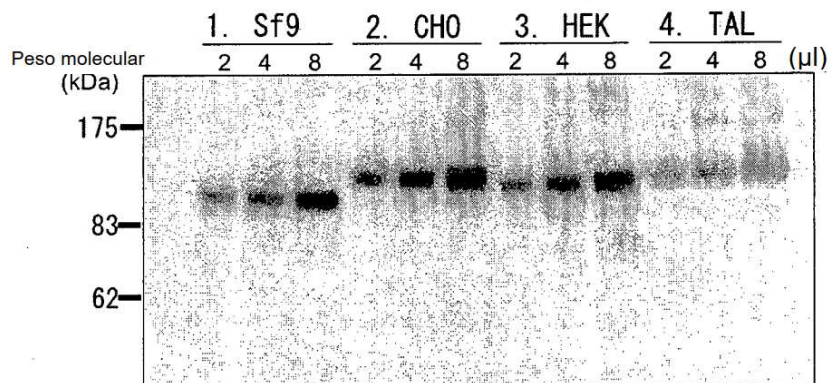
12. El método de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que el cangrejo herradura se selecciona del grupo que consiste en *Tachypleus tridentatus*, *Limulus polyphemus*, *Carcinoscorpius rotundicauda* y *Tachypleus gigas*.

30

[Fig. 1]

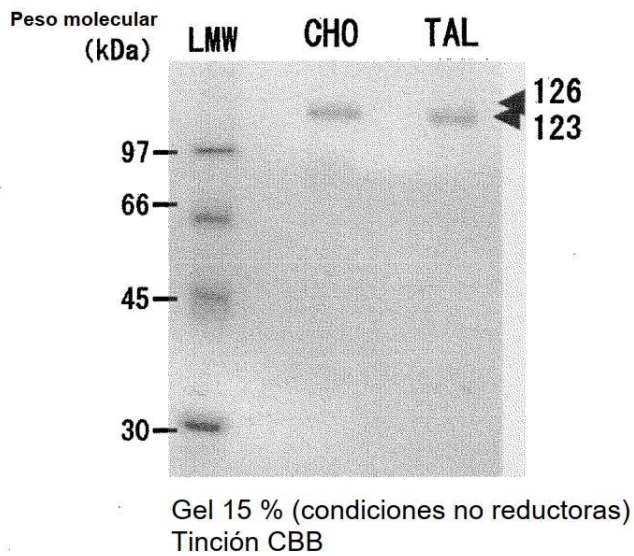


[Fig. 2]

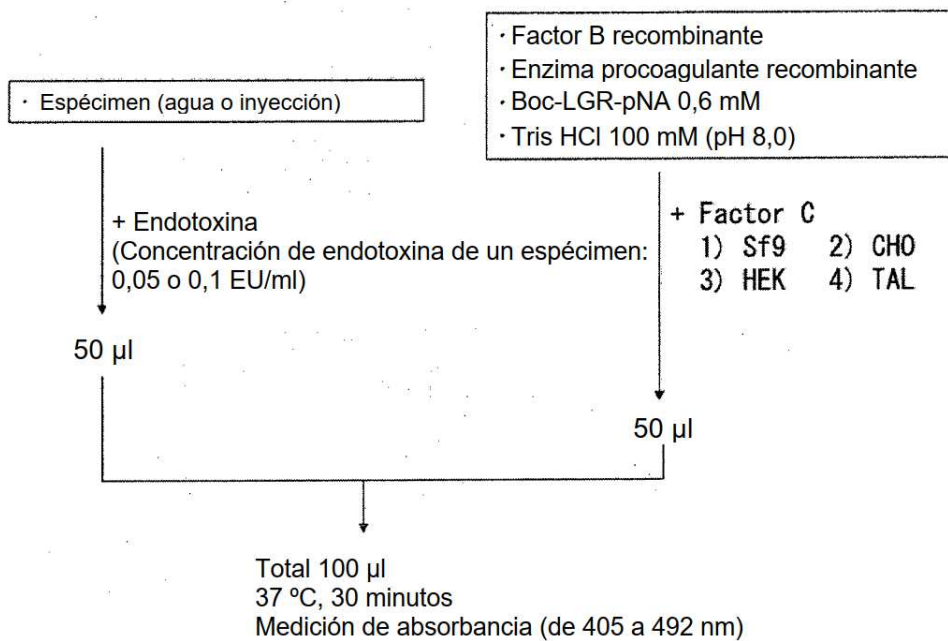


Anticuerpo primario: anticuerpo anti-factor C monoclonal (2C12)
 Condiciones de electroforesis: no reductoras

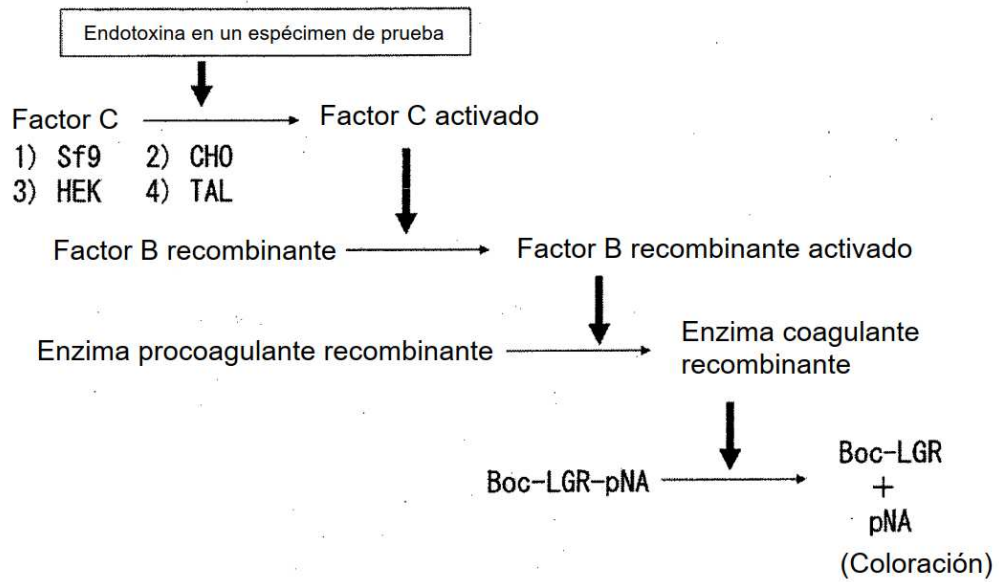
[Fig. 3]



[Fig. 4]



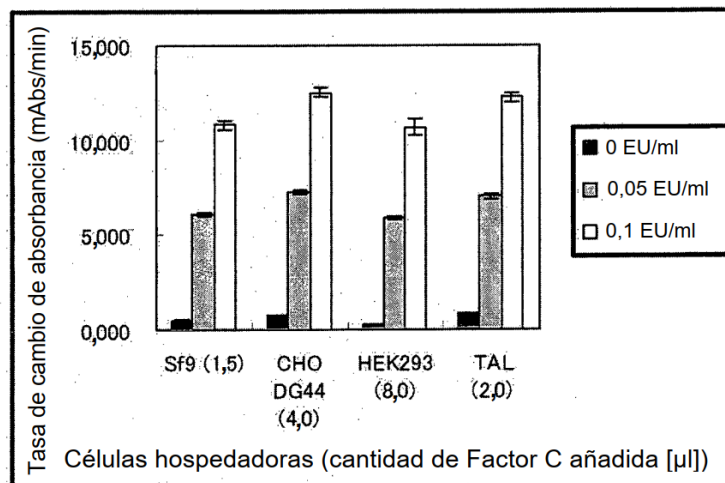
[Fig. 5]



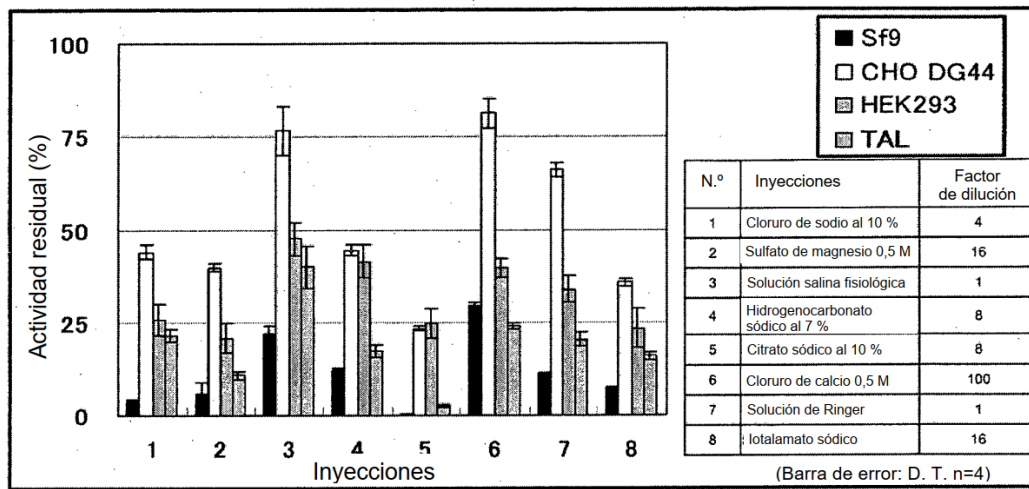
[Fig. 6]

Células hospedadoras para Factor C	Cantidad de Factor C añadida (μ l)	Concentración de endotoxina (EU/ml)	Tasa de cambio de absorbancia (prom. $\pm$ D. T. (mAbs/min))
Sf9	1,5	0	0,520 $\pm$ 0,015
		0,05	6,095 $\pm$ 0,108
		0,1	10,795 $\pm$ 0,246
CHO DG44	4	0	0,770 $\pm$ 0,021
		0,05	7,260 $\pm$ 0,087
		0,1	12,510 $\pm$ 0,255
HEK293	8	0	0,300 $\pm$ 0,017
		0,05	5,885 $\pm$ 0,125
		0,1	10,685 $\pm$ 0,417
TAL	2	0	0,840 $\pm$ 0,055
		0,05	7,030 $\pm$ 0,140
		0,1	12,270 $\pm$ 0,255

n=3



[Fig. 7]



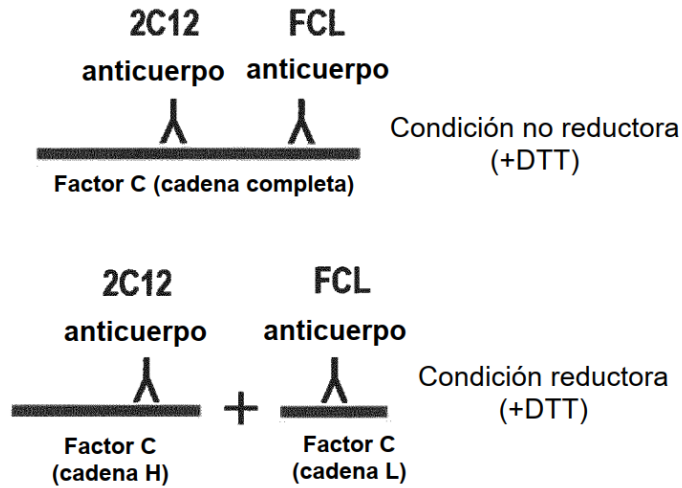
[Fig. 8]

TtFc	MVLASFLVSGLVGLILAQQMRPVQSRGVDLGLCDETRFECKCGDPGYVFNVPMKOCTYFY	
834Cr ID4	MVLASFLVSGLVGLILAQQMRPVQSRGVDLGLCDETRFECKCGDPGYVFNIPVKOCTYFY	60
TtFc	RWRPYCKPCDDLEAKDICPKYKRCQECKAGLDSCVTCPPNKYGTWCSGECQCKNGGICDQ	
834Cr ID4	RWRPYCKPCDDLEAKDICPKYKRCQECKAGLDSCVTCPPNKYGTWCSGECQCKNGGICDQ	120
TtFc	RTGACTCRDRYEGAHCEILKGCPLLPDSQVQVEVRNPPDNPQTIDYSCSPGFKLKGVAR I	
834Cr ID4	RTGACACRDRYEGVHCEILKGCPLLPDSQVQVEVRNPPDNPQTIDYSCSPGFKLKGMA R I	180
TtFc	SCLPNGQWSSFPKCI RECAKVSSPEHGKVNAPSGNMIEGATLRFSCDSPYYLIGQETLT	
834Cr ID4	SCLPNGQWSNFPKCI RECAMVSSPEHGKVNALSGDMIEGATLRFSCDSPYYLIGQETLT	240
TtFc	CQGNGQWSGQIPQCKKL VFCPLDPVNHAEHQVKIGVEQKYGQFPQGTETVYTCSGNYFL	
834Cr ID4	CQGNGQWNGQIPQCKNL VFCPLDPVNHAEHVKIGVEQKYGQFPQGTETVYTCSGNYFL	300
TtFc	MGFNTLKCNPDGSGSGSQPSCVKVADREVD CDSKAVDFLDDVGEPVRIHCPAGCSL TAGT	
834Cr ID4	MGFDTLKCNPDGSGSGSQPSCVKVADREVD CDSKAVDFLDDVGEPVRIHCPAGCSL TAGT	360
TtFc	VWGTAIYHELSSVCRAAIHAGKLPNSGGAVHVVNNGPYSDFLGSDLNGIKSEELKSLARS	
834Cr ID4	VWGTAIYHELSSVCRAAIHAGKLPNSGGAVHVVNNGPYSDFLGSDLNGIKSEELKSLARS	420
TtFc	FRFDYVSSSTAGRSGCPD GWFVEVEENCYVYTSKQRAWERAQGVCTNMAARLAVL DKDL IP	
834Cr ID4	FRFDYVRSSSTAGKSGCPD GWFVEVDENCYVYTSKQRAWERAQGVCTNMAARLAVL DKDV IP	480
TtFc	SSLTETLRGKGLTTTWIGLHRLDAEKPFIWELMDRSNVVLNDNLTFWASGEPGNETNCVY	
834Cr ID4	NSLTETLRGKGLTTTWIGLHRLDAEKPFIWELMDRSNVVLNDNLTFWASGEPGNETNCVY	540
TtFc	LDIRDQLQPWKT KSCFQPS SFACMMDLSDRNKAKCDDPGPLENGHATLHGQSIDGFYAG	
834Cr ID4	MDIQDQLQSVWKT KSCFQPS SFACMMDLSDRNKAKCDDPGSLENGHATLHGQSIDGFYAG	600
TtFc	SSIRYSCEVLHYLSGTETVTCTTNGTWSAPKPRCIKVITCQNPVPVSYGSVEIKPPSRTN	
834Cr ID4	SSIRYSCEVLHYLSGTETVTCTTNGTWSAPKPRCIKVITCQNPVPVSYGSVEIKPPSRTN	660

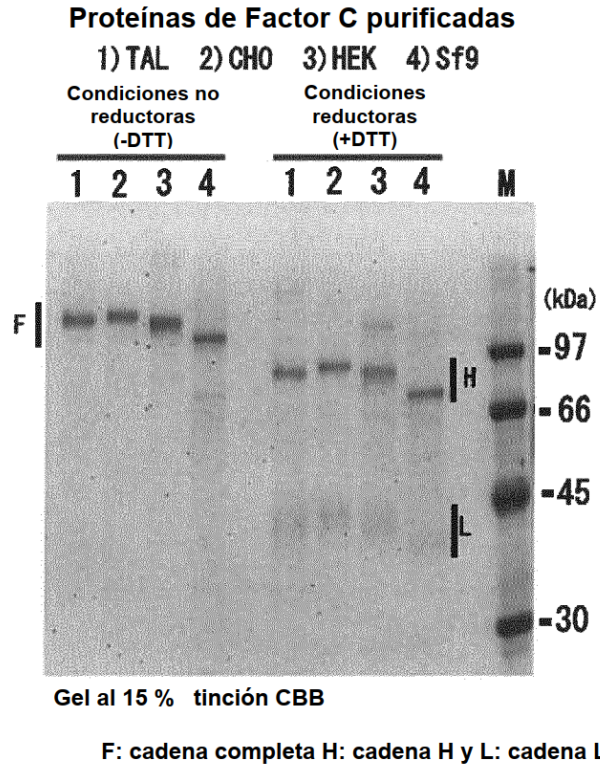
[Fig. 9]

TtFC 834Cr ID4	SISRVGSPFLRLPRLPLPLARAAPPPKPRSSQPSTVDLASKVKLPEGHYRVGSRAIYTC SISRVGSPFLRLPRLPLPLARAAPPPKPRSSQPSTVDLASKVKLPEGHYRVGSRAIYTC *****	720
TtFC 834Cr ID4	ESRYEYELLGSQGRRCDSNGNWSGRPASCIPVCGRSDSPRSPFIWNGNSTEIGQWPWQAGI ESRYEYELLGSQGRRCDSNGNWSGRPASCIPVCGRSDSPRSPFIWNGNSTEIGQWPWQAGI *****	780
TtFC 834Cr ID4	SRWLADHNMWFLQCGGSLLNEKWIVTAAHCVTYSATAEIIDPSQFKIYLGKYYRDDS RDD SRWLADHNMWFLQCGGSLLNEKWIVTAAHCVTYSATAEIIDPNQFKMYLGKYYRDDS RDD *****	840
TtFC 834Cr ID4	DYVQVREALEIHVNPNYDPGNLNF DIALIQLKTPVTLTTRVQPICLPTDITTREHLKEGT DYVQVREALEIHVNPNYDPGNLNF DIALIQLKTPVTLTTRVQPICLPTDITTREHLKEGT *****	900
TtFC 834Cr ID4	LAVVTGWGLNENNTYSEMIQQAVLPVVAASTCEEYKEADLPLTVTENMFCAGYKKGRYD LAVVTGWGLNENNTYSEMIQQAVLPVVAASTCEEYKEADLPLTVTENMFCAGYKKGRYD *****	960
TtFC 834Cr ID4	ACSGDSGGPLVFADDSRTERRWVLEGIVSWGSPSGCGKANQYGGFTKVNVLFSWIRQFI ACSGDSGGPLVFADDSRTERRWVLEGIVSWGSPSGCGKANQYGGFTKVNVLFSWIRQFI *****	1019

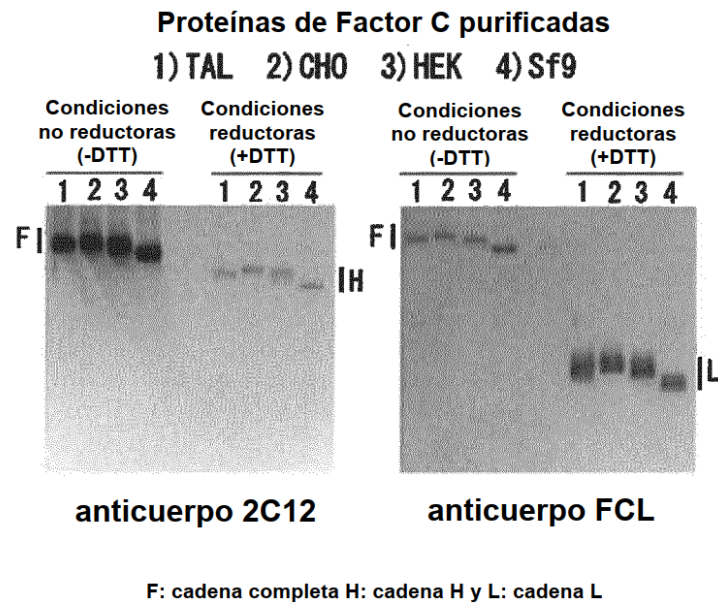
[Fig. 10]



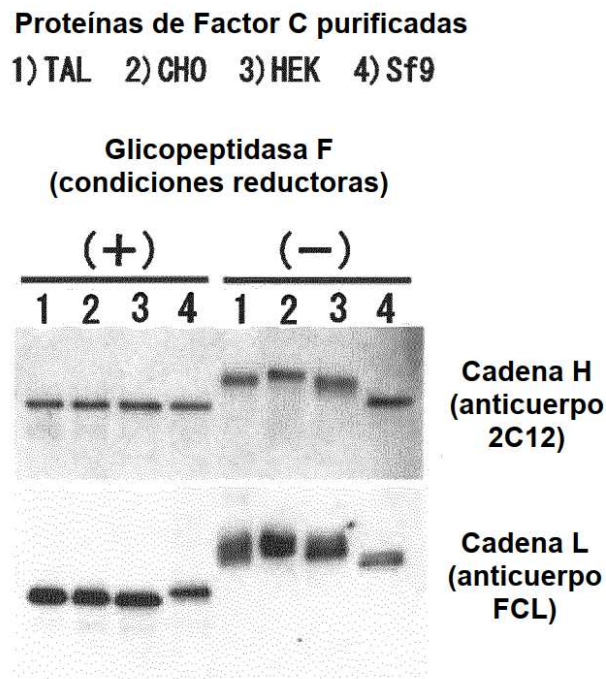
[Fig. 11]



[Fig. 12]



[Fig. 13]



[Fig. 14]

