

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 266**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2005** **E 05739312 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013** **EP 1746104**

54 Título: **Antígeno CD14 soluble novedoso**

30 Prioridad:

11.05.2004 JP 2004141600

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

06.06.2013

73 Titular/es:

MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
7, Yotsuya 1-chome Shinjuku-ku
Tokyo 160-8515, JP

72 Inventor/es:

FURUSAKO, SHOJI;
SHIRAKAWA, KAMON y
HIROSE, JIRO

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 406 266 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

Antígeno CD14 soluble novedoso

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un antígeno CD14 novedoso que puede servir como marcador de diagnóstico para septicemia. La invención también se refiere a un método para diagnosticar la septicemia caracterizado por someter a ensayo el antígeno. La invención se refiere además a un fragmento de CD14 soluble recombinante útil como sustancia patrón de un kit de ensayo y a un método para producir el fragmento.

Antecedentes de la técnica

- 10 Se nombró una molécula de CD14 como una proteína identificada por una familia de anticuerpos que reconocen glicoproteínas expresadas en la superficie de membrana de monocitos en la Third Leukocyte Typing Conference (Tercera Conferencia de Tipificación de Leucocitos), 1986. En 1990, Wright *et al.* dilucidaron que la molécula de CD14 es un receptor para LPS, endotoxina ("Science", vol. 249, págs. 1431-1433, 1990). La molécula de CD14 es una glicoproteína que tiene un peso molecular de 53-55 kDa, y análisis con el ADNc revelaron que ARNm de aproximadamente 1,4 kb tiene una secuencia codificante de 356 aminoácidos ("Nucleic Acids Research" (R.U.), vol. 16, pág. 4173, 1988).

- 15 Se notificó que las moléculas de CD14 humana incluyen moléculas de CD14 solubles además de moléculas de CD14 unidas a membrana y la sangre contiene moléculas de CD14 solubles que tienen diferentes pesos moleculares ("European Journal of Immunology" (Alemania), vol. 23, págs. 2144-2151, 1993). Además, Landmann *et al.* llevaron a cabo análisis de western blot con CD14 soluble en suero de pacientes que presentaban septicemia y notificaron que hay CD14 soluble de aproximadamente 55 kDa a altos niveles en pacientes con septicemia que no sobrevivieron y pacientes con hemoglobinuria nocturna paroxística (HNP) y que en sueros normales, no se detectó esta molécula sino que se detectó CD14 soluble de 49 kDa, un peso molecular ligeramente menor que el anterior ("The Journal of Infectious Disease" (EE.UU.), vol. 171, págs. 639-644, 1995).

- 20 Stelter *et al.* notificaron que la diferencia en las cadenas de azúcar está implicada en aquellos subtipos que tienen diferentes pesos moleculares y se encuentran dos subtipos de CD14 solubles que tienen diferentes pesos moleculares en sangre incluso tras la eliminación de cadenas de azúcar con unión a N y O ("European Journal of Biochemistry" (Alemania), vol. 236, págs. 457-464, 1996). Además, Bufler *et al.* llevaron a cabo el análisis del extremo C-terminal con CD14 soluble y notificaron que un GPI se anclaba a un residuo de serina en la posición 327 de CD14 soluble y que una molécula de CD14 soluble que tiene un peso molecular de aproximadamente 56 kDa es una de las especies moleculares a las que no se ancla el GPI ("European Journal of Immunology" (Alemania), vol. 25, págs. 604-610, 1995).

- 25 En lo que respecta a CD14 soluble de longitud completa recombinante y un fragmento del mismo, Juan *et al.* notificaron que un fragmento 1-152 N-terminal de CD14 humana tiene una función de transmitir señales de LPS a las células ("Journal of Biological Chemistry" (EE.UU.), vol. 278, págs. 1382-1387, 1995), pero no han tenido éxito en la expresión de un fragmento 1-124 N-terminal y un fragmento 1-98 N-terminal. Además, Majerle *et al.* notificaron que un fragmento 1-152 N-terminal de CD14 humana que incluye 3 unidades de una región de repetición rica en leucina (LRR) se repliega y un fragmento 1-134 N-terminal de CD14 humana que incluye sólo dos unidades de la región LRR no se repliega, y que no tuvieron éxito en la expresión de un fragmento 1-69 N-terminal ("Pflugers Arch-Europan Journal of Physiology" (Alemania), vol. 439 [supl.], págs. R109-R110, 2000), pero según el informe, no han tenido éxito en la expresión de un fragmento 1-69 N-terminal.

- 30 Los anticuerpos frente a moléculas de CD14 incluyen muchos anticuerpos anti-CD14, que se han preparado y usado en la identificación de proteínas CD14, tales como MEM-18 preparado por Bazil *et al.* ("European Journal of Immunology" (Alemania), vol. 16, págs. 1583-1589, 1986), RoMo-1 preparado por Shutt *et al.* ("Allergie und Immunologie" (Alemania), vol. 34, págs. 17-26, 1988), y 3C10 preparado por Steinman *et al.* ("Journal of Experimental Medicine" (EE.UU.), vol. 158, págs. 126-145, 1983).

- 35 Además, se ha informado sobre sistemas de ensayo de CD14 soluble usando esos anticuerpos por Shutt *et al.* (documento DE-286876-A), Bazil *et al.* ("Molecular Immunology" (R.U.), vol. 26, págs. 657-662, 1989) y Grunwald *et al.* ("Journal of Immunological Methods" (Holanda), vol. 155, págs. 225-232, 1992), que permiten el ensayo de CD14 soluble en líquido corporal humano.

- 40 Además, se han lanzado al mercado kits de ELISA para CD14 soluble de IBL-Hamburg, Medgenix y R & D Systems, y se ha realizado el ensayo de CD14 soluble para muchas enfermedades tales como septicemia ("Clinical Immunology And Immunopathology" (EE.UU.), vol. 80, págs. 307-310, 1996; y "Rinshokensa", vol. 38, págs. 341-344, 1994).

- 45 Sin embargo, se encontró que CD14 soluble no es un marcador específico para septicemia debido a los aumentos en los niveles de moléculas de CD14 solubles de aproximadamente 55 kDa y 49 kDa (de un informe a otro, los pesos moleculares son diferentes y no se limitan a aproximadamente 55 kDa y 49 kDa, y se aplicará lo mismo en la

siguiente descripción) dependiendo del grado de evolución de las enfermedades incluso en enfermedades a excepción de la septicemia ("Infection and Immunity" (EE.UU.), vol. 67, págs. 417-420, 1999; "Clinical and Experimental Immunology" (R.U.), vol. 120, págs. 483-487, 2000; y "Clinical Experimental Immunology" (R.U.), vol. 96, págs. 15-19, 1994). Además, se esperaba que la CD14 soluble fuese un marcador para la gravedad de la septicemia. Sin embargo, no se proporcionado la CD14 soluble como producto de diagnóstico para septicemia debido a que no hay correlación con el choque septicémico ("Pediatric allergy and immunology" (Dinamarca), vol. 8, págs. 194-199, 1997) y tampoco hay correlación con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) ("European Journal of Clinical Investigation" (R.U.), vol. 28, págs. 672-678, 1998).

Además, se ha descubierto la presencia de una molécula de CD14 soluble con un bajo peso molecular de aproximadamente 36 kDa en sangre además de otras tales como las dos clases de moléculas de CD14 solubles descritas anteriormente de aproximadamente 55 kDa y 49 kDa notificadas por Landmann *et al.* (CD14 de alto peso molecular (de un informe a otro, los pesos moleculares son diferentes y no se limitan a aproximadamente 55 kDa y 49 kDa, y se aplicará lo mismo en la siguiente descripción). También se ha descubierto la presencia de una pequeña cantidad de la CD14 de bajo peso molecular en un donante normal y de una cantidad aumentada de la CD14 de bajo peso molecular en pacientes que presentaban septicemia. Por consiguiente, se ha validado la eficacia clínica del ensayo con una CD14 de bajo peso molecular soluble. Como ensayo para la CD14 de bajo peso molecular soluble, existe una propuesta en la que se obtiene indirectamente el nivel de CD14 de bajo peso molecular en sangre restando el nivel de CD14 de alto peso molecular en sangre del nivel total de la CD14 soluble en sangre (publicación internacional WO 01/22085).

Descripción de la invención

Problemas que han de resolverse mediante la invención

En vista de tal situación, un antígeno *in vivo* novedoso que puede servir como marcador de diagnóstico para septicemia fácilmente detectable es muy esperado. También, un kit de ensayo y un método de ensayo para el antígeno usando un anticuerpo particular son muy esperados. Además, un método para cribar un anticuerpo que es útil en el ensayo del antígeno es esperado. Todavía más, un fragmento soluble recombinante que tiene la función inmunológica similar al antígeno así como su método de producción son esperados.

Medios para resolver los problemas

Tras una extensa investigación, los inventores de la presente invención encontraron un antígeno novedoso que tiene la secuencia de la CD14 en sangre humana, y también, un método para diagnosticar la septicemia o un método para detectar la septicemia que se logra sometiendo a ensayo el antígeno novedoso.

Los inventores también encontraron un fragmento soluble recombinante que tiene naturaleza inmunológica similar al antígeno, y un método para producir el fragmento, y también, un anticuerpo que se une específicamente al fragmento.

Además, los inventores encontraron un kit de ensayo y un método de ensayo que pueden someter a ensayo diversos antígenos, y el kit incluye como su constituyente "un anticuerpo que se une específicamente a un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos particular de la CD14 soluble de longitud completa humana" o un fragmento del mismo; "un anticuerpo producido usando el péptido que comprende una secuencia de aminoácidos particular de la CD14 soluble de longitud completa humana para el antígeno" o un fragmento del mismo; o "un anticuerpo que se une específicamente al fragmento" o un fragmento del mismo.

Los inventores también encontraron un método para cribar un anticuerpo que es eficaz para someter a ensayo el antígeno.

En la memoria descriptiva de la presente invención, un "antígeno CD14 soluble" también puede denominarse "proteína CD14 soluble". Con respecto al "fragmento de CD14 soluble recombinante", aunque también puede denominarse "proteína CD14 soluble recombinante", el término "fragmento" se usa en el presente documento para indicar que tiene una secuencia parcial de CD14 soluble de longitud completa humana. El término "fragmento" ha de entenderse como en el caso del término técnico general usado en la técnica. En la presente invención, el "fragmento" designa una parte de la proteína analito que comprende una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos de la proteína analito, y no se cuestiona la diferencia en la conformación de la proteína o en la adición de una cadena de azúcar o un lípido a la proteína analito.

La invención se define por las reivindicaciones.

A continuación, se describe la presente invención tal como se describió anteriormente, con mayor detalle.

La presente invención proporciona un antígeno CD14 soluble novedoso, un fragmento de CD14 soluble recombinante y un método novedoso para diagnosticar o detectar septicemia tal como se describe a continuación.

(1) Un antígeno CD14 soluble novedoso de los siguientes puntos (1-1) o (1-2).

(1-1) Un antígeno CD14 soluble que tiene los siguientes rasgos característicos 1) a 3):

1) un peso molecular de 13 ± 2 kDa cuando se mide mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras;

2) una secuencia de aminoácidos en la que está presente la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 en su extremo N-terminal; y

3) capacidad para unirse específicamente a un anticuerpo preparado usando el péptido que comprende 16 residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO:2 para el antígeno.

(1-2) Un antígeno CD14 soluble del punto (1-1) que también tiene el siguiente rasgo característico 4):

4) que puede obtenerse de plasma humano.

(2) Un método para diagnosticar septicemia de uno cualquiera de los siguientes puntos (2-1) a (2-4).

(2-1) Un método para diagnosticar o detectar septicemia en el que se somete a ensayo el antígeno CD14 soluble del punto anterior (1).

(2-2) Un método para diagnosticar o detectar septicemia del punto anterior (1) comprendiendo el método las siguientes etapas de:

1) someter a ensayo el antígeno CD14 soluble del punto anterior (1) en la sangre recogida de un sujeto;

2) comparar el valor sometido a ensayo con el valor habitual para un donante normal; y

3) evaluar si el sujeto tiene septicemia.

(2-3) Un método para diagnosticar o detectar septicemia del punto anterior (1) en el que la etapa 1) de someter a ensayo el antígeno CD14 soluble se logra mediante un inmunoensayo.

(2-4) Un método para diagnosticar o detectar septicemia del punto anterior (1) en el que la etapa 1) de someter a ensayo el antígeno CD14 soluble se logra mediante un inmunoensayo de tipo sándwich.

Esta invención también proporciona el siguiente método particular para producir el fragmento de CD14 soluble recombinante de la presente invención.

(3) Un método de uno cualquiera de los siguientes puntos (3-1) a (3-3) para producir el fragmento de CD14 soluble recombinante, que consiste en una secuencia de aminoácidos desde una cualquiera de las posiciones 1 a 17 hasta una cualquiera de las posiciones 59 a 90 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, teniendo dicho fragmento de CD14 soluble recombinante los siguientes rasgos característicos 1) a 3):

1) un peso molecular de 13 ± 2 kDa cuando se mide mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras;

2) sin capacidad para unirse específicamente al anticuerpo 3C10 y el anticuerpo MEM-18; y

3) capacidad para unirse específicamente a un anticuerpo, que se une a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, preparándose el anticuerpo usando dicho péptido como antígeno.

(3-1) Un método para producir el fragmento de CD14 soluble recombinante de lo anterior que comprende las etapas de:

(i) producir un fragmento de CD14 soluble recombinante que tiene la secuencia caracterizada por los siguientes puntos 1) a 4):

1) un fragmento que tiene una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 3, o un fragmento que tiene tal secuencia parcial en la que se han deletado, añadido o sustituido de 1 a 10 aminoácidos en la región distinta a las posiciones 53 a 68 de SEQ ID NO: 3;

2) el extremo N-terminal es una cualquiera de las posiciones 1 a 17 de SEQ ID NO: 3;

3) el extremo C-terminal es una cualquiera de las posiciones 134 a 356 de SEQ ID NO: 3;

4) se ha incorporado una secuencia de un sitio de escisión para una proteasa predeterminada en el sentido de 3' de una cualquiera de las posiciones 59 a 70 de SEQ ID NO: 3 mediante sustitución o inserción;

(ii) escindir el fragmento de CD14 soluble recombinante preparado en (i) con la proteasa predeterminada; y

(iii) recuperar el fragmento del lado N-terminal escindido en ii).

(3-2) Un método del punto anterior (12-1) para producir el fragmento de CD14 soluble recombinante de lo anterior, en el que, en la etapa (i)4), la proteasa predeterminada es la proteasa PreScission, y la secuencia del sitio de escisión es Leu, Glu, Val, Leu, Phe, Gln, Gly, Pro.

5 (3-3) Un método del punto anterior (12-1) para producir el fragmento de CD14 soluble recombinante de lo anterior, en el que, en la etapa (i)4), la proteasa predeterminada es trombina, y la secuencia del sitio de escisión es Leu, Val, Pro, Arg, Gly, Ser.

Efectos de la invención

10 El antígeno CD14 soluble novedoso de la presente invención es útil como marcador para diagnosticar un paciente con septicemia. Este antígeno CD14 soluble también es útil como sustancia patrón o sustancia competitiva usada para someter a ensayo el antígeno CD14 soluble.

El fragmento de CD14 soluble recombinante de la presente invención tiene rasgos característicos que se asemejan inmunológicamente a los del antígeno CD14 soluble, y por tanto, puede usarse como sustancia patrón o sustancia competitiva para someter a ensayo el antígeno CD14 soluble, y también puede usarse en el cribado de anticuerpos que pueden usarse para someter a ensayo el antígeno CD14 soluble.

15 Por "semejanza inmunológica de los rasgos característicos con el antígeno CD14 soluble", quiere decirse que el fragmento de CD14 soluble recombinante de la presente invención tiene la capacidad de unión con el anticuerpo contra CD14 conocido y la capacidad de unión con un anticuerpo que se une al antígeno CD14 soluble que concuerdan sustancialmente con el antígeno CD14 soluble.

20 Además, el kit de ensayo y el método de ensayo para el antígeno CD14 soluble descritos en el presente documento pueden llevar a cabo un ensayo cuantitativo o cualitativo específico a alta sensibilidad de manera conveniente, y son útiles en el diagnóstico de pacientes con septicemia.

Además, el método de cribado descrito en el presente documento es útil en la búsqueda de anticuerpos que pueden usarse para someter a ensayo el antígeno CD14 soluble.

25 Además, el método para producir el fragmento de CD14 soluble recombinante de la presente invención ha permitido la producción del fragmento de CD14 soluble recombinante, cuya expresión había sido imposible en células procariotas o eucariotas, y en particular, en células de levadura.

Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 indica el resultado de que sólo el péptido S68 impide la unión del anticuerpo policlonal contra el péptido S68 y el antígeno CD14 soluble de la presente invención. (A) muestra el estado sin unión en el suero de un donante normal, y (B) muestra la inhibición de la unión por el péptido S68 en el suero de un paciente con septicemia.

La figura 2 muestra la curva patrón del kit de EIA del ejemplo 7-(1) usando la proteína sCD14(1-307)S286C.

La figura 3 muestra que el antígeno CD14 soluble del suero de un donante normal no afecta a la medición del kit de EIA del ejemplo 7-(1) usando la proteína sCD14(1-307)S286C.

35 La figura 4 muestra los resultados del análisis para el antígeno CD14 soluble y la proteína CD14 de alto peso molecular que pueden detectarse a partir de la sangre de un paciente con septicemia mediante el kit de EIA del ejemplo 7-(1). Se fracciona la sangre de un paciente con septicemia mediante cromatografía de filtración en gel, y se analiza mediante el kit de EIA del ejemplo 7-(1) y un kit de CD14-EIA disponible comercialmente (IBL-Hamburg).

40 La figura 5 muestra el resultado del análisis del antígeno CD14 soluble y la proteína CD14 de alto peso molecular que puede detectarse a partir de la sangre de un paciente con septicemia mediante el kit de EIA del ejemplo 7-(1). Se fracciona la sangre de un paciente con septicemia mediante cromatografía de filtración en gel, y se analiza mediante el kit de EIA del ejemplo 7-(1) y un kit de CD14-EIA disponible comercialmente (IBL-Hamburg). Las flechas continuas en la parte superior del gráfico indican las posiciones de los marcadores usados para calibración que son, desde la izquierda, BSA, ovoalbúmina, quimotripsinógeno A y ribonucleasa A.

45 La figura 6 muestra el resultado del análisis del antígeno CD14 soluble y la proteína CD14 de alto peso molecular detectados a partir de la sangre de un paciente con septicemia mediante el kit de EIA del ejemplo 7-(1). Se fraccionó el suero de un paciente con septicemia mediante columna con anticuerpo contra S68-Sepharose™ 4FF usando F1024-1-3-Sepharose™ 4B para la preclumna, y se fraccionaron adicionalmente las fracciones mediante cromatografía de filtración en gel. Entonces se analizaron las fracciones mediante el kit de EIA del ejemplo 7-(1) y un kit de CD14-EIA disponible comercialmente (IBL-Hamburg). Las flechas continuas en la parte superior del gráfico indican las posiciones de los marcadores usados para calibración que son, desde la izquierda, BSA, ovoalbúmina, quimotripsinógeno A y ribonucleasa A.

50 La figura 7 muestra el resultado de western blot de las fracciones liofilizadas 10-16 obtenidas mediante la cromatografía de filtración en gel descrita en la figura 6.

La figura 8 muestra el resultado de western blot de las fracciones liofilizadas 10-16 obtenidas mediante la cromatografía de filtración en gel tras hacer pasar el suero de un donante normal a través de una precolumna de F1024-1-3-Sepharose™ 4B y columna con anticuerpo contra S68-Sepharose™ 4FF.

5 La figura 9 es la imagen de rsCD14-ST(2ST64) y (PSP64) purificados que se sometieron a electroforesis mediante SDS-PAGE y se tiñeron con tinción de plata.

La figura 10 es la imagen de western blot de sCD14-ST y PSP64 teñidos con anticuerpo contra S68.

La figura 11 muestra la curva patrón para el kit de EIA del ejemplo 16 usando rsCD14-ST(2ST64).

La figura 12 es una vista que compara el título de anticuerpos del antisero del conejo al que se le administró rsCD14-ST(PSP64) con el del suero de un conejo normal.

10 La figura 13 muestra la curva patrón para el sistema de EIA del ejemplo 19 usando rsCD14-ST(2ST64).

Mejor modo para llevar a cabo la invención

A continuación, se describe la presente invención con mayor detalle.

15 Las proteínas CD14 solubles principales que se encuentran en sangre humana incluyen proteínas CD14 solubles con los tamaños de aproximadamente 55 kDa y aproximadamente 49 kDa notificadas por Landmann *et al.* tal como se describe en la sección de antecedentes de la técnica. Estas proteínas son respectivamente la proteína CD14 soluble de longitud completa humana y la proteína CD14 soluble de longitud completa humana de la que sólo se han deletado 41 aminoácidos del extremo C-terminal. (Estas proteínas se denominan a veces, a continuación en el presente documento, la "CD14 de alto peso molecular" sin indicar "humana"). La unión específica de estos CD14 de alto peso molecular con el anticuerpo F1025-3-1 se confirma en el documento WO01/22085.

20 Además de esta CD14 de alto peso molecular tal como se mencionó anteriormente, también se describe una proteína que es una CD14 de bajo peso molecular con el peso molecular de 36 kDa.

25 Los inventores de la presente invención han encontrado una proteína CD14 soluble novedosa que es diferente tanto de la CD14 de alto peso molecular tal como se describió anteriormente como de la CD14 con el peso molecular de 36 kDa tal como se describe en el documento WO01/22085, y esta proteína CD14 soluble novedosa existe en un mayor contenido en la sangre de un paciente con septicemia en comparación con la sangre de un donante normal.

El término "proteína CD14 soluble" usado en el presente documento designa una proteína que se encuentra en plasma humano (o suero humano), que también puede denominarse "proteína CD14 en forma soluble". El término "proteína CD14 soluble" se usa particularmente en comparación con la "proteína CD14 de unión a membrana" que se une a la membrana celular y que no está presente en el plasma humano.

30 "El anticuerpo producido usando un péptido o su fragmento o similar para el antígeno" o "el anticuerpo producido usando un péptido o su fragmento o similar como antígeno" descrito en la presente invención es un anticuerpo que es o que se ha producido inmunizando diversos animales con un péptido o su fragmento para el "antígeno". El péptido o su fragmento usado como "antígeno" constituirían entonces el epítipo o una parte del epítipo del anticuerpo, y el anticuerpo se uniría específicamente al péptido o su fragmento usado para el "antígeno".

35 Con respecto a "el anticuerpo producido (usando...) para el antígeno" o "el anticuerpo que se ha producido (usando...) para el antígeno", un anticuerpo producido usando un inmunógeno que es un péptido que tiene un portador o una proteína transportadora añadido al mismo o un péptido que tiene otros residuos de aminoácido añadidos al mismo para conferir la inmunogenicidad al péptido usado para el "antígeno" también está incluido en el concepto de "el anticuerpo producido (usando...) para el antígeno" o "el anticuerpo que se ha producido (usando...) para el antígeno", siempre que tenga los rasgos característicos tal como se describió anteriormente.

40 Un "anticuerpo que experimenta unión específica" significa un anticuerpo que se une inmunológicamente a una diana de unión específica, o un anticuerpo que experimenta una reacción antígeno-anticuerpo típica con la diana de unión específica. Por ejemplo, la aparición de una reacción antígeno-anticuerpo puede confirmarse mediante un ensayo de aglutinación, ensayo de tipo sándwich, ensayo directo en fase sólida, ensayo de unión en fase sólida, ensayo competitivo, o similar. Cuando la unión entre el "anticuerpo que experimenta unión específica" y su diana de unión específica se representa en cuanto a la afinidad, la constante de disociación (KD) sería normalmente menor que 10^{-7} M. Cuando no puede obtenerse una medición de la constante de disociación en una prueba de unión, entonces se indica el resultado como "sin unión sustancial". Cuando sólo se confirma unión no específica y la capacidad de unión es menor que en el caso de "unión específica" en un factor o 10 o menos, 100 o menos, y preferiblemente 1.000 o menos, el resultado también se indica como "sin unión sustancial".

"Sin unión con LPS" significa que el fragmento de CD14 soluble recombinante no tiene o tiene poca capacidad de unión con el LPS. La CD14 de longitud completa en el organismo vivo o la proteína CD14 soluble de longitud completa humana descrita en SEQ ID NO: 3 tiene capacidad de unión con el LPS en el organismo vivo o en el suero, y el complejo activa la célula. La capacidad de unión del fragmento de CD14 soluble recombinante que "no se

une con LPS" es 1/100 o incluso menor en comparación con la de la CD14 de longitud completa en el organismo vivo o la proteína CD14 soluble de longitud completa humana descrita en SEQ ID NO: 3 con el LPS.

<Primer aspecto>

El primer aspecto de la presente invención es un antígeno CD14 soluble que tiene los siguientes rasgos característicos 1) a 3):

1) un peso molecular de 13 ± 2 kDa cuando se mide mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras;

2) una secuencia de aminoácidos en la que está presente la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 en su extremo N-terminal; y

3) capacidad para unirse específicamente a un anticuerpo preparado usando el péptido que comprende 16 residuos de aminoácidos descritos en SEQ ID NO:2 para el antígeno.

El antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención tiene el rasgo característico 1) tal como se mencionó anteriormente. En SDS-PAGE llevada a cabo en condiciones no reductoras, se detecta una banda correspondiente al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención en la posición correspondiente al peso molecular de 13 ± 2 kDa.

Para ser más específicos, cuando se calcula el peso molecular usando los patrones de doble color Precision plus protein™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.) en SDS-PAGE al 12,5% en condiciones no reductoras, se detecta una banda en una posición correspondiente al peso molecular de 13 ± 2 kDa.

El antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención tiene el rasgo característico 2) tal como se mencionó anteriormente. La secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 1 concuerda con la secuencia de aminoácidos N-terminal de la CD14 humana descrita en SEQ ID NO: 3, y esto confirma que el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención es un tipo de la CD14 humana.

El antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención tiene el rasgo característico 3) tal como se mencionó anteriormente. El péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO:2 descrita en el rasgo característico 3) corresponde a 16 residuos de aminoácido en las posiciones 53 a 68 de la CD14 humana descrita en SEQ ID NO: 3. Actualmente, no se conoce ninguna proteína humana que incluya la secuencia de SEQ ID NO: 2 sino por la CD14 humana, y tal secuencia puede considerarse como una secuencia incluida específicamente en la CD14 humana. Esto también confirma que el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención es un tipo de la CD14 humana.

Preferiblemente, el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención también tiene el siguiente rasgo característico 4):

4) puede obtenerse a partir de plasma humano.

El antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención caracterizado por el rasgo 4) es una proteína que se encuentra en plasma humano. El antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención puede obtenerse a alta pureza mediante el método de purificación tal como se describe a continuación. Además, puesto que el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención está presente a alta concentración en el paciente con septicemia, puede usarse como marcador el diagnóstico o la detección de la septicemia.

El antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención puede servir como sustancia patrón o sustancia competitiva en el kit para someter a ensayo el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención que es útil en el diagnóstico o la detección de la septicemia.

A continuación, se describe la purificación del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención.

El antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención puede purificarse a partir de plasma humano o suero humano combinando cromatografía en columna de afinidad con anticuerpo relacionado con CD14 humana, cromatografía de filtración en gel y SDS-PAGE. El antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención fraccionado mediante la cromatografía en columna puede detectarse a alta eficacia usando el kit de ensayo según el quinto aspecto de la presente invención que somete a ensayo el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención.

En este contexto, el anticuerpo relacionado con CD14 humana es un anticuerpo anti-CD14 humana o un anticuerpo frente al péptido derivado de la secuencia de aminoácidos de CD14 humana.

Por ejemplo, el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención puede separarse de la CD14 de alto peso molecular mediante una cromatografía de afinidad en la que se usa el anticuerpo F1025-3-1 o el

anticuerpo F1024-1-3 para el anticuerpo anti-CD14 humana. La CD14 de alto peso molecular se adsorberá entonces por el anticuerpo, y el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención se eluirá como la fracción inicial. El antígeno CD14 soluble puede separarse entonces de otras proteínas del suero mediante una cromatografía de afinidad usando un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2.

El antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención se adsorbe al anticuerpo, y el antígeno CD14 soluble adsorbido se eluirá de la columna cuando se acidifica el medio. Los hibridomas que producen el anticuerpo F1025-3-1 y el anticuerpo F1024-1-3 se han depositado internacionalmente en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (Instituto Administrativo Independiente), Organismo Internacional para el Depósito de Patentes (IPOD) (Chuo-dairoku, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón) con el n.º de registro FERM BP-7296 y el n.º de registro FERM BP-7511 tal como se describe en los documentos WO01/22085 y WO01/72993, respectivamente.

El antígeno CD14 soluble en el suero puede separarse de otras proteínas mediante una cromatografía de afinidad usando un anticuerpo policlonal anti-CD14 humana. Entonces, el antígeno CD14 soluble puede separarse de la CD14 de alto peso molecular mediante una cromatografía de afinidad usando el anticuerpo monoclonal anti-CD14 humana.

El antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención también puede purificarse adicionalmente sometiendo el suero humano o la fracción purificada parcialmente mediante la cromatografía de afinidad tal como se describió anteriormente para la cromatografía de filtración en gel. En este caso, el kit de ensayo según el quinto aspecto de la presente invención puede usarse tal como se describió anteriormente para recoger la fracción a partir de la que se detecta el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención. Una fracción correspondiente al peso molecular de 35 ± 10 kDa también puede recogerse usando un marcador de peso molecular.

La fracción purificada parcialmente tal como se describió anteriormente también puede someterse a SDS-PAGE en condiciones no reductoras para recoger la parte correspondiente a 13 ± 2 kDa para la purificación adicional. La fracción así recogida contiene el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención purificado en un alto grado como su proteína principal.

Puede obtenerse una pureza incluso mayor llevando a cabo adicionalmente la purificación mediante cromatografía en columna de intercambio aniónico, cromatografía de fase inversa, isoelectroenfoque, o similar. Por ejemplo, en una cromatografía en columna de intercambio aniónico a pH 8,5, el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención se eluye a una fuerza iónica de aproximadamente 0,3 M.

<Segundo aspecto>

El segundo aspecto de la presente invención es un fragmento de CD14 soluble recombinante que tiene los siguientes rasgos característicos 1) a 3):

1) un peso molecular de 13 ± 2 kDa cuando se mide mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras;

2) sin capacidad para unirse específicamente a 3C10 o MEM-18; y

3) capacidad para unirse específicamente a un anticuerpo preparado usando el péptido que comprende 16 residuos de aminoácidos descritos en SEQ ID NO:2 para el antígeno.

Los ejemplos del fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención incluyen los fragmentos de CD14 soluble recombinante que tienen las secuencias caracterizadas por los siguientes puntos 5) a 7):

5) un fragmento que tiene una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 3, o un fragmento que tiene tal secuencia parcial en la que se han deletado, añadido o sustituido de 1 a 10 aminoácidos en la región distinta a las posiciones 53 a 68 de SEQ ID NO: 3;

6) el extremo N-terminal es una cualquiera de las posiciones 1 a 17 de SEQ ID NO: 3; y

7) el extremo C-terminal es una cualquiera de las posiciones 59 a 90 en SEQ ID NO: 3.

De estos fragmentos de CD14 soluble recombinante a modo de ejemplo, se prefiere aquél en el que, en el punto 6), el extremo N-terminal es una cualquiera de las posiciones 1 a 6 de SEQ ID NO: 3, y se prefiere más aquél en el que el extremo N-terminal es la posición 1 de SEQ ID NO: 3.

También se prefieren los fragmentos de CD14 soluble recombinante en los que, en el punto 7), el extremo C-terminal es una cualquiera de las posiciones 59 a 80 de SEQ ID NO: 3, y se prefiere más aquél en el que el extremo C-terminal es una cualquiera de las posiciones 64 a 75 de SEQ ID NO: 3, e incluso se prefiere más aquél en el que el extremo C-terminal es la posición 64 de SEQ ID NO: 3.

Se prefiere particularmente el fragmento de CD14 soluble recombinante de uno cualquiera de los puntos anteriores (2-3) a (2-5) en los que, en el punto 6), el extremo N-terminal es la posición 1 de SEQ ID NO: 3, y el extremo C-terminal es la posición 64 de SEQ ID NO: 3.

5 También se prefiere particularmente el fragmento de CD14 soluble recombinante en el que el fragmento del punto 5) es un fragmento que tiene una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 3.

A continuación, se describe el método para producir el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención mediante medios de ingeniería genética. Sin embargo, el método no está limitado particularmente, y puede emplearse cualquier método usado comúnmente en la técnica.

10 La secuencia de nucleótidos del ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos del fragmento de la presente invención no se limita a una secuencia puesto que, tal como se conoce en la técnica, el gen que codifica para un aminoácido puede comprender de 1 a 6 tipos diferentes de tripletes de ADN (codones) dependiendo del tipo del aminoácido. Por tanto, la secuencia de nucleótidos del gen no está limitada siempre que el gen comprenda la secuencia de nucleótidos que codifica para el fragmento de la presente invención. El gen también puede comprender un ADNc, un ADN cromosómico, una combinación de los mismos, o un ADNc que contiene un intrón
15 que puede someterse a corte y empalme de manera adecuada. Sin embargo, el gen es preferiblemente un ADNc en vista de la comodidad de manipulación en los procesos de ingeniería genética.

20 El gen no está limitado para su procedimiento de producción. Por ejemplo, el gen puede ser el producido mediante síntesis química, el obtenido a partir de una biblioteca de ADN adecuada, o el producido mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usando un ADN que comprende el ADN del gen que codifica para la longitud completa o una parte de la CD14 para el molde. El gen también puede ser el producido mediante hibridación o ligamiento del gen o su fragmento producido mediante tales medios.

25 El ADN del gen puede sintetizarse químicamente tal como se describe a continuación dividiendo el ADN del gen en fragmentos de aproximadamente 20 a 30 nucleótidos y sintetizando estos fragmentos mediante un sintetizador de ADN (por ejemplo, modelo 394 fabricado por Applied Biosystems), fosforilando el extremo 5'-terminal de los fragmentos si se desea e hibridando los fragmentos, y ligando los fragmentos hibridados para obtener de ese modo el ADN diana.

30 El gen también puede obtenerse mediante un proceso de PCR usando una biblioteca genómica o una biblioteca de ADNc para el molde. Cuando se emplea un proceso de PCR, se preparan un cebador sentido y un cebador antisentido diseñados basándose en una secuencia de nucleótidos conocida y la secuencia de nucleótidos del ADN o similar que codifica para el fragmento de la presente invención o un fragmento que tiene un sitio de escisión de proteasa insertado o sustituido (denominado a veces a continuación en el presente documento "fragmento de la presente invención o similar"), y si se desea, una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción, y se lleva a cabo la PCR para cualquier biblioteca de ADN particular según el método conocido en la técnica (véase Michael Al. *et al.* ed., Polymerase Chain Reaction, PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, 1990, Academic Press). La biblioteca de ADN usada no está limitada particularmente siempre que contenga el ADN del gen o una parte del mismo. Por tanto, la biblioteca de ADN usada puede ser una biblioteca de ADN disponible comercialmente, o la preparada produciendo ADNc según el método de Sambrook, J. *et al.* a partir de linfocitos de sangre periférica humana o similar, línea celular humana o hibridoma opcionalmente tras activación con un agente activante adecuado. La secuencia de nucleótidos del ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos del fragmento de la presente invención o similar no se limita a una secuencia puesto que, tal como se conoce en la técnica, pueden estar presentes de 1 a 6 tripletes (codones) del ADN del gen por aminoácido dependiendo del tipo del aminoácido. Por tanto, el gen puede comprender cualquier secuencia de nucleótidos siempre que el gen comprenda la secuencia de nucleótidos que codifica para el fragmento de la presente invención o similar.

45 El vector recombinante puede ser un vector de cualquier forma incluyendo circular, lineal, monocatenaria, bicatenaria, y una combinación de las mismas, y el vector usado puede seleccionarse de manera adecuada según el uso pretendido. En vista de la comodidad de manipulación y facilidad de incorporación en el huésped, el vector es preferiblemente un vector circular, y en vista de la estabilidad, el vector es preferiblemente bicatenario.

50 El "fragmento de CD14 soluble recombinante" es un fragmento soluble producido mediante manipulación genética que tiene una secuencia parcial de aminoácidos de la proteína CD14 de longitud completa humana descrita en SEQ ID NO: 3.

El fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención tiene el rasgo característico 1) tal como se describió anteriormente. Es decir, se detecta una banda correspondiente al fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención en SDS-PAGE llevada a cabo en condiciones no reductoras en la posición correspondiente a un peso molecular de 13 ± 2 kDa.

55 Más específicamente, cuando se determina el peso molecular usando los patrones de doble color Precision plus protein™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.) en SDS-PAGE al 12,5% llevada a cabo en condiciones no reductoras, se detecta una banda en la posición del peso molecular de 13 ± 2 kDa.

El fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención tiene el rasgo característico 2) tal como se describió anteriormente. Es decir, no tiene capacidad para unirse específicamente a 3C10 o MEM-18.

Por "sin capacidad para unirse específicamente a 3C10 o MEM-18", quiere decirse que el fragmento de CD14 soluble recombinante no experimenta unión inmunológica, ni reacción antígeno-anticuerpo convencional. El fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención que no tiene "capacidad para unirse específicamente a 3C10 o MEM-18" muestra una capacidad de unión a 3C10 y MEM-18 que es de 1/100 o menos, y preferiblemente de 1/1.000 o menos en comparación con la de la CD14 de longitud completa que se encuentra en el organismo vivo o la proteína CD14 soluble recombinante de longitud completa humana descrita en SEQ ID NO: 3.

El fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención tiene el rasgo característico 3) tal como se describió anteriormente, y en particular, se une específicamente a un anticuerpo policlonal. El péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2 descrito en el rasgo característico 3) corresponde a 16 residuos de aminoácido en las posiciones 53 a 68 de la CD14 humana descrita en SEQ ID NO: 3. Puesto que el anticuerpo policlonal reconoce una secuencia que tiene una longitud de al menos 7 aminoácidos (véase el ejemplo 4 tal como se describirá más adelante), el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto al menos incluye una secuencia de 7 aminoácidos consecutivos seleccionados de las posiciones 53 a 68 de la CD14 humana descrita en SEQ ID NO: 3.

3C10 y MEM-18 son anticuerpos anti-CD14 bien conocidos. Se diseña que el epítipo en la CD14 sean las posiciones 7 a 14 y las posiciones 57 a 64, respectivamente, y el fragmento de CD14 soluble recombinante derivado de la CD14 humana convencional se unirá a 3C10 y MEM-18 siempre que la región epitópica esté incluida en la secuencia.

El fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención tiene los rasgos característicos 1) a 3) tal como se describió anteriormente, y por consiguiente, tiene propiedades físicas y naturaleza inmunológica similares a las del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención. En particular, se estima a partir de la similitud en la naturaleza inmunológica que el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención tiene una conformación de la secuencia de residuos de aminoácido que puede servir como epítipo similar al del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención. Por tanto, el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención es particularmente útil como sustancia patrón para someter a ensayo el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención. Aunque se ha usado generalmente un polipéptido recombinante que tiene los aminoácidos de las posiciones 1 a 307 en el extremo N-terminal de CD14 humana en el que se ha sustituido la serina en la posición 286 por cisteína (denominado a continuación en el presente documento el "rsCD14(1-307)S286C") como la sustancia patrón para someter a ensayo el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención, el uso del fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención es práctico para convertir la reacción inmunológica en la cantidad de sustancia debido al peso molecular similar. Además, el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención presenta reactividad similar a la del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención en diferentes condiciones de disolvente. Por ejemplo, aunque el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención y rsCD14(1-307)S286C muestran diferente reactividad inmunológica para la muestra de sangre citrada y sangre con EDTA, la reactividad inmunológica concuerda entre el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención y el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención. De manera similar, el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención también es útil como análogo para someter a ensayo el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención mediante un método competitivo.

Además, puesto que el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención tiene naturaleza inmunológica similar a la del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención, puede usarse como diana de unión específica en el cribado de un anticuerpo que puede usarse para someter a ensayo el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención. Puede lograrse un ensayo de este tipo, naturalmente, usando el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención para la diana de unión específica. Sin embargo, el antígeno CD14 soluble está presente en el organismo vivo sólo en una cantidad mínima, y por tanto, el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención serviría como sustituto particularmente útil.

Tal como se describió anteriormente, el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención es útil para diversas aplicaciones, y esta utilidad puede atribuirse a los rasgos característicos 1) a 3). En otras palabras, el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención que tiene los rasgos característicos 1) a 3) no se representa mediante su secuencia sino mediante la función que incluye las propiedades físicas y la naturaleza inmunológica del fragmento de CD14.

El fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención tiene además el rasgo característico de que no se une a LPS. Aunque no está incluida ninguna indicación específica en el

documento WO96/20956, da a conocer un péptido que contiene de 8 a 60 aminoácidos incluyendo las posiciones 57 a 64 de la CD14 humana y que se une a LPS. Este péptido y el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención no son idénticos, tal como se entiende claramente por el hecho de que el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención tiene el rasgo característico 4) tal como se describió anteriormente.

Los ejemplos del fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención incluyen los fragmentos de CD14 soluble recombinante que tienen las secuencias caracterizadas por los siguientes puntos 5) a 7):

5) un fragmento que tiene una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 3, o un fragmento que tiene tal secuencia parcial en la que se han delecionado, añadido o sustituido de 1 a 10 aminoácidos en la región distinta a las posiciones 53 a 68 de SEQ ID NO: 3;

6) el extremo N-terminal es una cualquiera de las posiciones 1 a 17 de SEQ ID NO: 3; y

7) el extremo C-terminal es una cualquiera de las posiciones 59 a 90 en SEQ ID NO: 3.

De estos fragmentos de CD14 soluble recombinante a modo de ejemplo, se prefiere aquél en el que, en el punto 6), el extremo N-terminal es una cualquiera de las posiciones 1 a 6 de SEQ ID NO: 3, y se prefiere más aquél en el que el extremo N-terminal es la posición 1 de SEQ ID NO: 3.

También se prefieren los fragmentos de CD14 soluble recombinante en los que, en el punto 7), el extremo C-terminal es una cualquiera de las posiciones 59 a 80 de SEQ ID NO: 3, y se prefiere más aquél en el que el extremo C-terminal es una cualquiera de las posiciones 64 a 75 de SEQ ID NO: 3, e incluso se prefiere más aquél en el que el extremo C-terminal es la posición 64 de SEQ ID NO: 3.

Se prefiere particularmente el fragmento de CD14 soluble recombinante de uno cualquiera del punto anterior (2-3) a (2-5) en el que, en el punto 6), el extremo N-terminal es la posición 1 de SEQ ID NO: 3, y el extremo C-terminal es la posición 64 de SEQ ID NO: 3.

También se prefiere particularmente el fragmento de CD14 soluble recombinante en el que el fragmento del punto 5) es un fragmento que tiene una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 3.

A continuación, se describe el método para producir el fragmento de la presente invención mediante medios de ingeniería genética. Sin embargo, el método no está limitado particularmente, y puede emplearse cualquier método usado comúnmente en la técnica.

La secuencia de nucleótidos del ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos del fragmento de la presente invención no se limita a una secuencia puesto que, tal como se conoce en la técnica, pueden estar presentes de 1 a 6 tripletes (codones) del ADN del gen para un aminoácido dependiendo del tipo del aminoácido. Por tanto, el gen puede comprender cualquier secuencia de nucleótidos siempre que el gen comprenda la secuencia de nucleótidos que codifica para el fragmento de la presente invención. El gen también puede comprender un ADNc, un ADN cromosómico, una combinación de los mismos, o un ADNc que contiene un intrón que puede someterse a corte y empalme de manera adecuada. Sin embargo, el gen es preferiblemente un ADNc en vista de la comodidad de manipulación en los procesos de ingeniería genética.

El gen no está limitado para su procedimiento de producción. Por ejemplo, el gen puede ser el producido mediante síntesis química, el obtenido a partir de una biblioteca de ADN adecuada, o el producido mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usando un ADN que comprende el ADN del gen que codifica para la longitud completa de una parte de la CD14 para el molde. El gen también puede ser el producido mediante hibridación o ligamiento del gen o su fragmento producido mediante tales medios.

El ADN del gen puede sintetizarse químicamente tal como se describe a continuación dividiendo el ADN del gen en fragmentos de 20 a 30 nucleótidos y sintetizando estos fragmentos en un sintetizador de ADN (por ejemplo, modelo 394 fabricado por Applied Biosystems), fosforilando el extremo 5'-terminal de los fragmentos si se desea e hibridando los fragmentos, y ligando los fragmentos hibridados para obtener de ese modo el ADN diana.

El gen también puede obtenerse mediante un proceso de PCR usando una biblioteca genómica o una biblioteca de ADNc para el molde. Cuando se emplea un proceso de PCR, se preparan un cebador sentido y un cebador antisentido diseñados basándose en una secuencia de nucleótidos conocida y la secuencia de nucleótidos del ADN o similar que codifica para el fragmento de la presente invención o un fragmento que tiene un sitio de escisión de proteasa insertado o sustituido (denominado a veces a continuación en el presente documento "fragmento de la presente invención o similar"), y si se desea, una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción, y se lleva a cabo la PCR para cualquier biblioteca de ADN particular según el método conocido en la técnica (véase Michael Al. *et al.* ed., Polymerase Chain Reaction, PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, 1990, Academic Press). La biblioteca de ADN usada no está limitada particularmente siempre que contenga el ADN del gen o una parte del mismo. Por tanto, la biblioteca de ADN usada puede ser una biblioteca de ADN disponible comercialmente,

o la preparada produciendo ADNc según el método de Sambrook, J. *et al.* a partir de linfocitos de sangre periférica humana o similar, línea celular humana, o hibridoma opcionalmente tras activación con un agente activante adecuado. La secuencia de nucleótidos del ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos del fragmento de la presente invención o similar no se limita a una secuencia puesta que, tal como se conoce en la técnica, pueden estar presentes de 1 a 6 tripletes (codones) del ADN del gen por aminoácido dependiendo del tipo del aminoácido. Por tanto, el gen puede comprender cualquier secuencia de nucleótidos siempre que el gen comprenda la secuencia de nucleótidos que codifica para el fragmento de la presente invención o similar.

El vector recombinante puede ser un vector de cualquier forma incluyendo circular, lineal, monocatenaria, bicatenaria, o una combinación de las mismas, y el vector usado puede seleccionarse de manera adecuada según el uso pretendido. En vista de la comodidad de manipulación y facilidad de incorporación en el huésped, el vector es preferiblemente un vector circular, y en vista de la estabilidad, el vector es preferiblemente bicatenario.

La secuencia señal conectada puede seleccionarse de manera adecuada, y se prefiere la secuencia señal que codifica para el péptido señal que tiene la secuencia: Met Glu Arg Ala Ser Cys Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Val His Val Ser Ala de la CD14 humana (Goyer *et al.*, Nucl. Acid Research, vol. 16, página 4173, 1988).

Cuando el fragmento va a expresarse como un cuerpo de inclusión usando *E. coli* para el huésped, se prefiere la adición de metionina o un péptido que contiene metionina en el extremo N-terminal.

En vista del huésped, el vector recombinante preferible es aquél que transforma una célula animal, de levadura, u otra célula eucariota de modo que el fragmento de la presente invención o similar se expresa por la célula transformada. Por consiguiente, un vector recombinante preferible contiene al menos un codón de iniciación de la traducción, un codón de terminación y un gen marcador selectivo, así como una secuencia de poliadenilación; promotor de SV40, promotor de EF1 α o promotor de SR α que funciona en una célula animal, o promotor de AOX1 que funciona en levadura; origen de replicación de SV40; y similares.

El vector recombinante puede obtenerse mediante ligamiento del ADN génico con otro fragmento de ADN que comprende cualquier secuencia de nucleótidos deseada, o mediante la introducción del ADN génico en cualquier vector adecuado (véase Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning, a Laboratory Manual 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989).

Puede obtenerse el transformante mediante la introducción del vector recombinante en el organismo o la célula huésped.

El transformante es preferiblemente aquél que puede expresar el fragmento de la presente invención o similar, y lo más preferiblemente, aquél que puede expresar el fragmento de la presente invención o similar en un sobrenadante de cultivo. El uso de tal transformante facilitará la producción del fragmento de la presente invención o similar en una gran cantidad.

Se cultiva el transformante, y se llevan a cabo la amplificación génica y la inducción de la expresión génica según se desee. Entonces se recoge la mezcla cultivada para la purificación del fragmento de la presente invención o similar mediante una combinación adecuada de concentración, solubilización, diálisis, diversos procesos cromatográficos, y otros procesos.

La "mezcla cultivada" significa un transformante, un medio de cultivo que contiene el transformante, un sobrenadante de cultivo o un lisado celular.

El transformante producido mediante tal procedimiento de producción no está limitado particularmente siempre que exprese el fragmento de la presente invención o similar. Sin embargo, el transformante es preferiblemente aquél producido usando una célula seleccionada de células de mamífero tales como célula COS y célula CHO, de levadura y *E. coli*.

A continuación, se describen realizaciones del cultivo y la inducción de la expresión, y en estas realizaciones, se usó para el transformante *E. coli*, una célula de mamífero tal como célula CHO, o una levadura del género *Pichia*.

Cuando el transformante usado es *E. coli* que se ha transformado mediante una molécula de ADN recombinante que contiene el promotor trp, el transformante se cultiva de manera preliminar en medio L-Broth, y entonces se inocula en medio de cultivo M9-CA a una cantidad de 1/50 para cultivo a 37°C. Varias horas tras el inicio del cultivo, El valor de DO 550 alcanza de 1 a 4 (es decir, fase de crecimiento logarítmico), y entonces se añade ácido 3 β -indolacrilico hasta una concentración final de 10 μ g/ml para inducir de ese modo la expresión. Se continúa con el cultivo durante aproximadamente otros 1 a 2 días para obtener la mezcla cultivada que contiene la proteína diana.

Cuando el transformante usado es una levadura *Pichia* que se ha transformado mediante un vector recombinante que contiene el promotor de AOX1, el transformante se cultiva de manera preliminar en medio BMGY durante aproximadamente 2 días, y tras cambiar el medio de cultivo, se añade metanol para inducir la expresión. Se continúa con el cultivo a 30°C durante aproximadamente otros 1 a 2 días para obtener la mezcla cultivada que contiene la proteína diana.

Cuando el transformante usado es una célula de mamífero tal como célula CHO que se ha transformado mediante un vector recombinante que contiene el promotor de EF1 α , se cultiva el transformante en medio DMEM complementado con suero bovino fetal al 10%. Se inoculan las células a una concentración de aproximadamente 1 a 10 x 10⁴ células/ml, y se cultivan en las condiciones de 37°C y 5% de gas dióxido de carbono/95% de aire. Habitualmente, el cultivo alcanza la confluencia a los 2 a 3 días, y entonces, se sustituye el medio de cultivo por D-MEM libre de suero. Se continúa con el cultivo durante otros 2 a 3 días para obtener de ese modo la mezcla cultivada que contiene la proteína diana. Cuando la cantidad de la proteína diana producida es insuficiente, la producción puede potenciarse mediante la adición de metotrexato tal como se describió anteriormente para la amplificación génica para aumentar de ese modo la cantidad del producto.

El fragmento de la presente invención o similar puede purificarse a partir de la mezcla cultivada así obtenida mediante un método seleccionado de manera adecuada de los métodos usados comúnmente en la purificación de un fragmento, una proteína o un polipéptido. Más específicamente, puede seleccionarse y combinarse un método adecuado de los métodos usados comúnmente en la técnica tal como precipitación con sales, ultrafiltración, precipitación isoelectrica, filtración en gel, electroforesis, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía con anticuerpos y otros procesos de cromatografía de afinidad, cromatografía de adsorción y cromatografía de fase inversa, y si se desea, el producto puede purificarse además usando un sistema de HPLC o similar.

En el procedimiento de producción, el fragmento de la presente invención o similar también puede expresarse como una proteína de fusión con β -galactosidasa de *E. coli* u otro polipéptido. En tal caso, se requeriría una etapa adicional de escisión de tal proteína en algún punto de la purificación mediante tratamiento de la proteína de fusión con un reactivo químico tal como bromuro de cianógeno o hidroxilamina, o una enzima tal como proteasa.

Cuando el transformante usado es *E. coli*, y el fragmento de la presente invención o similar se produce como un cuerpo de inclusión que es una proteína insolubilizada, se requerirá una etapa adicional de solubilización del cuerpo de inclusión seguido por desnaturalización y replegamiento en algún punto de la purificación (Thomas, E. *et al.*, J. Molecular Biology, 87, 563-577, 1974).

Más específicamente, se lisa la célula y se centrifuga para recoger el sedimento. A continuación, se añade un tampón de solubilización que contiene urea o clorhidrato de guanidina, tensioactivo, glutatión oxidado y glutatión reducido a un contenido adecuado (por ejemplo, un tampón que contiene clorhidrato de guanidina 5 M, Tween 80 al 0,005%, Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), EDTA 5 mM, glutatión reducido 2 mM y glutatión oxidado 0,02 mM) al sedimento, y entonces se añade 2-mercaptoetanol para la desnaturalización. Entonces se dializa la mezcla frente a una disolución que es la misma que el tampón usado para la solubilización excepto por la ausencia del clorhidrato de guanidina para promover de ese modo el replegamiento. Cuando el fragmento se ha expresado como una proteína de fusión, la región de la proteína innecesaria se escinde tras el procedimiento tal como se describió anteriormente usando un reactivo químico tal como bromuro de cianógeno o una enzima tal como proteasa, y el producto se purifica además mediante un proceso cromatográfico adecuado.

Alternativamente, el fragmento de la presente invención puede sintetizarse químicamente mediante un método usado comúnmente en la técnica, y el fragmento producido mediante tal síntesis química también está dentro del alcance del fragmento de la presente invención. Por ejemplo, el fragmento puede producirse mediante síntesis en un sintetizador de péptidos disponible comercialmente, o sintetizando los fragmentos del fragmento de la presente invención, y ligando los fragmentos así sintetizados.

<Tercer aspecto>

El tercer aspecto descrito en el presente documento es un fragmento de CD14 soluble recombinante producido mediante las siguientes etapas i) a iii):

i) la etapa de producir un fragmento que tiene una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 3, o un fragmento que tiene tal secuencia parcial en la que se han delecionado, añadido o sustituido de 1 a 10 aminoácidos en la región distinta a las posiciones 53 a 68 de SEQ ID NO: 3, en la que se ha sustituido o insertado un sitio de escisión para una proteasa predeterminada;

ii) la etapa de escindir el fragmento de CD14 soluble recombinante producido en i) con la proteasa predeterminada; y

iii) la etapa de recuperar el fragmento del lado N-terminal escindido en ii); y que tiene los siguientes rasgos característicos 1) a 3):

1) un peso molecular de 13 $\pm$ 2 kDa cuando se mide mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras;

2) sin capacidad para unirse específicamente a 3C10 o MEM-18; y

3) capacidad para unirse específicamente a un anticuerpo preparado usando el péptido que comprende 16 residuos de aminoácidos descritos en SEQ ID NO:2 para el antígeno.

Los inventores de la presente invención postularon el mecanismo que ha dado como resultado la presencia en sangre del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención tal como se describe a continuación, e intentaron producir el fragmento de CD14 soluble recombinante según el tercer aspecto de la presente invención mediante un procedimiento similar al mecanismo de producción *in vivo* postulado, que no define ni limita en modo alguno el alcance de la presente invención.

Tal como se explicará a continuación, el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención presenta un aumento específico en la sangre cuando el donante presenta septicemia. Más específicamente, aumenta mediante un fenómeno *in vivo* que puede producirse en el estadio inicial de la septicemia, y en particular, inmediatamente tras la exposición del organismo vivo a endotoxina o similar.

Un fenómeno *in vivo* que puede producirse inmediatamente tras la exposición del organismo vivo a endotoxina o similar es la activación de neutrófilo, y el neutrófilo activado libera una proteasa tal como elastasa de neutrófilo. Se estima que, en el transcurso de este proceso, CD14 de alto peso molecular tal como CD14 de longitud completa soluble o CD14 de membrana (denominada a continuación en el presente documento la "CD14 de longitud completa") en el organismo vivo se descompone por la elastasa, y esto da como resultado el aumento del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención. Aunque es probable que se produzcan diversos fragmentos mediante esta escisión debido a la baja especificidad de la escisión por la elastasa, puede esperarse que sea el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención el que se produce finalmente. También se esperan interacciones con otras proteasas, y tales interacciones también deben conducir a la producción del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención.

El antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención producido mediante la descomposición de la CD14 de longitud completa por la proteasa tal como elastasa es al menos estable en el grado de que es detectable en el organismo vivo (es decir, en el suero).

Puesto que el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención puede someterse a ensayo inmunológicamente por separado a la CD14 de longitud completa tal como se describirá a continuación, se espera que el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención formado mediante el fenómeno tal como se describió anteriormente tenga una conformación diferente de la de la CD14 de longitud completa.

Puesto que el fragmento de CD14 soluble recombinante según el tercer aspecto es un fragmento de CD14 soluble recombinante del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención, se intentó la producción del fragmento que tiene una conformación similar al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención, concretamente, el fragmento que tiene especificidad inmunológica similar al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención mediante eliminación por escisión de la región C-terminal de un fragmento de CD14 relativamente grande por medio de una proteasa. Los inventores de ese modo tuvieron éxito en la producción, el aislamiento y la purificación del fragmento de CD14 soluble recombinante según el tercer aspecto descrito en la presente invención.

A continuación, se describe una realización de producción del fragmento de CD14 soluble recombinante según el tercer aspecto.

En la etapa i), se produce un fragmento de CD14 soluble recombinante que tiene la secuencia caracterizada por los siguientes puntos 8) a 11).

8) un fragmento que tiene una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 3, o un fragmento que tiene tal secuencia parcial en la que se han delecionado, añadido o sustituido de 1 a 10 aminoácidos en la región distinta a las posiciones 53 a 68 de SEQ ID NO: 3;

9) el extremo N-terminal es una cualquiera de las posiciones 1 a 17 de SEQ ID NO: 3;

10) el extremo C-terminal es una cualquiera de las posiciones 134 a 356 en SEQ ID NO: 3;

11) se ha incorporado una secuencia de un sitio de escisión para una proteasa predeterminada en el sentido de 3' de una cualquiera de las posiciones 59 a 90 de SEQ ID NO: 3 mediante sustitución o inserción.

Las proteasas predeterminadas a modo de ejemplo en la etapa (i) 11) incluyen la proteasa PreScission, trombina y factor Xa. Cuando la proteasa predeterminada es la proteasa PreScission, la secuencia del sitio de escisión es Leu, Glu, Val, Leu, Phe, Gln, Gly, Pro, y estos 8 residuos de aminoácido pueden incorporarse, por ejemplo, en el sentido de 3' de una cualquiera de las posiciones 59 a 70 de SEQ ID NO: 3 mediante sustitución o inserción. Cuando la proteasa predeterminada es trombina, la secuencia del sitio de escisión es Leu, Val, Pro, Arg, Gly, Ser, y estos 6 residuos de aminoácido pueden incorporarse, por ejemplo, en el sentido de 3' de una cualquiera de las posiciones 59 a 70 de SEQ ID NO: 3. Cuando la proteasa predeterminada es factor Xa, la secuencia del sitio de escisión es Ile, Glu, Gly, Arg, y estos 4 residuos de aminoácido pueden incorporarse, por ejemplo, en el sentido de 3' de una cualquiera de las posiciones 59 a 70 de SEQ ID NO: 3.

De estos fragmentos de CD14 soluble recombinante, se prefiere aquél que se ha producido mediante la preparación

en la etapa (i) un fragmento en el que, en el punto 9), el extremo N-terminal es una cualquiera de las posiciones 1 a 6 de SEQ ID NO: 3, y se prefiere más aquél que se ha producido mediante la preparación de un fragmento en el que el extremo N-terminal es la posición 1 de SEQ ID NO: 3.

También se prefiere el fragmento de CD14 soluble recombinante que se ha producido mediante la preparación en la etapa (i) de un fragmento en el que, en el punto 11), la secuencia del sitio de escisión para la proteasa predeterminada se ha incorporado en el sentido de 3' de una cualquiera de las posiciones 59 a 68 de SEQ ID NO: 3 mediante sustitución o inserción.

También se prefiere el fragmento de CD14 soluble recombinante que se ha producido mediante la preparación de un fragmento en el que la secuencia del sitio de escisión para la proteasa predeterminada se ha incorporado en el sentido de 3' de la posición 64 de SEQ ID NO: 3 mediante sustitución o inserción.

Se prefiere particularmente el fragmento de CD14 soluble recombinante que se ha producido mediante la preparación de un fragmento en el que el extremo N-terminal es una cualquiera de las posiciones 1 a 6 de SEQ ID NO: 3, y la secuencia del sitio de escisión para la proteasa predeterminada se ha incorporado en el sentido de 3' de la posición 64 de SEQ ID NO: 3 mediante sustitución o inserción.

Con respecto a la etapa (i), una vez que se determina la secuencia, puede prepararse el fragmento de CD14 soluble recombinante tal como se describe en la sección del fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención.

Con respecto a la etapa (ii), la etapa de escindir el fragmento en el que el sitio de escisión de la proteasa predeterminada se ha incorporado mediante inserción o sustitución con la proteasa predeterminada puede lograrse mediante la reacción usada comúnmente en la técnica en las condiciones óptimas de la proteasa predeterminada. Por ejemplo, cuando la proteasa predeterminada es la proteasa PreScission, puede permitirse que la reacción de escisión tenga lugar durante la noche a 4°C manteniéndose la razón de la enzima con respecto al sustrato en el intervalo de 0,001 a 10:1 (U:µg). Cuando la proteasa predeterminada es trombina, puede permitirse que la reacción de escisión por la trombina tenga lugar durante la noche a 22°C manteniéndose la razón de la enzima con respecto al sustrato en el intervalo de 0,001 a 10:1 (U:µg). Cuando la proteasa predeterminada es factor Xa, puede permitirse que la reacción de escisión tenga lugar durante la noche mediante la adición de los componentes de modo que la razón de la enzima con respecto al sustrato esté en el intervalo de 0,0008 a 8: 1 (U:µg).

Con respecto a la etapa (iii) de recuperar el fragmento del lado N-terminal, esta etapa puede lograrse tal como se describió anteriormente para la purificación del fragmento de la presente invención o similar.

El procedimiento de producción tal como se describió anteriormente puede producir el fragmento de la presente invención o similar a alto rendimiento con alta uniformidad del producto y a escala comercial.

La secuencia particular del fragmento de CD14 soluble recombinante según el tercer aspecto puede deducirse a partir del procedimiento de producción tal como se describió anteriormente. El fragmento preferible tiene una secuencia que es la misma que el fragmento descrito en la sección del segundo aspecto de la presente invención. En algunos casos, el fragmento de CD14 soluble recombinante según el tercer aspecto de la presente invención tiene una parte de la secuencia del sitio de escisión de la proteasa predeterminada añadida a su extremo C-terminal.

El fragmento de CD14 soluble recombinante según el tercer aspecto de la presente invención se prefiere particularmente puesto que reacciona con el kit que sólo detecta el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención y que no detecta la CD14 de alto peso molecular en sangre; se ha confirmado que muestra una reactividad equivalente a la del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención en la detección mediante western blot (véase el ejemplo 14-(2) a continuación); y puede suponerse que su conformación es sustancialmente equivalente a la del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención.

En lo que sigue, se describen conjuntamente el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención y el fragmento de CD14 soluble recombinante según el tercer aspecto (Ambos se describen a veces como "el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención" o "el fragmento de CD14 soluble recombinante de la presente invención").

El "fragmento de CD14 soluble recombinante" es un fragmento soluble producido mediante manipulación genética que tiene una secuencia parcial de aminoácidos de la proteína CD14 de longitud completa humana descrita en SEQ ID NO: 3.

El fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención tiene el rasgo característico 1) tal como se describió anteriormente. Es decir, una banda correspondiente al fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención se detecta en SDS-PAGE llevada a cabo en condiciones no reductoras en la posición correspondiente a un peso molecular de 13 ± 2 kDa.

Más específicamente, cuando se determina el peso molecular usando los patrones de doble color Precision plus protein™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.) en SDS-PAGE al 12,5% llevada a cabo en condiciones no reductoras, se

detecta una banda en la posición del peso molecular de 13 ± 2 kDa.

El fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención tiene el rasgo característico 2) tal como se describió anteriormente. Es decir, no tiene capacidad para unirse específicamente a 3C10 o MEM-18.

- 5 Por "sin capacidad para unirse específicamente a 3C10 o MEM-18", quiere decirse que el fragmento de CD14 soluble recombinante no experimenta unión inmunológica, ni reacción antígeno-anticuerpo convencional frente a 3C10 o MEM-18. El fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención que no tiene "capacidad para unirse específicamente a 3C10 o MEM-18" muestra una capacidad de unión a 3C10 y MEM-18 que es de 1/100 o menos, y preferiblemente de 1/1.000 o menos en comparación con la de la CD14 de longitud completa que se encuentra en el organismo vivo o la proteína CD14 de longitud completa humana soluble recombinante descrita en SEQ ID NO: 3.

- 15 El fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención tiene el rasgo característico 3) tal como se describió anteriormente, y en particular, se une específicamente a un anticuerpo policlonal. El péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2 descrito en el rasgo característico 3) corresponde a 16 residuos de aminoácido en las posiciones 53 a 68 de la CD14 humana descrita en SEQ ID NO: 3. Puesto que el anticuerpo policlonal reconoce una secuencia que tiene una longitud de al menos 7 aminoácidos (véase el ejemplo 4 tal como se describirá más adelante), el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto al menos incluye una secuencia de 7 aminoácidos consecutivos seleccionados de las posiciones 53 a 68 de la CD14 humana descrita en SEQ ID NO: 3.

- 20 3C10 y MEM-18 son anticuerpos anti-CD14 bien conocidos. Se diseña que el epítipo en la CD14 sean las posiciones 7 a 14 y las posiciones 57 a 64, respectivamente, y el fragmento de CD14 soluble recombinante derivado de la CD14 humana convencional se unirá a 3C10 y MEM-18 siempre que la región epitópica esté incluida en la secuencia.

- 25 El fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención tiene los rasgos característicos 1) a 3) tal como se describió anteriormente, y por consiguiente, tiene propiedades físicas y naturaleza inmunológica similares a las del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención. En particular, se estima a partir de la similitud en la naturaleza inmunológica que el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención tiene una conformación de la secuencia de residuos de aminoácido que puede servir como epítipo similar al del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención. Por tanto, el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención es particularmente útil como sustancia patrón para someter a ensayo el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención. Aunque se ha usado generalmente un polipéptido recombinante que tiene los aminoácidos de las posiciones 1 a 307 en el extremo N-terminal de CD14 humana en el que se ha sustituido la serina en la posición 286 por cisteína (denominado a continuación en el presente documento el "rsCD14(1-307)S286C") como la sustancia patrón para someter a ensayo el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención, el uso del fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención es práctico para convertir la reacción inmunológica en la cantidad de sustancia debido al peso molecular similar. Además, el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención presenta reactividad similar a la del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención en diferentes condiciones de disolvente. Por ejemplo, mientras que el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención y rsCD14(1-307)S286C muestran diferente reactividad inmunológica para la muestra de sangre citrada y sangre con EDTA, la reactividad inmunológica concuerda entre el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención y el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención. De manera similar, el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención también es útil como análogo para someter a ensayo el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención mediante un método competitivo.

- Además, puesto que el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención tiene naturaleza inmunológica similar a la del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención, puede usarse como diana de unión específica en el cribado de un anticuerpo que puede usarse para someter a ensayo el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención. Puede lograrse un ensayo de este tipo, naturalmente, usando el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención para la diana de unión específica. Sin embargo, el antígeno CD14 soluble está presente en el organismo vivo sólo en una cantidad mínima, y por tanto, el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención serviría como sustituto particularmente útil.

- 55 Tal como se describió anteriormente, el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención es útil para diversas aplicaciones, y esta utilidad puede atribuirse a los rasgos característicos 1) a 3). En otras palabras, el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención que tiene los rasgos característicos 1) a 3) no se representa mediante su secuencia sino mediante la función que incluye las propiedades físicas y la naturaleza inmunológica del fragmento de CD14.

El fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención tiene además el rasgo característico de que no se une a LPS. Aunque no está incluida ninguna indicación específica en el documento WO96/20956, da a conocer un péptido que contiene de 8 a 60 aminoácidos incluyendo las posiciones 57 a 64 de la CD14 humana y que se une a LPS. Este péptido y el fragmento de CD14 soluble recombinante según el

segundo aspecto de la presente invención no son idénticos, tal como se entiende claramente por el hecho de que el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención tiene el rasgo característico 4) tal como se describió anteriormente.

La etapa de escindir el fragmento en el que el sitio de escisión de la proteasa predeterminada se ha incorporado mediante inserción o sustitución con la proteasa predeterminada puede lograrse mediante la reacción usada comúnmente en la técnica en las condiciones óptimas de la proteasa predeterminada. Por ejemplo, cuando la proteasa predeterminada es la proteasa PreScission, puede permitirse que la reacción de escisión tenga lugar durante la noche a 4°C manteniéndose la razón de la enzima con respecto al sustrato en el intervalo de 0,001 a 10:1 (U:µg). Cuando la proteasa predeterminada es trombina, puede permitirse que la reacción de escisión por la trombina tenga lugar durante la noche a 22°C manteniéndose la razón de la enzima con respecto al sustrato en el intervalo de 0,001 a 10:1 (U:µg). Cuando la proteasa predeterminada es factor Xa, puede permitirse que la reacción de escisión tenga lugar durante la noche mediante la adición de los componentes de modo que la razón de la enzima con respecto al sustrato esté en el intervalo de 0,0008 a 8: 1 (U:µg).

Con respecto a la etapa de recuperar el fragmento del lado N-terminal, esta etapa puede lograrse tal como se describió anteriormente para la purificación del fragmento de la presente invención o similar.

El procedimiento de producción tal como se describió anteriormente puede producir el fragmento de la presente invención o similar a alto rendimiento con alta uniformidad del producto y a escala comercial.

Alternativamente, el fragmento de la presente invención puede sintetizarse químicamente mediante un método común usado en la técnica, y el fragmento producido mediante tal síntesis química también está dentro del alcance del fragmento de la presente invención. Por ejemplo, el fragmento puede producirse mediante síntesis en un sintetizador de péptidos disponible comercialmente, o sintetizando los fragmentos del fragmento de la presente invención, y ligando los fragmentos así sintetizados.

<Cuarto aspecto>

El cuarto aspecto de la presente invención es un método para diagnosticar o detectar septicemia en el que se somete a ensayo el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención. El uso del método de diagnóstico o detección de septicemia según el cuarto aspecto de la presente invención permite el diagnóstico o la detección de la septicemia en el sujeto.

Este método contiene preferiblemente las siguientes etapas 1) a 3):

1) someter a ensayo el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención en la sangre recogida de un sujeto;

2) comparar el valor sometido a ensayo con el valor habitual para un donante normal; y

3) evaluar si el sujeto tiene septicemia.

En la etapa 1), la sangre recogida del sujeto puede ser o bien la sangre tal como se recoge del sujeto, concretamente, una sangre completa, o bien un plasma o suero preparado a partir de la sangre tal como se recoge. La etapa 1) es preferiblemente una etapa en la que se mide el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención tras preparar la sangre para dar el plasma o el suero. "Someter a ensayo el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" significa básicamente medir la cantidad del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención. Sin embargo, también es posible medir la cantidad por disolución unitaria, concretamente, la concentración. En esta etapa, es importante obtener un resultado de ensayo en la unidad que permita la comparación con el valor habitual en la siguiente etapa 2).

En la etapa 1), el ensayo se lleva a cabo preferiblemente mediante un inmunoensayo de tipo sándwich en vista de la comodidad de ensayo. Por ejemplo, tal inmunoensayo puede lograrse usando el método de ensayo según el sexto aspecto de la presente invención, y usando el kit de ensayo según el quinto aspecto de la presente invención tal como se describirá a continuación. Sin embargo, la etapa 1) no se limita a un método de ensayo de este tipo, y puede llevarse a cabo el ensayo, por ejemplo, mediante la separación del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención en la sangre, el plasma o suero recogido del sujeto mediante electroforesis, y la medición de la concentración o ancho de la banda detectada mediante densitometría. En una realización preferida de este método, se lleva a cabo la separación mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras, y entonces, se detecta la banda mediante western blot usando el anticuerpo usado en el kit de ensayo según el quinto aspecto de la presente invención. Otros métodos de ensayos incluyen separación y detección mediante espectroscopía de masas, HPLC, cromatografía de gases y CCF.

La etapa 2) es una etapa llevada a cabo mediante la obtención preliminar de los resultados de ensayo de donantes sanos, y la normalización de los resultados de ensayo, por ejemplo, mediante el cálculo del promedio o mediante el ajuste de un intervalo convencional; y usando este valor o intervalo normalizado de los donantes normales para el valor convencional que se compara con el valor determinado en la etapa 1). Por ejemplo, el valor habitual para los donantes normales puede determinarse usando "el valor promedio + 2 D.E. o 3 D.E." del donante normal para el valor de punto de corte. Alternativamente, la etapa 2) puede lograrse mediante la determinación preliminar del valor habitual para los pacientes con septicemia, y comparar el valor determinado en la etapa 1) con este valor. Esta etapa puede llevarse a cabo en lugar de la etapa de comparar con el valor habitual del donante normal de la etapa 2).

La etapa 3) es una etapa de evaluar si el sujeto tiene septicemia (positivo) o no tiene septicemia (negativo) basándose en los resultados de la comparación en la etapa 2). Sin embargo, la evaluación también puede incluir la evaluación "pseudopositiva" o el diagnóstico predictivo además de las evaluaciones "positiva" y "negativa". Por ejemplo, cuando el resultado de ensayo se compara con el intervalo convencional de los donantes normales establecido a de 0 a 0,1 µg/ml y el valor del paciente con septicemia de 0,2 µg/ml o superior, los resultados pueden evaluarse como "negativos" cuando el valor del sujeto está en el intervalo de 0 a 0,1 µg/ml; "pseudopositivos" cuando el valor del sujeto está en el intervalo de 0,1 a 0,2 µg/ml; y "positivos" o "alta probabilidad de desarrollar septicemia en el plazo de 24 horas" cuando el valor del sujeto es de 0,2 µg/ml o superior.

En pruebas clínicas, la estabilidad del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención en la muestra puede desempeñar el factor clave. Por ejemplo, cuando la muestra se congela y descongela repetidamente, o se deja durante un largo periodo a temperatura ambiente, el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención en el suero puede llegar a descomponerse de modo que el ensayo ya no puede llevarse a cabo, o la CD14 de alto peso molecular en el suero puede llegar a descomponerse para presentar una estructura equivalente o similar a la del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención para dar un resultado erróneo.

En vista de tal situación, pueden añadirse diversos aditivos al suero con el fin de garantizar la estabilidad del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención y la CD14 de alto peso molecular. Los aditivos a modo de ejemplo que pueden añadirse en el momento de la recogida de sangre incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), heparina y ácido cítrico que se usan en la recogida del plasma. Alternativamente, puede añadirse un inhibidor de proteasas al suero como estabilizante para suprimir de ese modo la proteólisis. Los ejemplos de tal inhibidor de proteasas incluyen antitrombina III, α 1-antitripsina, aprotinina, leupeptina, α 2-macroglobulina, pepstatina, antipaína, quimostatina, amastatina, inhibidor de tripsina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), EGTA, E-64, benzamidina y cloruro de 4-fluoro-(2-aminoetil)bencenosulfonilo (AEBSF). Además, la estabilidad del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención y la CD14 de alto peso molecular en la disolución puede mejorarse mediante la adición de un azúcar tal como lactosa, sacarosa o toreharosa, o un compuesto sintético de alto peso molecular tal como PEG.

<Quinto aspecto>

El quinto aspecto descrito en el presente documento es un kit para someter a ensayo el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención en una muestra, comprendiendo el kit al menos un anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención o un fragmento del mismo.

El kit descrito en el presente documento comprende al menos un anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención o un fragmento del mismo para permitir la detección del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención en la muestra. En el kit de la presente invención, la detección del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención se realiza mediante la detección directa del antígeno CD14 soluble diana según el primer aspecto de la presente invención. El kit es preferiblemente aquél que sólo detecta el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención, y que no detecta el antígeno CD14 soluble de alto peso molecular humano ni la proteína CD14 soluble de 36 kDa. En efecto, el kit de ensayo de la presente invención no detectará ni la proteína CD14 soluble de alto peso molecular humana ni la proteína CD14 soluble de 36 kDa ni siquiera aunque se use el suero humano como tal para la muestra sin tratamiento especial adicional tal como la adición de una proteína al suero humano o la desnaturalización de la proteína en el suero humano. El "fragmento del anticuerpo" es Fab, Fab' o F(ab')₂ del anticuerpo.

El kit de ensayo descrito en el presente documento no está limitado particularmente siempre que comprenda al menos un anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención o un fragmento del mismo, y el kit puede someter a ensayo el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención en la muestra. El kit de ensayo es preferiblemente un kit para someter a ensayo el antígeno CD14 soluble, en el que el anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención o un fragmento del mismo incluido en el kit es uno cualquiera de los siguientes anticuerpos a) a d) o un fragmento del mismo:

a) un anticuerpo que se une específicamente a un péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2;

b) un anticuerpo producido usando un péptido que comprende de 8 a 16 residuos de aminoácido consecutivos seleccionados de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 2 para el antígeno;

5 c) un anticuerpo producido usando un péptido que comprende 16 residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2 para el antígeno; y

d) un anticuerpo que se une específicamente al fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención o el fragmento de CD14 soluble recombinante según el tercer aspecto de la presente invención.

10 Tal como se describe en el presente documento, el kit de ensayo es un kit de ensayo que comprende el anticuerpo a), c) o d) o un fragmento del mismo. También se describe en el presente documento que el kit de ensayo es un kit de ensayo que comprende el anticuerpo d) o un fragmento del mismo. Tal como se describe adicionalmente, el kit de ensayo es un kit de ensayo que comprende un anticuerpo que se une al fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención, o un fragmento del anticuerpo.

15 El anticuerpo d), concretamente, el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención o el fragmento de CD14 soluble recombinante según el tercer aspecto descrito en el presente documento ("el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención" y "el fragmento de CD14 soluble recombinante según el tercer aspecto descrito en el presente documento" se denominan conjuntamente a veces a continuación en el presente documento "los fragmentos de CD14 soluble recombinante de la presente invención") incluye un anticuerpo que tiene rasgos característicos similares a a) un anticuerpo que se une específicamente a un péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2; b) un anticuerpo producido usando un péptido que comprende de 8 a 16 residuos de aminoácido consecutivos seleccionados de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 2 para el antígeno; o c) un anticuerpo producido usando un péptido que comprende 16 residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2 para el antígeno, y algunos son solapantes. Por tanto, el anticuerpo d) puede incluir algunos de los anticuerpos a) a c). Para distinguir claramente el anticuerpo d) de los anticuerpos a) a c), los anticuerpos a) a c) pueden excluirse del anticuerpo d).

30 El anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención o un fragmento del mismo, y en particular, el anticuerpo d) usado en este kit es preferiblemente un anticuerpo que se ha preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención o el fragmento de CD14 soluble recombinante según el tercer aspecto de la presente invención para el antígeno, o un fragmento del mismo. También se describe un anticuerpo preparado usando el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención para el antígeno, o un fragmento del mismo. Se describe además un anticuerpo preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno, o un fragmento del mismo. También se describe un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno, o un fragmento del mismo. En particular, el anticuerpo usado es preferiblemente un anticuerpo que no se une sustancialmente a la CD14 de alto peso molecular humana o una CD14 de alto peso molecular recombinante tal como el polipéptido soluble que tiene los aminoácidos de las posiciones 1 a 356 en el extremo N-terminal de la CD14 humana (denominado a continuación en el presente documento el "rsCD14(1-356)").

40 El principio de ensayo no está limitado particularmente siempre que el anticuerpo o un fragmento del mismo se use para someter a ensayo inmunológicamente el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención.

45 Se describe un kit de ensayo en lo que sigue como ejemplo del principio de ensayo, y en este kit de ensayo, se usa el anticuerpo a), concretamente, "un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno" para detectar el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención mediante inmunoensayo de tipo sándwich (este kit de ensayo se denomina a veces a continuación en el presente documento kit de inmunoensayo de tipo sándwich).

50 El inmunoensayo de tipo sándwich puede llevarse a cabo usando las técnicas conocidas en la técnica. Se describen el principio de ensayo, la aplicación y la mejora, por ejemplo, en Ishikawa E. ed., "Supersensitive Enzyme Immunoassay", Gakkai-Shuppan Center (1993); Immunoassay Development Research Group, "Novel Use of Immunoassays and Their Use in the Development of Diagnostic and Therapeutic Agents", Keiei-Kyoiku Shuppan; y Ishikawa E. ed., "Enzyme Immunoassay (3rd ed.)", Igaku-Shoin (1987).

55 El kit de inmunoensayo de tipo sándwich descrito en el presente documento comprende un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2. Los rasgos característicos y el método de producción del anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2 son tal como se describen en el primer aspecto de la presente

invención. El anticuerpo no está limitado particularmente, y el anticuerpo puede ser o bien un anticuerpo policlonal o bien un anticuerpo monoclonal.

El inmunoensayo de tipo sándwich es un ensayo logrado normalmente mediante la formación de un complejo de un anticuerpo - un antígeno - un anticuerpo usando dos o más anticuerpos que reconocen la proteína analito por sitios diferentes.

En primer lugar, se prepara un portador insoluble que tiene un primer anticuerpo unido al mismo para su uso como fase sólida o sitio de reacción. Se añade la muestra al portador insoluble de la fase sólida para su reacción. Tras reaccionar durante un tiempo predeterminado, se lava la fase sólida para eliminar la sustancia que no ha podido unirse específicamente a la fase sólida. Entonces se añade un segundo anticuerpo marcado, y tras reaccionar durante un tiempo predeterminado, se lava la fase sólida para eliminar el anticuerpo marcado que no pudo formar el complejo. Se determinó cualitativa y cuantitativamente la cantidad del complejo que llegó a unirse específicamente a la fase sólida mediante la utilización del marcador. El ensayo de tipo sándwich puede llevarse a cabo o bien en dos pasos tal como se describió anteriormente (método en dos etapas) o mediante la adición simultánea del antígeno y el anticuerpo marcado en un paso (método en una sola etapa).

En el kit de inmunoensayo de tipo sándwich, el ensayo se logra mediante la formación del complejo de "un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno" - "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" - "una segunda sustancia de unión que se une específicamente al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención".

El kit de inmunoensayo de tipo sándwich de la presente invención puede estar constituido por:

un portador insoluble que tiene "un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno" unido al mismo, y una segunda sustancia de unión marcada que se une a "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" (se denomina a veces a continuación en el presente documento "la segunda sustancia de unión" por simplicidad); o

un portador insoluble que tiene la segunda sustancia de unión unida al mismo, y "un anticuerpo marcado que se une específicamente al péptido que comprende 16 residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "un anticuerpo monoclonal marcado preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno".

Segundas sustancias de unión a modo de ejemplo son anticuerpos que se unen específicamente a "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención", y el anticuerpo que se une específicamente a "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" no está limitado particularmente, y puede ser o bien un anticuerpo policlonal o bien un anticuerpo monoclonal. En vista de la compatibilidad con el inmunoensayo de tipo sándwich usando un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2, la segunda sustancia de unión es preferiblemente un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de tal anticuerpo monoclonal. El fragmento de anticuerpo puede ser Fab, Fab' o F(ab')₂ del anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención (se denomina a veces a continuación en el presente documento "el segundo anticuerpo") no está limitado particularmente y puede ser o bien un anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención, o bien un anticuerpo que también se une específicamente a la CD14 de alto peso molecular. Preferiblemente, el segundo anticuerpo es un anticuerpo que se une a "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" por una región de unión diferente a "el anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "el anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno". Más preferiblemente, el segundo anticuerpo es un anticuerpo en el que la segunda sustancia de unión se une específicamente a una cualquiera de las regiones en los residuos de aminoácido de las posiciones 1 a 52 de la CD14 de alto peso molecular humana, o un fragmento del mismo; o un anticuerpo que compite con o que muestra reactividad cruzada con un anticuerpo que se une específicamente a una cualquiera de las regiones en los residuos de aminoácido de las posiciones 1 a 52 de la CD14 de alto peso molecular humana, o un fragmento del mismo. Más preferiblemente, el segundo anticuerpo es un anticuerpo en el que la segunda sustancia de unión se une específicamente a una cualquiera de las regiones en los residuos de aminoácido de las posiciones 17 a 26 de "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención", o un fragmento del mismo; o un anticuerpo que compite con (o que muestra reactividad cruzada con) un anticuerpo que se une específicamente a una cualquiera de las regiones en los residuos de aminoácido de las posiciones 17 a 26 de "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención", o un fragmento del mismo.

El segundo anticuerpo puede prepararse, por ejemplo, según el procedimiento de producción descrito para el primer aspecto de la presente invención usando la CD14 de alto peso molecular, "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención", una mezcla de la CD14 de alto peso molecular y "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención", o la CD14 recombinante para el antígeno para producir de ese modo el anticuerpo policlonal o el anticuerpo monoclonal. La realización de producir el segundo anticuerpo usando una mezcla de la CD14 de alto peso molecular y "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" y la CD14 recombinante para el antígeno se describirá más adelante en el ejemplo 3.

Como en el caso del ejemplo 3 tal como se describirá a continuación, un sistema de ensayo de tipo sándwich se constituye preferiblemente de antemano antes del ensayo real a partir de un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2 y un anticuerpo candidato para el segundo anticuerpo para seleccionar de ese modo un segundo anticuerpo adecuado mediante la confirmación de la sensibilidad del ensayo.

Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fab' y F(ab')₂ pueden prepararse mediante el método conocido en la técnica (Ishikawa E. ed., "Supersensitive Enzyme Immunoassay", Gakkai-Shuppan Center, 1993).

En lo anterior, se ha descrito un inmunoensayo de tipo sándwich logrado mediante la unión del anticuerpo al portador insoluble. Sin embargo, el inmunoensayo de tipo sándwich puede lograrse también en una disolución sin usar un portador insoluble, por ejemplo, haciendo reaccionar el antígeno, el anticuerpo marcado y la segunda sustancia de unión marcada con el segundo marcador en una fase líquida para medir de ese modo la interacción entre el marcador y el segundo marcador.

Con respecto al inmunoensayo de tipo sándwich, el ensayo puede lograrse alternativamente mediante un método competitivo, en el que se permite que compitan el antígeno en la muestra y el antígeno marcado o el análogo de antígeno marcado en la formación del complejo del anticuerpo - el antígeno - el anticuerpo.

En el kit de inmunoensayo de tipo sándwich descrito en el presente documento, el ensayo se logra mediante la formación del complejo: "un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno" -el "antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" marcado (o su análogo) - "la segunda sustancia de unión que se une al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención".

El kit de inmunoensayo de tipo sándwich descrito en el presente documento llevado a cabo mediante el método competitivo puede estar constituido por:

un portador insoluble que tiene "un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno" unido al mismo; la segunda sustancia de unión; y el "antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" marcado o el análogo marcado de "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención"; o

"un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno", un portador insoluble que tiene la segunda sustancia de unión unida al mismo; y el "antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" marcado o el análogo marcado de "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención".

Los ejemplos del análogo de "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" incluyen el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención; un polipéptido soluble que tiene los aminoácidos de las posiciones 1 a 285 en el extremo N-terminal de la CD14 humana (denominado a continuación en el presente documento el "rsCD14(1-285)"), y rsCD14(1-307)S286C. Entre éstos, se prefiere particularmente el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención. Sin embargo, el análogo no está limitado particularmente siempre que pueda competir en el sistema de ensayo con el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención en la muestra. Los métodos de producción de rsCD14(1-285) y rsCD14(1-307)S286C se describen en el documento WO01/72993.

El inmunoensayo de tipo sándwich también puede llevarse a cabo mediante otro método alternativo usando una segunda unión específica. En este método, el ensayo se logra mediante la formación del complejo de un anticuerpo - un antígeno - un anticuerpo - una segunda sustancia de unión específica; o el complejo de un anticuerpo - un antígeno - un anticuerpo - una segunda sustancia de unión específica - una pareja de unión específica de la segunda sustancia de unión específica (se denomina a veces a continuación en el presente documento "la segunda pareja de unión específica").

Más específicamente, el kit de inmunoensayo de tipo sándwich se logra mediante la formación de un complejo de "un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el

segundo aspecto de la presente invención para el antígeno" - "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" - "una segunda sustancia de unión que se une al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" - una segunda sustancia de unión específica; un complejo de "un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno" - "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" - "una segunda sustancia de unión que se une al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" - una segunda sustancia de unión específica - una segunda pareja de unión específica; o un complejo de "una segunda sustancia de unión que se une al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" - "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" - "un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno" - una segunda sustancia de unión específica - una segunda pareja de unión específica.

Con respecto a la constitución del kit de inmunoensayo de tipo sándwich usando la segunda unión específica, por ejemplo, puede comprender además una segunda sustancia de unión específica marcada cuando la pareja de la segunda sustancia de unión específica es “un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2” o “un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno”, o “la segunda sustancia de unión que se une al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención”. La segunda sustancia de unión específica a modo de ejemplo es un anticuerpo frente a la pareja de la segunda sustancia de unión específica.

Quando la pareja de la segunda sustancia de unión específica es la segunda pareja de unión específica, el kit comprende “un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2, al que se ha unido la segunda sustancia de unión específica” o “un anticuerpo monoclonal producido usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno, al que se ha unido la segunda sustancia de unión específica”; una segunda sustancia de unión marcada que se une al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención; y un portador insoluble que tiene la segunda pareja de unión específica unida al mismo; o alternatively, un anticuerpo marcado que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2 o “un anticuerpo monoclonal producido usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno, que se ha marcado”; una segunda sustancia de unión que se une a “el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención” que tiene una segunda sustancia de unión específica unido al mismo”; y un portador insoluble que tiene la segunda pareja de unión específica unida al mismo.

Combinaciones a modo de ejemplo de la segunda sustancia de unión específica y la segunda pareja de unión específica incluyen un antígeno y su anticuerpo; un ligando y su receptor; una sustancia que contiene una cadena de azúcar y lectina; y biotina y avidina o estreptavidina.

Los inmunoensayos de tipo sandwich a modo de ejemplo también incluyen, además de los descritos anteriormente, un ensayo llevado a cabo usando un anticuerpo frente a un anticuerpo, concretamente, un anticuerpo anti-inmunoglobulina para formar un complejo de un anticuerpo - un antígeno - un anticuerpo - un anticuerpo anti-inmunoglobulina; un ensayo usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina y una segunda unión específica para formar un anticuerpo anti-inmunoglobulina - un anticuerpo - un antígeno - un anticuerpo - una segunda sustancia de unión específica - una segunda pareja de unión específica.

En el kit de inmunoensayo de tipo sándwich descrito en el presente documento, el ensayo se logra mediante la formación de un complejo de “un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2” o “un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno” - “el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención” - “una segunda sustancia de unión que se une al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención” - un anticuerpo anti-inmunoglobulina; un complejo de “un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2” o “un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno” - “el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención” - “una segunda sustancia de unión que se une al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención” - un anticuerpo anti-inmunoglobulina; un anticuerpo anti-inmunoglobulina - “un anticuerpo que se une específicamente a un péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2” o “un anticuerpo monoclonal producido usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno” - “el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención” - “una segunda sustancia de unión que se une al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención” - una segunda sustancia de unión específica - una segunda pareja de unión específica; o un anticuerpo anti-inmunoglobulina - “una segunda sustancia de unión que se une al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención” - “el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la

presente invención" - "un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno" - la segunda sustancia de unión específica - la segunda pareja de unión específica.

- 5 Independientemente del tipo del inmunoensayo de tipo sándwich, cualquier ensayo de este tipo que lleva a cabo el ensayo mediante la formación de un complejo de "un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno" - "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" - "una segunda sustancia de unión que se une al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" está dentro del alcance del ensayo de la presente invención aunque se incluyese una fase sólida o una sustancia de marcaje usando la segunda unión específica.

- 15 En otras palabras, independientemente del tipo del inmunoensayo de tipo sándwich, el kit de ensayo contiene "un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno". De manera similar, el kit de ensayo contiene un anticuerpo de uno cualquiera de los anteriores a) a d). (En lo que sigue, se aplica lo mismo a la expresión "siempre que esté contenido "un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno")

- 20 El portador insoluble usado para el kit de inmunoensayo de tipo sándwich descrito en el presente documento pueden ser, por ejemplo, perlas, partículas de látex, partículas magnéticas, una placa, un tubo o una membrana. Las perlas, la placa, y el tubo pueden ser los producidos a partir de poliestireno, nailon, vidrio, caucho de silicona, acero inoxidable, plástico, o similar. La membrana puede ser la producida a partir de celulosa, derivado de celulosa, nitrocelulosa, polímero sintético poroso o fibra de vidrio, un material textil, un material textil no tejido, un papel de filtro, o similar. Las perlas, las partículas de látex y las partículas magnéticas puede ser las que tienen forma esférica, lo que es ventajoso en vista del espacio reducido durante el almacenamiento. La placa y el tubo pueden usarse en forma de un pocillo, y esta forma es ventajosa en vista de la compatibilidad con sistemas de ensayo automatizados disponibles comercialmente, lector de placas, y similares. La membrana puede usarse en la prueba de inmunocromatografía y fracción retenida tal como se describirá a continuación.

- La unión del anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende el residuo de aminoácido descrito en SEQ ID NO: 2, la segunda sustancia de unión, la segunda sustancia de unión específica o su pareja, o el anticuerpo anti-inmunoglobulina contra el portador insoluble puede lograrse, por ejemplo, mediante adsorción térmica, unión química, o similar.

- 35 La superficie sin adsorción del portador insoluble que no tiene tal sustancia unida al mismo se bloquea preferiblemente mediante una sustancia que no afecta al sistema de ensayo para mejorar la especificidad o sensibilidad del sistema de ensayo. Una sustancia de este tipo a modo de ejemplo que no tiene efectos sobre el sistema de ensayo incluye proteínas tales como BSA y caseína, y tensioactivos tales como Tween20 y NP-40.

- 40 El marcador usado en el kit de inmunoensayo de tipo sándwich de la presente invención puede ser una enzima tal como peroxidasa, fosfatasa alcalina, β -D-galactosidasa, oxidasa o uricasa; una sustancia quimioluminiscente tal como acridinio o su derivado, o aequorina o aequorina modificada; una sustancia fluorescente tal como FITC, europio (Eu), samario (Sm), u otra sustancia fluorescente lantanoide; colorante; oro coloidal; látex coloreado; o un isótopo.

- 45 Por ejemplo, cuando la enzima usada es peroxidasa, puede usarse 3,3',5,5'-tetrabencidina, 1,2-fenilendiamina, o similar para el sustrato cromogénico, y cuando la enzima usada es una fosfatasa alcalina, puede usarse fosfato de 4-nitrofenilo o similar para el sustrato cromogénico, y cuando la enzima usada es β -D-galactosidasa, puede usarse 2-nitrofenil-D-galactósido o similar para el sustrato cromogénico.

- 50 El marcaje con enzima del anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2, la segunda sustancia de unión, la segunda sustancia de unión específica o su pareja, o anticuerpo anti-inmunoglobulina puede lograrse mediante el método con glutaraldehído en dos pasos, el método con ácido peryódico, el método con maleimida, el método con disulfuro de piridilo, o similar.

El marcador distinto de la enzima también puede unirse mediante un método conocido en la técnica tal como adsorción térmica y unión química.

- 55 Se prefiere el marcaje con una enzima puesto que el ensayo puede lograrse a una sensibilidad relativamente alta, y con un sistema de medición de absorbancia usado comúnmente en la técnica cuando el sustrato cromogénico es el que se mencionó anteriormente.

Cuando se usa una sustancia quimioluminiscente, una sustancia fluorescente, un marcador coloreado o un isótopo

para el marcador, el ensayo puede lograrse usando un sistema de medición compatible con el marcador. Cuando se usa una sustancia fluorescente tal como Eu, por ejemplo, criptato (criptato de Eu^{3+}), puede medirse la transferencia de energía de resonancia por fluorescencia usando un derivado de alofocianina tal como XL665 para el segundo marcador.

- 5 Para un kit de ensayo práctico tal como un kit que emplea la prueba de inmunocromatografía o fracción retenida tal como se describirá a continuación, se prefiere el uso de un colorante, oro coloidal o látex coloreado puesto que estos marcadores pueden observarse visualmente.

10 El kit de inmunoensayo de tipo sándwich descrito en el presente documento se caracteriza porque el ensayo se lleva a cabo mediante el inmunoensayo de tipo sándwich, y contiene un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2. El inmunoensayo de tipo sándwich puede lograrse mediante tecnologías conocidas en la técnica tal como se describió anteriormente, y el kit de inmunoensayo de tipo sándwich no está limitado particularmente más que por la descripción anterior siempre que el kit se base en el inmunoensayo de tipo sándwich y contenga "un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno". Tal como se describe en el presente documento, el kit de inmunoensayo de tipo sándwich incluye "un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno" y otros reactivos que son necesarios para el inmunoensayo de tipo sándwich, y los componentes del kit no están limitados particularmente siempre que tales componentes no interfieran en el principio de ensayo y los resultados de ensayo.

25 Tales componentes opcionales a modo de ejemplo incluyen un tampón o un diluyente para la muestra, el anticuerpo marcado, o similar, un sustrato cromogénico (véase anteriormente) adecuado para la enzima usada si se usa una enzima en el anticuerpo marcado, un agente de bloqueo, un reactivo de detención y una disolución de lavado. Preferiblemente, el diluyente es el que contiene una sustancia que también está contenida en la muestra, aunque el diluyente no está limitado particularmente. Cuando la muestra es suero, y la recogida de sangre en el transcurso de la obtención del suero se ha llevado a cabo en presencia de EDTA o ácido cítrico, el diluyente contiene preferiblemente EDTA o ácido cítrico al mismo contenido. El diluyente, por ejemplo, puede contener de 0,2 a 1 mg/ml de EDTA.

30 Tales componentes opcionales a modo de ejemplo también incluyen una sustancia patrón, que puede ser "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" o un análogo de "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención". El uso del fragmento de CD14 soluble recombinante de la presente invención se prefiere particularmente para la sustancia patrón.

35 El kit de inmunoensayo de tipo sándwich también incluye los kits para análisis inmunocromatográfico o de fracción retenida en el que el ensayo se logra con el principio del inmunoensayo de tipo sándwich. El kit de inmunoensayo de tipo sándwich también puede aplicarse a un ensayo mediante el proceso MEDIA que mide electroquímicamente la señal procedente del marcador (documento JP-A 5-264552), un inmunoensayo usando un microchip ("Bioscience and Industry", vol. 61, páginas 449-454, 2003), fluoroinmunoensayo con resolución temporal ("Analytical biochemistry" (EE.UU.), 1984, vol. 137, págs. 335-343) e inmunoensayo homogéneo. En los kits de ensayo que emplean tales principios de ensayo, se somete a ensayo el analito mediante inmunoensayo de tipo sándwich, y el kit contiene "un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno".

45 El kit de inmunoensayo de tipo sándwich descrito en el presente documento tiene el rasgo característico de que contiene "un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno", y puede someter a ensayo específicamente el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención. La muestra usada para el kit de inmunoensayo de tipo sándwich de la presente invención es preferiblemente una muestra acuosa. Se prefieren particularmente, por ejemplo, sangre, suero, plasma y otros componentes de la sangre, orina y otros líquidos corporales, sobrenadante de cultivo celular y eluato de la columna, y estas muestras pueden usarse satisfactoriamente para someter a ensayo el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención contenido en estas muestras. Sin embargo, en el caso de muestras distintas de componentes de la sangre humanos, por ejemplo, orina u otros líquidos corporales humanos; hemoderivados, orina, u otros líquidos corporales de especies no humanas; sobrenadante de cultivo celular o eluato de una columna, el kit puede someter a ensayo no sólo "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" sino también proteínas y polipéptidos análogos a "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención". El kit de inmunoensayo de tipo sándwich también incluye el kit para someter a ensayo proteínas y polipéptidos análogo a "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" siempre que contenga "un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de

la presente invención para el antígeno”.

Además, “un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2” y “un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno” en la descripción anterior puede sustituirse por

“un fragmento Fab, Fab’ o (Fab’)₂ del anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2” o “un fragmento Fab, Fab’ o (Fab’)₂ del anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno”, respectivamente.

En lo anterior, se han descrito realizaciones del kit de inmunoensayo de tipo sándwich usando el anticuerpo a), concretamente, “un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2” o “un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno”. Sin embargo, el kit de ensayo también puede constituirse usando el anticuerpo b), concretamente, “un anticuerpo producido usando un péptido que comprende de 8 a 16 residuos de aminoácido consecutivos seleccionados de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 2 para el antígeno”, el anticuerpo c), concretamente, “un anticuerpo producido usando un péptido que comprende 16 residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2 para el antígeno”, el anticuerpo d), concretamente, “un anticuerpo producido usando la CD14 soluble fragmento según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno”, o fragmento Fab, Fab’, o (Fab’)₂ de un anticuerpo de este tipo.

Principios de ensayo a modo de ejemplo distintos al inmunoensayo de tipo sándwich incluyen ensayo de aglutinación, ensayo de unión a fase sólida y ensayo de reacción en disolución, y un kit de ensayo adaptado para cada método puede constituirse usando al menos un anticuerpo que se une específicamente a “el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención” o un fragmento del mismo, y preferiblemente, usando el anticuerpo de la presente invención o un fragmento del mismo. Cuando el kit de ensayo se constituye usando un anticuerpo solo sin usar la segunda sustancia de unión, el anticuerpo que se une específicamente a “el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención” o un fragmento del mismo preferiblemente comprende un anticuerpo que no se une sustancialmente a la proteína CD14 soluble de longitud completa (se denomina a veces a continuación en el presente documento “la CD14 humana de alto peso molecular”) en la sangre humana o la CD14 recombinante de alto peso molecular tal como el polipéptido soluble que contiene los aminoácidos de las posiciones 1 a 356 en el extremo N-terminal de la CD14 humana (denominado a continuación en el presente documento el “rsCD14(1-356)”).

En el ensayo de aglutinación, se une un anticuerpo a la superficie de partículas, se permite que se aglutinen las partículas utilizando la presencia del antígeno, y se lleva a cabo la cualificación o cuantificación específica del antígeno usando el grado de la aglutinación para el índice.

En el kit de inmunoensayo descrito en el presente documento que utiliza el ensayo de aglutinación, se lleva a cabo el ensayo, por ejemplo, mediante la formación de “el anticuerpo que se une específicamente a un péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2” o “el anticuerpo monoclonal producido usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno” - “el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención” y la aglutinación del complejo.

El kit de inmunoensayo descrito en el presente documento que utiliza el ensayo de aglutinación comprende las partículas que tienen el anticuerpo descrito en el presente documento unido en su superficie.

Las partículas usadas pueden ser las usadas comúnmente en la técnica tales como partículas de látex, eritrocitos (por ejemplo, eritrocitos de oveja), partículas de gelatina, microperlas o partícula de carbono.

El ensayo de unión a fase sólida es un ensayo que se logra mediante la formación de un complejo anticuerpo - antígeno sobre la fase sólida. En este ensayo, se adsorbe una muestra que contiene el antígeno sobre un portador insoluble (es decir, fase sólida), y entonces se añade un anticuerpo marcado para su reacción. La cantidad del complejo que llega a unirse a la fase sólida se mide entonces usando el marcador para la cualificación o cuantificación específica.

El ensayo competitivo se lleva a cabo, por ejemplo, permitiendo que un análogo de antígeno se adsorba sobre un portador insoluble para la competencia con la reacción entre el anticuerpo marcado y el antígeno en la muestra, y midiendo la cantidad del anticuerpo marcado que llega a unirse específicamente al análogo de antígeno. Otro ensayo competitivo se lleva a cabo permitiendo que un anticuerpo se adsorba sobre un portador insoluble para la competencia del antígeno marcado análogo con la reacción entre el anticuerpo y el antígeno en la muestra, y midiendo la cantidad del antígeno marcado análogo que llega a unirse específicamente al anticuerpo.

En el kit de inmunoensayo de unión a fase sólida descrito en el presente documento, el ensayo se logra mediante la formación de un complejo de “un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2” o “un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno” - “el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención”; un complejo de “un anticuerpo que se une

específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno" - el "antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" marcado (o su análogo); o un complejo de "un anticuerpo marcado que se une específicamente al péptido que comprende los
5 residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "un anticuerpo monoclonal marcado producido usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno" - "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" (o su análogo).

El portador insoluble, el análogo de "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención", el marcador, y el reactivo adsorbido son tal como se describen en la explicación del kit de inmunoensayo de tipo
10 sándwich.

El método de reacción en disolución es un método en el que un antígeno y un anticuerpo marcado se hacen reaccionar en fase líquida, y el antígeno; el anticuerpo, y el complejo antígeno-anticuerpo se separan por medio de una técnica de coagulación o fisicoquímica usando el anticuerpo para la cualificación o cuantificación específica de "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención".

En la descripción anterior, "un anticuerpo que se une específicamente al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "un anticuerpo monoclonal preparado usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno" puede sustituirse por "un anticuerpo producido usando un péptido que comprende de 8 a 16 residuos de aminoácido consecutivos seleccionados de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 2 para el antígeno", "un anticuerpo
15 producido usando un péptido que comprende 16 residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2 para el antígeno", "un anticuerpo producido usando el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención para el antígeno", o "un anticuerpo producido usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el tercer aspecto de la presente invención para el antígeno", o "un fragmento Fab, Fab' o (Fab')₂ de un anticuerpo de este tipo".

En lo anterior, se han descrito los principios de ensayo del kit de ensayo descrito en el presente documento. Tal como se describe en el presente documento, un kit de ensayo contiene un anticuerpo que se une específicamente a al menos un "antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" o un fragmento del mismo, y puede someter a ensayo directamente "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención". El principio del inmunoensayo puede comprender los conocidos en la técnica tal como se describen, por ejemplo, en
20 Ishikawa E. ed., "Supersensitive Enzyme Immunoassay", Gakkai-Shuppan Center (1993); Immunoassay Development Research Group, "Novel Use of Immunoassays and Their Use in the Development of Diagnostic and Therapeutic Agents", Keiei-Kyoiku Shuppan; e Ishikawa E. ed., "Enzyme Immunoassay (3rd ed.)", Igaku-Shoin (1987) mencionados anteriormente.

"El antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" que puede someterse a ensayo específicamente mediante el kit descrito en el presente documento aumenta en el paciente que presenta septicemia. Por consiguiente, la medición de "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" proporcionaría un índice para el diagnóstico de septicemia, y el kit de la presente invención es útil para diagnosticar la septicemia.

"El anticuerpo que se une específicamente a un péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2" o "el anticuerpo monoclonal producido usando el fragmento de CD14 soluble recombinante de la presente invención para el antígeno" es preferiblemente un anticuerpo que tiene una constante de disociación (KD) expresada en cuanto a afinidad del anticuerpo para el péptido o "el fragmento de CD14 soluble recombinante de la presente invención" menor que 10^{-7} M, más preferiblemente 10^{-8} M o menos, y aún más preferiblemente 10^{-9} M o menos.

En la producción de "el anticuerpo que se une específicamente a un péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2", el péptido usado para el antígeno es un péptido que contiene al menos 8 aminoácidos consecutivos, preferiblemente un péptido que contiene al menos 10 aminoácidos consecutivos, más preferiblemente un péptido que contiene al menos 12 aminoácidos consecutivos, y lo más preferiblemente un péptido que contiene al menos 16 aminoácidos consecutivos descritos en SEQ ID NO: 2. Además, siempre que el péptido contenga uno cualquiera de los al menos 8 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 2, el péptido no está limitado particularmente para la secuencia de aminoácidos distinta a los al menos 8 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 2. Sin embargo, el péptido es preferiblemente aquél en el que todas las secuencias de aminoácidos dentro del péptido son las que se encuentran en la SEQ ID NO: 2.

El anticuerpo es preferiblemente el producido usando el péptido que contiene al menos 8 aminoácidos consecutivos, preferiblemente el péptido que contiene al menos 10 aminoácidos consecutivos, más preferiblemente el péptido que contiene al menos 12 aminoácidos consecutivos, y lo más preferiblemente el péptido que contiene al menos 16 aminoácidos consecutivos descritos en SEQ ID NO: 2 para el antígeno.

En la producción de "el anticuerpo producido usando un péptido que comprende de 8 a 16 residuos de aminoácido

consecutivos seleccionados de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 2 para el antígeno", el número de los residuos de aminoácido del péptido no está limitado particularmente siempre que el péptido sea aquél que comprende de 8 a 16 residuos de aminoácido consecutivos seleccionados de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 2. El anticuerpo es preferiblemente el producido usando un péptido que comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos, más preferiblemente al menos 12 aminoácidos consecutivos, y lo más preferiblemente al menos 16 aminoácidos consecutivos para el antígeno. En otras palabras, el anticuerpo es lo más preferiblemente "un anticuerpo producido usando un péptido que comprende 16 residuos de aminoácido consecutivos de SEQ ID NO: 2 para el antígeno".

Además, "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" tiene un peso molecular diferente al de la CD14 de alto peso molecular, y una secuencia de aminoácidos más corta que la de la CD14 de alto peso molecular. Por consiguiente, la estructura de "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" en sangre debe ser diferente de la de la CD14 de alto peso molecular. Se concibe que esta diferencia en la estructura conduce a la diferencia en la reactividad con el anticuerpo, y la fuerte unión, concretamente, la alta afinidad por "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" de los anticuerpos a) a d) que son los ejemplos preferidos del anticuerpo que se une específicamente a "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" incluido en el kit de ensayo según el quinto aspecto de la presente invención (se denominan a veces a continuación en el presente documento "los anticuerpos a) a d)") por motivos de simplicidad).

Cada uno de los anticuerpos a) a d) puede ser o bien un anticuerpo policlonal o bien un anticuerpo monoclonal. La especie animal usada para obtener los anticuerpos de la presente invención no está limitada particularmente, y se prefiere el uso de un conejo, una cabra, o similar en vista de la facilidad de producción de anticuerpos. El tipo de la molécula tampoco está limitado particularmente, y puede emplearse una inmunoglobulina de cualquier clase, subclase o isotipo.

El péptido usado para el inmunógeno puede producirse mediante cualquier método usado comúnmente en la técnica, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos (sintetizador de péptidos modelo 433A fabricado por PerkinElmer Japan) o mediante recombinación genética (véase "New Protocols of Cytoengineering Experiments" editado por Antitumor Research Section, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, y publicado por Shujun-sha).

Por ejemplo, el péptido que comprende al menos 8 aminoácidos consecutivos de los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2 puede sintetizarse mediante el método con Fmoc usando un sintetizador de péptidos (modelo 433A), y tras desprotección mediante TFA y escisión de la resina, puede purificarse usando una columna C18 HPLC (Capcell-pak, Shiseido Co., Ltd.) para preparar el péptido diana.

Cuando el antígeno es una proteína, puede usarse para el inmunógeno sin tratamiento adicional. Sin embargo, un péptido del tamaño igual a o menor que de 8 a 30 residuos de aminoácido generalmente puede no tener inmunogenicidad debido al bajo peso molecular. En tal caso, el péptido se une a un portador, o se prepara un péptido MAP mediante el método del péptido multiantigénico (MAP) para conferir a la molécula un peso molecular suficiente para desarrollar la inmunogenicidad con el fin de permitir su uso para un antígeno.

Los portadores a modo de ejemplo unidos a tal péptido incluyen una proteína transportadora y un polímero. La proteína transportadora empleada puede ser una proteína foránea tal como albúmina sérica bovina, hemocianina de lapa californiana (KLH), tiroglobulina y ovoalbumina. Estas proteínas transportadoras pueden unirse al péptido por medio del grupo funcional en la cadena lateral del aminoácido del péptido o una proteína transportadora de este tipo, o mediante la incorporación del grupo maleimida, el grupo N-hidroxisuccinimida (NHS) o el grupo aldehído. Los polímeros a modo de ejemplo incluyen azúcares tales como manano y quitosano, y polivinilpirrolidona (PVA). Estos polímeros pueden unirse al péptido mediante adsorción o enlace químico tal como se mencionó anteriormente.

La producción del fragmento de CD14 soluble recombinante de la presente invención usado para el antígeno puede llevarse a cabo tal como se describe para los aspectos segundo y tercero de la presente invención. Cuando se usa tal fragmento para el antígeno, puede usarse para el inmunógeno o bien sin tratamiento adicional o bien tras la unión a un portador o similar.

El anticuerpo descrito en el presente documento puede producirse mediante un método conocido en la técnica (por ejemplo, véase "Experimental Methods in Immunology" editado y publicado por la Japanese Society for Immunology). Por ejemplo, puede producirse un anticuerpo policlonal mediante el procedimiento tal como se describe a continuación.

Se mezclan de 20 a 1000 µg del inmunógeno preparado tal como se describió anteriormente con un adyuvante tal como adyuvante completo de Freund, adyuvante RIBI o ALUM para su uso en la inmunización de diversos animales. Los animales a modo de ejemplo usados incluyen caballo, oveja, cabra, cerdo, conejo, rata y ratón. La inmunización puede lograrse, por ejemplo, mediante administración intramuscular, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intraperitoneal, administración en los ganglios linfático, u otro método, y tras la administración inicial, puede administrarse una dosis de refuerzo al animal en un intervalo de 1 a 4 semanas

mediante la administración del inmunógeno mezclado con un adyuvante tal como adyuvante incompleto de Freund, adyuvante RIBI o ALUM de manera similar o mediante la adición directa del inmunógeno en vena. Puede prepararse un antisuero mediante la recogida de la sangre del animal inmunizado mediante cualquier método de recogida de sangre usado comúnmente en la técnica, por ejemplo, de la arteria carótida, vena de la oreja, corazón, vena de la pierna, o similar, y la separación del suero, por ejemplo, mediante centrifugación. Entonces se precipita con sales la fracción de globulina mediante la adición de sulfato de amonio, sulfato de sodio, o similar para su precipitación. Se dializa el precipitado frente a un tampón apropiado, y se somete a una matriz de afinidad tal como proteína A o proteína G que puede purificar específicamente la globulina para obtener el anticuerpo policlonal purificado de la fracción de IgG frente al péptido diana. El producto puede purificarse específicamente mediante la selección de un anticuerpo que se une específicamente al antígeno tal como se describió anteriormente.

Puede producirse un anticuerpo monoclonal mediante el procedimiento tal como se describe a continuación.

Se fusiona un inmunocito del mamífero inmunizado, con una célula de mieloma para producir un hibridoma, y se selecciona el clon que produce un anticuerpo que se une específicamente al péptido tal como se describió anteriormente para producir el anticuerpo de la presente invención. El inmunógeno usado es preferiblemente un péptido que comprende al menos 10 residuos de aminoácido consecutivos, más preferiblemente al menos 12 residuos de aminoácido consecutivos, y lo más preferiblemente 16 residuos de aminoácido consecutivos de las posiciones 53 a 68.

El mamífero inmunizado no está limitado particularmente. Sin embargo, el mamífero se selecciona preferiblemente teniendo en cuenta la compatibilidad con la célula de mieloma usada para la fusión celular, y se prefiere el uso de un mamífero tal como ratón, rata y hámster. Pueden emplearse diversas células de mieloma conocidas incluyendo células de mieloma tales como P3, P3U1, SP2/O, NS-1, YB2/O y Y3-Ag1.2.3.

La inmunización puede lograrse mediante el método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante la administración del antígeno en la cavidad peritoneal, bajo la piel, en vena o en la almohadilla de la pata. Esta administración de antígeno puede combinarse con la administración del adyuvante, y el antígeno se administra preferiblemente dos o más veces. El inmunocito es preferiblemente un esplenocito o una célula del ganglio linfático recogida varios días, por ejemplo, 3 días tras la administración final del antígeno. La fusión del inmunocito y la célula de mieloma puede llevarse a cabo mediante un método conocido en la técnica tal como el método de Milstein (Methods in Enzymol., vol. 73, página 3), usando un agente de fusión tal como polietilenglicol (PEG), o mediante un método de electrofusión.

La razón de mezclado del inmunocito y la célula de mieloma no está limitada particularmente siempre que estas células puedan fusionarse entre sí. Sin embargo, la célula de mieloma se usa preferiblemente a de 1/10 a una cantidad igual del inmunocito. Cuando las células se fusionan usando PEG (peso molecular promedio, de 1.000 a 4.000), PEG se usa preferiblemente a una concentración del 50% aunque la concentración no está limitada particularmente. También puede añadirse un promotor de fusión tal como dimetilsulfóxido (DMSO) para mejorar la eficacia de fusión. La fusión puede iniciarse mediante la adición de la disolución de PEG que se ha calentado hasta una temperatura de 37°C, y tras permitir que la reacción avance durante de 1 a 5 minutos, puede completarse la reacción mediante la adición del medio de cultivo. El hibridoma así formado puede cultivarse durante de 1 a 7 días sobre un cultivo selectivo tal como un cultivo que contiene hipoxantina, timidina y aminopterina (medio HAT) para separar las células que no pudieron fusionarse.

El hibridoma resultante se selecciona además basándose en el tipo del anticuerpo producido. El hibridoma seleccionado se hace monoclonal por medio del método de dilución limitante conocido en la técnica para establecer de ese modo el hibridoma que produce anticuerpo monoclonal. Puede detectarse la actividad del anticuerpo producido por el hibridoma mediante un método conocido en la técnica tal como ELISA, aglutinación o radioinmunoensayo. El así hibridoma establecido puede cultivarse mediante un método conocido en la técnica para obtener de ese modo el anticuerpo monoclonal a partir del sobrenadante de cultivo. Alternativamente, el hibridoma puede administrarse a un mamífero que tiene compatibilidad con el hibridoma particular para su propagación, y el anticuerpo monoclonal puede recogerse de la ascitis. La purificación del anticuerpo puede lograrse mediante precipitación con sales, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, u otros medios de purificación.

Tal como se describe en la sección del método de diagnóstico según el cuarto aspecto de la presente invención, el valor medido puede fluctuar por el efecto de la estabilidad del antígeno CD14 soluble y la CD14 de alto peso molecular de la presente invención. Por tanto, para mejorar el rendimiento del kit, el anticuerpo usado es preferiblemente el que tiene una alta especificidad por el antígeno CD14 soluble así como baja reactividad con la sustancia que puede cambiar durante el almacenamiento provocando la fluctuación del valor de medición. Un anticuerpo usado para constituir el kit puede cribarse para obtener de ese modo un anticuerpo que no provoca tal fluctuación.

<Sexto aspecto>

El sexto aspecto descrito en el presente documento es un método para someter a ensayo inmunológicamente "el

antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención” en el que al menos un anticuerpo que se une específicamente a “el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención” o un fragmento del mismo se permite que se una específicamente a “el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención”.

- 5 El método de ensayo según el sexto aspecto descrito en el presente documento es un método para someter a ensayo inmunológicamente “el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención” que no detecta la CD14 humana de alto peso molecular; que usa al menos un anticuerpo que se une específicamente a “el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención”; y que somete a ensayo directamente “el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención” en la muestra. Tal como se describe en el presente documento, el método de ensayo usa uno cualquiera de los siguientes anticuerpos a) a d) o un fragmento de un anticuerpo de este tipo:

a) un anticuerpo que se une específicamente a un péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2;

- 15 b) un anticuerpo producido usando un péptido que comprende de 8 a 16 residuos de aminoácido consecutivos seleccionados de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 2 para el antígeno;

c) un anticuerpo producido usando un péptido que comprende 16 residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2 para el antígeno; y

- 20 d) un anticuerpo que se une específicamente al fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención o el fragmento de CD14 soluble recombinante según el tercer aspecto descrito en el presente documento.

Tal como se describe en el presente documento, este método de ensayo es un método de ensayo que comprende el uso del anticuerpo a), c) o d) o un fragmento de un anticuerpo de este tipo. Todavía más preferiblemente, este método de ensayo es un kit de ensayo que comprende el anticuerpo d) o un fragmento del mismo. En la descripción anterior, el fragmento de anticuerpo puede ser Fab, Fab' o F(ab')₂ de tal anticuerpo monoclonal.

- 25 Este método de ensayo también es un método de ensayo para someter a ensayo “el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención” en el que se usa una segunda sustancia de unión que se une a “el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención” para llevar a cabo un inmunoensayo de tipo sándwich entre un anticuerpo de uno cualquiera de los anteriores a) a d) o un fragmento del mismo y la segunda sustancia de unión para someter a ensayo “el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención”.

- 30 El anticuerpo de uno cualquiera de los anteriores a) a d) puede usarse como anticuerpo en fase sólida, anticuerpo marcado o similar. El método de ensayo también incluye los que utilizan una segunda unión específica, y un anticuerpo anti-inmunoglobulina. En tal caso, el anticuerpo que es uno cualquiera de a) a d) puede usarse como anticuerpo libre, segunda sustancia de unión específica o anticuerpo que se une a la pareja de la segunda unión específica.

El método de ensayo de la presente invención puede llevarse a cabo mediante inmunoensayo de tipo sándwich que puede ser o bien no competitivo o bien competitivo, y también están incluidos la inmunocromatografía, el análisis de la fracción retenida, y similares.

- 40 El principio de ensayo del método de ensayo de la presente invención no se limita al inmunoensayo de tipo sándwich, y también pueden emplearse otros métodos tales como aglutinación, método de unión a fase sólida y método de reacción en disolución.

Un método de ensayo detallado y método de ensayo preferido son tal como se describen para la sección del kit según el quinto aspecto descrito en el presente documento.

<Séptimo aspecto>

- 45 El séptimo aspecto descrito en el presente documento es un anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención. Sin embargo, este aspecto de la presente invención incluye los siguientes anticuerpos a) a d) que también se describen en los ejemplos del documento WO2004/44005 (que se publicó después de la fecha de prioridad de esta solicitud), y hay cierto solapamiento. Por tanto, el anticuerpo que se une específicamente al fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención puede incluir algunos de los siguientes a) a d). El anticuerpo del segundo aspecto de la presente invención y los anticuerpos de los siguientes a) a d) pueden distinguirse claramente excluyendo el anticuerpo del siguiente anticuerpo a) a d) del anticuerpo del segundo aspecto de la presente invención.

a) un anticuerpo preparado usando un péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2 para el antígeno;

b) un anticuerpo policlonal preparado usando un péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 para el antígeno,

c) anticuerpo F1031-8-3, y

d) anticuerpo F1106-13-3.

- 5 Ha de observarse que el documento WO2004/44005 también describe un anticuerpo que se une al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5; y un anticuerpo, que se une a un péptido que comprende de 8 a 30 residuos de aminoácido consecutivos de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 6 para el antígeno. Por otra parte, el anticuerpo que se une específicamente al fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención puede incluir algunos de tales anticuerpos. Para una distinción clara, tales anticuerpos pueden excluirse del anticuerpo que se une específicamente al fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención.

- 10 "El anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" según el séptimo aspecto descrito en el presente documento no se une sustancialmente a la proteína CD14 soluble de longitud completa en sangre humana o rsCD14(1-356), y es preferiblemente un anticuerpo que se une específicamente al fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención. También es preferiblemente un anticuerpo que sea un anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo de la presente invención puede prepararse usando el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención para el antígeno.

- 20 El uso del anticuerpo según el séptimo aspecto permite el ensayo del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención, y la constitución del "kit de ensayo para someter a ensayo el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" según el quinto aspecto descrito en el presente documento.

<Octavo aspecto>

- 25 El octavo aspecto descrito en el presente documento es un anticuerpo que se une específicamente al fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención. Sin embargo, este aspecto incluye los siguientes anticuerpos a) a d) que también se describen en los ejemplos del documento WO2004/44005 (que se publicó después de la fecha de prioridad de esta solicitud), y hay cierto solapamiento. Por tanto, el anticuerpo que se une específicamente al fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención puede incluir algunos de los siguientes a) a d). El anticuerpo del segundo aspecto de la presente invención y los anticuerpos de los siguientes a) a d) puede distinguirse claramente excluyendo el anticuerpo del siguiente anticuerpo a) a d) del anticuerpo del segundo aspecto de la presente invención.

a) un anticuerpo preparado usando un péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2 para el antígeno;

- 35 b) un anticuerpo policlonal preparado usando un péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 para el antígeno,

c) anticuerpo F1031-8-3, y

d) anticuerpo F1106-13-3.

- 40 Ha de observarse que el documento WO2004/44005 también describe un anticuerpo que se une al péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 5; y un anticuerpo, que se une a un péptido que comprende de 8 a 30 residuos de aminoácido consecutivos de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 6 para el antígeno. Por otra parte, el anticuerpo que se une específicamente al fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención puede incluir algunos de tales anticuerpos. Para una distinción clara, tales anticuerpos pueden excluirse del anticuerpo que se une específicamente al fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención.

- 45 "El anticuerpo que se une específicamente al fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención" según el octavo aspecto de la presente invención es preferiblemente un anticuerpo que no se une sustancialmente a la proteína CD14 soluble de longitud completa en sangre humana o rsCD14(1-356), mientras que se une específicamente al fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención. También es preferiblemente un anticuerpo que es un anticuerpo monoclonal.

- 50 El anticuerpo descrito en el presente documento puede prepararse usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para el antígeno.

Un anticuerpo particular y preferido descrito en el presente documento es el anticuerpo F1237-3-4. El hibridoma que produce este anticuerpo F1237-3-4 se ha depositado internacionalmente en el Instituto Nacional de Ciencia y

Tecnología Industrial Avanzada (Instituto Administrativo Independiente), Organismo Internacional para el Depósito de Patentes (Chuo-dairoku, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón) con el n.º de registro FERM ABP-10330.

El uso del anticuerpo según el octavo aspecto descrito en el presente documento permite el ensayo del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención, y la constitución del "kit de ensayo para someter a ensayo el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" según el quinto aspecto descrito en el presente documento.

El "kit de ensayo para el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" según el quinto aspecto descrito en el presente documento no detecta la CD14 de alto peso molecular. Éste es el motivo por el que se prefiere un anticuerpo que no se une sustancialmente a la proteína CD14 soluble de longitud completa en sangre humana. Este también es el motivo por el que se prefiere el anticuerpo monoclonal para su uso en el kit de ensayo. Además, un anticuerpo que no se une sustancialmente a la proteína CD14 soluble de longitud completa en la sangre humana o el rsCD14(1-356) es particularmente ventajoso puesto que el ensayo puede llevarse a cabo usando el anticuerpo solo sin llevar a cabo el inmunoensayo de tipo sándwich usando la segunda sustancia de unión.

Tal como se describió anteriormente, el documento WO2004/44005 describe un anticuerpo que se une a un péptido que comprende los residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 5; un anticuerpo preparado usando un péptido que comprende de 8 a 30 residuos de aminoácido consecutivos seleccionados de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 6 para el antígeno; y el anticuerpo F1031-8-3 y el anticuerpo F1106-13-3 que son respectivamente un anticuerpo anti-CD14. La ventaja de estos anticuerpos es que pueden usarse en un kit de ensayo para someter a ensayo la CD14 de bajo peso molecular que es eficaz para diagnosticar la septicemia. Sin embargo, los anticuerpos descritos en el documento WO2004/44005 no se han probado para su relación directa con el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención, y la situación de la invención del documento WO2004/44005 es que, cuando el péptido o la CD14 dados a conocer en el documento WO2004/44005 se usaron como antígeno en la producción del kit, el producto podía incorporarse de forma útil en el kit de ensayo de CD14 de bajo peso molecular para septicemia.

Por otra parte, el anticuerpo descrito en el presente documento puede usarse en el "un kit de ensayo para el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" según el quinto aspecto descrito en el presente documento. Además, "el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención" tiene naturaleza inmunológica similar al antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención, y el anticuerpo no puede usarse en el kit de ensayo para "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" si no fuese un anticuerpo que se une a este fragmento (concretamente, si no fuese el anticuerpo descrito en el presente documento).

El único anticuerpo que se ha conocido y que puede usarse en el kit de ensayo para "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" es el anticuerpo mencionado anteriormente descrito en el documento WO2004/44005, y el único anticuerpo que se une a "el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención" también es el anticuerpo mencionado anteriormente descrito en el documento WO2004/44005. También se ha revelado que diversos anticuerpos anti-CD14 no se unen a "el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención".

En otras palabras, el anticuerpo descrito en el presente documento es una invención que da a conocer y cubre por completo los anticuerpos que pueden usarse en "el kit de ensayo para el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención". Además, el anticuerpo preparado usando "el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención" para el antígeno muestra una alta reactividad inmunológica con "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención", y por tanto, un anticuerpo de este tipo debe ser particularmente útil.

<Noveno aspecto>

El noveno aspecto descrito en el presente documento es un anticuerpo que se une específicamente al fragmento de CD14 soluble recombinante según el tercer aspecto descrito en el presente documento.

El anticuerpo según el noveno aspecto puede prepararse usando el fragmento de CD14 soluble recombinante según el tercer aspecto de la presente invención para el antígeno.

Los ejemplos preferidos del anticuerpo según el noveno aspecto son los mismos que los del octavo aspecto descrito en el presente documento. La utilidad y otras características del anticuerpo también son las mismas.

<Décimo aspecto>

El décimo aspecto descrito en el presente documento es un método para cribar un anticuerpo que es útil en el ensayo del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención, y este método comprende las siguientes etapas de:

1) preparar anticuerpos que se unen específicamente a un péptido que comprende de 6 a 20 residuos de aminoácido consecutivos seleccionados de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 3;

2) preparar una disolución de analito que contiene la CD14;

5 3) constituir un sistema de inmunoensayo usando los anticuerpos preparados en el punto 1) o la disolución de analito preparada en el punto 2);

4) someter a ensayo la sustancia que se une específicamente a los anticuerpos preparados en el punto 1) en la disolución de analito usando el sistema de inmunoensayo constituido en el punto 3); y

5) evaluar y seleccionar el anticuerpo útil en el ensayo del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención basándose en el resultado de ensayo obtenido en el punto 4).

10 El método de cribado según el décimo aspecto descrito en el presente documento es un método para cribar un anticuerpo que es útil en el ensayo del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención que puede servir como marcador eficaz para diagnosticar septicemia. Es decir, éste es un método para seleccionar un anticuerpo que es útil en el ensayo del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención que puede servir como marcador eficaz para diagnosticar septicemia. Este método también es un método para
15 seleccionar un anticuerpo que puede usarse en el kit según el quinto aspecto descrito en el presente documento.

El método de cribado según el décimo aspecto descrito en el presente documento se caracteriza porque "el anticuerpo que se une específicamente a un péptido que comprende de 6 a 20 residuos de aminoácido consecutivos seleccionados de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 3" preparada en la etapa 1) se usa para el objeto sometido a cribado. Tal como se describe, el objeto sometido a cribado preparado es "el anticuerpo que se
20 une específicamente a un péptido que comprende de 6 a 20 residuos de aminoácido consecutivos seleccionados de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 3". Un fragmento de un anticuerpo de este tipo también puede usarse para el objeto sometido a cribado siempre que el fragmento conserve la capacidad de experimentar la reacción antígeno-anticuerpo con el antígeno. (La siguiente descripción del anticuerpo también incluye la descripción para el fragmento del anticuerpo).

25 La disolución de analito del punto 2) no está limitada particularmente siempre que contenga CD14. Sin embargo, la disolución de analito es preferiblemente una disolución que contiene al menos la CD14 de alto peso molecular.

El sistema de inmunoensayo constituido en el punto 3) no está limitado particularmente siempre que pueda determinar si el anticuerpo objeto de cribado puede reaccionar específicamente con la CD14 en la disolución de analito. Los sistemas de inmunoensayo a modo de ejemplo incluyen inmovilización de antígeno, ensayo de tipo
30 sándwich o análisis de interacción biomolecular. Sin embargo, el sistema de inmunoensayo puede aplicar los métodos descritos para el quinto aspecto o el sexto aspecto descritos en el presente documento.

La etapa 4) se lleva a cabo según el sistema de inmunoensayo constituido en la etapa 3), se somete a ensayo la sustancia que se une específicamente al anticuerpo preparado en el punto 1) usando la disolución de analito para el objeto de los análisis.

35 La etapa 5) es una etapa en la que el anticuerpo objeto de cribado se evalúa basándose en el resultado obtenido en la etapa 4) para su eficacia en el uso en el inmunoensayo para diagnosticar septicemia, y si se evalúa que es eficaz, el anticuerpo objeto de cribado se selecciona para su uso en el inmunoensayo para diagnosticar septicemia. Los criterios no están limitados particularmente.

40 Tal como se describió anteriormente, el método de cribado según el sexto aspecto descrito en el presente documento se caracteriza porque el objeto sometido a cribado es "el anticuerpo que se une específicamente a un péptido que comprende de 6 a 20 residuos de aminoácido consecutivos seleccionados de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 3" preparada en la etapa 1), y otras etapas no están limitadas necesariamente.

45 El anticuerpo preparado en la etapa 1) es preferiblemente el anticuerpo que se une específicamente a un péptido que comprende de 6 a 20 residuos de aminoácido consecutivos seleccionados de la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 314 del extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 3; el anticuerpo producido usando un péptido que comprende de 8 a 30 residuos de aminoácido consecutivos seleccionados de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 3 para el antígeno; o el anticuerpo producido usando un péptido que comprende de 8 a 30 residuos de aminoácido consecutivos seleccionados de la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 314 del extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ
50 ID NO: 3 para el antígeno.

Ha de observarse que, en la etapa 1), puede prepararse un anticuerpo de los siguientes (i) a (iv) en vez de "el anticuerpo que se une específicamente a un péptido que comprende de 6 a 20 residuos de aminoácido consecutivos seleccionados de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 3". (i) El anticuerpo preparado sintetizando el péptido basándose en la secuencia de longitud completa de la CD14 mediante un método usado comúnmente en la técnica, y preparando un antígeno de inmunización para producir el anticuerpo. (ii) El anticuerpo preparado
55

purificando la CD14 soluble purificada en el suero y usando la CD14 soluble purificada para el inmunógeno para producir el anticuerpo. (iii) El anticuerpo preparado preparando una proteína CD14 recombinante usando célula COS o *E. coli*, y usando esta proteína CD14 recombinante para el inmunógeno para producir el anticuerpo. (iv) El anticuerpo preparado tratando un antígeno CD14 mediante desnaturalización térmica o tratamiento con DNP, y usando el producto tratado para el inmunógeno para producir el anticuerpo.

A continuación, se describe en el presente documento que el sistema de inmunoensayo constituido en la etapa 3) es inmovilización de antígeno.

Tal como se describe, se prepara además un anticuerpo marcado para el anticuerpo preparado en la etapa 1), por ejemplo, un anticuerpo anti-inmunoglobulina marcado.

En la etapa 2), la disolución de analito preparada es preferiblemente un líquido corporal de un donante normal o una muestra convencional de CD14 de alto peso molecular humana. La muestra convencional de la CD14 humana de alto peso molecular preparada puede ser, por ejemplo, la fracción del líquido corporal de un donante normal adsorbida por una columna de afinidad con anticuerpo 3C10.

El sistema de inmunoensayo puede constituirse, por ejemplo, de modo que se forme un complejo de "la CD14 de alto peso molecular en la disolución de analito" - "el anticuerpo preparado en la etapa 1)" - "anticuerpo anti-inmunoglobulina marcado" sobre el portador insoluble, y en este caso, se somete a ensayo la unión específica de "el anticuerpo preparado en la etapa 1)" a "la CD14 de alto peso molecular en la disolución de analito" por medio del marcador. Por ejemplo, la disolución de analito puede unirse un portador insoluble en la etapa 3), y en la etapa 4), en el sistema de ensayo dot blot constituido en la etapa 3), el anticuerpo preparado en el punto 1) y el "anticuerpo anti-inmunoglobulina marcado" puede hacerse reaccionar en este orden. Entonces puede evaluarse el grado de formación del complejo mediante la intensidad del marcador, concretamente, mediante la medición de la sustancia que ha reaccionado específicamente con el anticuerpo preparado en la etapa 1) en la disolución de analito.

En el punto 5), por ejemplo, puede evaluarse que el anticuerpo preparado en la etapa 1) que mostró débil o escasa intensidad de marcaje presenta débil o escasa unión específica a la CD14 de alto peso molecular en el líquido corporal del donante normal o la muestra convencional de CD14 humana de alto peso molecular, y tal anticuerpo puede seleccionarse como un anticuerpo que es eficaz para su uso en el inmunoensayo de diagnóstico de septicemia. Por ejemplo, cuando se usa un anticuerpo que se ha evaluado que tiene una fuerte capacidad de unión a la CD14 de alto peso molecular en la sangre para medir la sustancia en líquido corporal humano que se une específicamente a un anticuerpo de este tipo, la proteína principal que se mide será la CD14 de alto peso molecular. En tal caso, si va a medirse el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención que está presente a un contenido menor que la CD14 de alto peso molecular, puede seleccionarse un anticuerpo que no se une específicamente a la CD14 de alto peso molecular para su uso en el ensayo.

El ensayo será un EIA con antígeno inmovilizado cuando se usa una enzima para el marcador en el método de inmovilización de antígeno, y un método de transferencia puntual cuando se usa una membrana para el portador insoluble.

A continuación, se describe con mayor detalle cuando el inmunoensayo constituido en la etapa 3) de la presente invención es un ensayo de tipo sándwich.

Con respecto al inmunoensayo de tipo sándwich, este ensayo puede llevarse a cabo tal como se describe para el kit según el quinto aspecto descrito en el presente documento o el método de ensayo según el quinto aspecto descrito en el presente documento.

En este caso, se prepara otro anticuerpo que se une específicamente a un péptido que comprende de 6 a 20 residuos de aminoácido consecutivos seleccionados de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 3 o un anticuerpo anti-CD14 (denominado a veces a continuación en el presente documento segundo anticuerpo).

Las disoluciones de analito preparadas en la etapa 2) son preferiblemente un líquido corporal de un donante normal y un líquido corporal de un paciente con septicemia. En este caso, el líquido corporal del donante normal y el líquido corporal del paciente con septicemia son preferiblemente los recogidos de la misma fuente, por ejemplo, una muestra de sangre del donante normal y una muestra de sangre del paciente con septicemia, o una muestra de orina del donante normal y la muestra de orina del paciente con septicemia. La muestra es preferiblemente una muestra de sangre, y más preferiblemente, una muestra de suero.

Y entonces, el sistema de inmunoensayo de tipo sándwich se constituye sobre el portador insoluble, por ejemplo, para formar un complejo de "el anticuerpo preparado en la etapa 1)" - "el antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención" - "el segundo anticuerpo".

Por ejemplo, en la etapa 3), uno cualquiera de "el anticuerpo preparado en la etapa 1)" y "el segundo anticuerpo" se une al portador insoluble, y el otro se marca para constituir el sistema de inmunoensayo de tipo sándwich.

En la etapa 4), se permite que reaccionen la disolución de analito y el anticuerpo marcado con el sistema de

inmunoensayo de tipo sándwich constituido en la etapa 3).

En la etapa 5), se comparan el resultado de ensayo para el líquido corporal del donante normal y el resultado de ensayo para el líquido corporal del paciente con septicemia, y se selecciona un anticuerpo que es útil en el ensayo del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención basándose en la evaluación de la diferencia entre los resultados de ensayo comparados.

Cuando el inmunoensayo constituido en la etapa 3) es un ensayo de tipo sándwich, la selección de anticuerpo se lleva a cabo preferiblemente para seleccionar de ese modo una combinación del anticuerpo preparado en la etapa 1) y "el segundo anticuerpo". Más específicamente, se lleva a cabo preferiblemente un cribado para seleccionar una combinación de anticuerpos usada para someter a ensayo proteína sanguínea que puede servir como marcador eficaz para el diagnóstico de septicemia, concretamente, una combinación de anticuerpos para inmunoensayo de tipo sándwich eficaz para el diagnóstico de septicemia.

Los anticuerpos usados para el método de cribado descrito en el presente documento pueden prepararse según la descripción de la sección del kit de ensayo según el quinto aspecto descrito en el presente documento. Los materiales usados son también tal como se describen para el kit de ensayo según el quinto aspecto descrito en el presente documento.

El análisis de interacción biomolecular usado no está limitado particularmente. Sin embargo, tal análisis a modo de ejemplo es el análisis de resonancia de plasmón superficial, que puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante sistemas de análisis de interacción biomolecular (fabricados por Biacore).

<Undécimo aspecto>

El undécimo aspecto descrito en el presente documento es un método para cribar un anticuerpo que es útil en el ensayo del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención, comprendiendo dicho método las etapas de:

1) preparar anticuerpos para cribado;

2) preparar el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención;

3) hacer reaccionar los anticuerpos preparados en el punto 1) con el fragmento preparado en el punto 2) para evaluar la unión específica entre los anticuerpos preparados en el punto 1) y el fragmento preparado en el punto 2); y

4) seleccionar el anticuerpo que experimentó unión específica con el fragmento preparado en el punto 2) en la etapa 3) como el anticuerpo que es útil en el ensayo del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención.

El método de cribado según el undécimo aspecto descrito en el presente documento es un método para cribar un anticuerpo que es útil en el ensayo del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención que puede servir como marcador eficaz para diagnosticar septicemia, concretamente, un método para seleccionar un anticuerpo que es útil en el ensayo del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención que puede servir como marcador eficaz para diagnosticar septicemia. Este método de cribado también es un método para seleccionar un anticuerpo que puede usarse en el kit según el quinto aspecto descrito en el presente documento.

El método de cribado según el undécimo aspecto descrito en el presente documento se caracteriza porque se lleva a cabo una evaluación haciendo reaccionar el anticuerpo objeto de cribado con el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención para evaluar si experimenta una reacción específica, concretamente, una reacción antígeno-anticuerpo. Tal como se describe en la sección del segundo aspecto de la presente invención, el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención no experimenta reacción específica con 3C10 o MEM-18 sino con el anticuerpo producido usando el péptido que comprende los 16 residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2 para el antígeno. Esto es la misma naturaleza inmunológica que la del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención. Debido a esta naturaleza inmunológica, la selección de un anticuerpo útil en el ensayo del antígeno CD14 soluble según el primer aspecto de la presente invención puede lograrse mediante la evaluación de la reacción entre el anticuerpo objeto de cribado y el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención.

En la etapa 1), el objeto sometido a cribado preparado no está limitado particularmente siempre que sea un anticuerpo. El objeto sometido a cribado también puede ser un fragmento de un anticuerpo siempre que tenga la función de experimentar una reacción antígeno-anticuerpo con otro antígeno. (La siguiente descripción del anticuerpo también se aplica a un fragmento de un anticuerpo de este tipo.)

Con el fin de mejorar la eficacia de cribado, el objeto sometido a cribado preparado es preferiblemente "un

anticuerpo que se une específicamente a una proteína que comprende uno cualquiera de de 6 a 356 residuos de aminoácido consecutivos seleccionados de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 3", y más preferiblemente, "un anticuerpo que se une específicamente a una proteína que comprende al menos 7 residuos de aminoácido consecutivos seleccionados de las posiciones 53 a 68 de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 3".

El fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención preparado en la etapa 2) no está limitado particularmente siempre que sea un fragmento de CD14 soluble recombinante descrito en la sección del segundo aspecto de la presente invención.

El método usado en la etapa 3) para hacer reaccionar el anticuerpo preparado en la etapa 1) con el fragmento preparado en la etapa 2) para evaluar la unión específica entre el anticuerpo preparado en la etapa 1) y el fragmento preparado en la etapa 2) no está limitado particularmente siempre que pueda evaluar si ambos reactantes presentan unión específica, concretamente, una reacción antígeno-anticuerpo. Los métodos a modo de ejemplo incluyen inmovilización de antígeno, ensayo de tipo sándwich y análisis de interacción biomolecular, que son tal como se describen en la sección que explica el décimo aspecto de la presente invención. Cuando se evalúa la unión específica mediante un inmunoensayo de tipo sándwich usando un segundo anticuerpo, se permitirá la evaluación de la combinación de anticuerpos en el ensayo de tipo sándwich.

<Duodécimo aspecto>

El duodécimo aspecto de la presente invención es un método para producir el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención, que comprende las etapas de:

(i) producir un fragmento de CD14 soluble recombinante que tiene la secuencia caracterizada por los siguientes puntos 1) a 4):

1) un fragmento que tiene una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 3, o un fragmento que tiene tal secuencia parcial en la que se han delecionado, añadido o sustituido de 1 a 10 aminoácidos en la región distinta a las posiciones 53 a 68 de SEQ ID NO: 3;

2) el extremo N-terminal es una cualquiera de las posiciones 1 a 17 de SEQ ID NO: 3;

3) el extremo C-terminal es una cualquiera de las posiciones 134 a 356 en SEQ ID NO: 3;

4) se ha incorporado una secuencia de un sitio de escisión para una proteasa predeterminada en el sentido de 3' de una cualquiera de las posiciones 59 a 70 de SEQ ID NO: 3 mediante sustitución o inserción;

(ii) escindir el fragmento de CD14 soluble recombinante preparado en (i) con la proteasa predeterminada; y

(iii) recuperar el fragmento del lado N-terminal escindido en ii); en la que el fragmento de CD14 soluble recombinante producido tiene la secuencia caracterizada por los siguientes puntos 5) a 7):

5) un fragmento que tiene una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 3, o un fragmento que tiene tal secuencia parcial en la que se han delecionado, añadido o sustituido de 1 a 10 aminoácidos en la región distinta a las posiciones 53 a 68 de SEQ ID NO: 3;

6) el extremo N-terminal es una cualquiera de las posiciones 1 a 17 de SEQ ID NO: 3; y

7) el extremo C-terminal es una cualquiera de las posiciones 59 a 70 en SEQ ID NO: 3.

"El método para producir el fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención" según el duodécimo aspecto de la presente invención puede producir un fragmento de CD14 soluble recombinante según el segundo aspecto de la presente invención que tiene la secuencia de aminoácidos predeterminada. El método de producción detallado es tal como se describe en la sección del segundo aspecto de la presente invención.

Por ejemplo, cuando la proteasa predeterminada es la proteasa PreScission, la secuencia del sitio de escisión en la etapa i) 4) es Leu, Glu, Val, Leu, Phe, Gln, Gly, Pro.

Cuando la proteasa predeterminada es trombina, la secuencia del sitio de escisión en la etapa i) 4) es Leu, Val, Pro, Arg, Gly, Ser.

Ejemplos

A continuación en el presente documento, se describirá la presente invención de manera más concreta por medio de los ejemplos. Sin embargo, los ejemplos son sólo a modo de ejemplo y la presente invención no debe interpretarse en modo alguno que se limite a los mismos. Además, los símbolos usados en la siguiente descripción se basan en los símbolos según una convención en la técnica.

Se adquirieron los fabricados por ProMedDx, Samplex y Sera Care Life Science y se usaron como sueros de donantes normales y sueros de pacientes que presentaban septicemia usados en los siguientes ejemplos.

(Ejemplo 1) Preparación de anticuerpo policlonal usando péptido sintético como antígeno

1-(1) Preparación de péptido como antígeno

- 5 Para unir un péptido que tiene la secuencia descrita en SEQ ID NO: 2 (correspondiente a una secuencia en las posiciones 53 a 68 descrita en SEQ ID NO: 3) (descrita a continuación en el presente documento como el péptido S68) a una proteína transportadora en el extremo N-terminal de la misma a través de un grupo SH, se sintetizó el péptido mediante la inserción de cisteína en el extremo N-terminal. Es decir, usando un sintetizador de péptidos ABI433A (Applied), se alinearon columnas de aminoácidos según la secuencia de aminoácidos y se puso una
- 10 columna de aminoácidos para cisteína en el extremo N-terminal, seguido por la realización de síntesis automática. Se cortó el péptido sintetizado de una resina mediante un procedimiento convencional y se precipitó entonces con etil éter, se recuperó, y se disolvió en agua destilada de nuevo, seguido por liofilización. Tras haberse disuelto el péptido en bruto resultante, se eluyó el péptido con un gradiente lineal de concentración de acetonitrilo del 5-70% usando una HPLC de fase inversa C18 (CAPCELL-PAK, Shiseido Co., Ltd.), seguido por la recogida de una fracción
- 15 que contiene un péptido diana. Se liofilizó la fracción recogida y se obtuvieron de 2 a 3 mg de péptido purificado.

1-(2) Preparación de antígeno portador de péptido usando péptido sintético

- Se disolvió un péptido preparado en el punto 1-(1) en agua destilada hasta 10 mg/ml y se mezcló la disolución con 10 mg/ml de hemocianina de lapa californiana activada por maleimida (hemocianina de lapa californiana (KLH) activada por maleimida Imject (PIERCE)) en cantidades equivalentes. Tras haber reaccionado la mezcla durante 2
- 20 horas a temperatura ambiente, se desaló la mezcla de reacción mediante una columna NAP-10 (Amersham Biosciences) que se equilibró con solución salina fisiológica para obtener 1 mg de antígeno portador de péptido S68 (descrito a continuación en el presente documento como el péptido S68-KLH). La concentración de las proteínas descritas en los siguientes ejemplos se obtuvo dividiendo la cantidad de KLH usada entre la cantidad de líquido.

1-(3) Preparación de anticuerpo policlonal usando péptido sintético como antígeno

- 25 Para preparar un anticuerpo policlonal frente al péptido S68-KLH preparado en 1-(2), se inmunizó un conejo usando el péptido S68-KLH. Es decir, se diluyeron 100 µg de cada uno del péptido S68-KLH con 500 µl de solución salina fisiológica y se mezcló la disolución con 500 µl de adyuvante completo de Freund (DIFCO) en cantidades equivalentes, seguido por la administración subcutánea de la mezcla en el dorso de conejo hembra blanco de Nueva Zelanda (Kitayama Labes Co., Ltd.) que pesaba de 2,1 a 2,2 kg. Tras 2 semanas, diluyeron 100 µg de cada uno del
- 30 péptido S68-KLH con 500 µl de solución salina fisiológica y se mezcló la disolución con 500 µl de adyuvante incompleto de Freund (DIFCO) en cantidades equivalentes, seguido por la administración subcutánea de la mezcla en el dorso. Tras 2 semanas adicionales desde entonces, se diluyeron 100 µg del péptido S68-KLH con 1 ml de solución salina fisiológica y se administró la disolución en una vena de la oreja.

- Tras 1 semana desde la finalización de la administración, se recogió sangre de la vena de la oreja y se separó el
- 35 suero de la sangre mediante procedimientos de rutina y se purificó un anticuerpo. En primer lugar, se añadió sulfato de amonio al suero hasta una concentración de saturación final del 33%. Tras haberse agitado la mezcla durante 1 hora a 4°C, se centrifugó el precipitado separado. Entonces, se disolvió el precipitado en un tampón fosfato 76 mM (descrito a continuación en el presente documento como PBS (pH 6,4)) y se dializó la disolución durante la noche. Tras haberse filtrado el dializado, se aplicó el filtrado a una columna con proteína A (ProSep-A, Millipore). Entonces, se eluyó una fracción de IgG de unión con un tampón clorhidrato de glicina 0,1 M (pH 3,0) para
- 40 obtener un anticuerpo purificado. Tras diálisis con PBS (pH 6,4), se calculó la concentración de proteína a partir de la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm (nivel convertido: 0,533 mg/ml). A continuación en el presente documento, se describirá el anticuerpo obtenido como un anticuerpo policlonal contra el péptido S68.

1-(4) Preparación de anticuerpo policlonal purificado específico

- 45 Para purificar sólo un anticuerpo frente al péptido S68 de los anticuerpos policlonales contra el péptido S68, se realizó una purificación específica mediante el siguiente método. En primer lugar, para unir el péptido S68 con cisteína insertada (descrito a continuación en el presente documento como péptido C-S68) a un portador a través de un grupo SH, se mezclaron 200 µg del péptido C-S68 por 1 ml de gel de acoplamiento Sufolink (PIERCE) y se hizo reaccionar según el manual del mismo. Tras la finalización de la reacción, se bloqueó el grupo activo restante y
- 50 entonces se preparó una columna de afinidad de péptido S68. A continuación, se aplicaron 7,92 mg de la fracción de IgG purificada descrita en 1-(3) y luego se lavó la columna con un tampón fosfato (pH 7,4) (Dulbecco, descrito a continuación en el presente documento como D-PBS (pH 7,4)), seguido por la elución de un anticuerpo anti-péptido S68 con tampón clorhidrato de glicina 0,1 M (pH 3,0). Tras la elución, se volvió a ajustar el pH a pH neutro y entonces se realizó diálisis con PBS, seguido por el cálculo de la concentración de proteína a partir de una
- 55 absorbancia a 280 nm (nivel convertido: 0,533 mg/ml). Como resultado, se obtuvieron 0,52 mg de un anticuerpo anti-péptido S68 (descrito a continuación en el presente documento como anticuerpo contra S68).

(Ejemplo 2) Preparación de anticuerpo monoclonal usando péptido sintético como antígeno

Se disolvieron 20 µg del péptido S68-KLH preparado en el ejemplo 1-(2) en 100 µl de solución salina fisiológica y se mezclaron con una cantidad equivalente de adyuvante completo de Freund (DIFCO), seguido por la administración de 100 µl de la mezcla a cada una de las almohadillas de las patas traseras de una rata Wister hembra de 8 semanas de edad. Tras 2 semanas, se extirpó quirúrgicamente el ganglio linfático ilíaco y se realizó fusión celular. Se llevó a cabo la fusión celular según Tamie Ando y Takeshi Chiba: "Introduction to Monoclonal Antibody Experimental Manipulation", página 83, 1991 (Kodansha Ltd.). En otras palabras, se separaron los linfocitos del ganglio linfático usando un separador celular (Falcon) y se mezclaron con células de mieloma (Sp2/O-Ag14) a una razón de 5:1, seguido por fusión celular usando polietilenglicol. Se suspendieron las células fusionadas en un medio HAT y se seleccionaron los hibridomas, seguido por el cribado de hibridomas que produce el anticuerpo diana.

Se realizó el cribado mediante un método de ELISA en el que rsCD14(1-307)S286C se inmovilizó directamente sobre una placa. Es decir, se añadieron 50 µl de rsCD14(1-307)S286C diluido con tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) a 1 µg/ml a cada pocillo de una inmunoplaaca (Maxisorb, NUNC) y se dejó en reposo durante 1 hora a 37°C. Después de eso, se lavó la placa con agua sometida a intercambio iónico 5 veces y entonces se añadieron a cada pocillo 100 µl de PBS (pH 6,4) que contenía BSA al 0,1%, seguido por dejar la placa en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente para efectuar el bloqueo. Entonces, se añadió a cada pocillo el sobrenadante de cultivo tomado como muestra de los hibridomas seleccionados y se permitió que reaccionase a 37°C durante 1 hora. Después de eso, se lavó la placa 3 veces con solución salina fisiológica que contenía Tween 20 al 0,05%.

Posteriormente, se añadieron 50 µl a cada pocillo de una disolución obtenida mediante dilución de anticuerpo anti-inmunoglobulina de rata marcado con peroxidasa (DAKO) 1000 veces con PBS que contenía suero de conejo al 10%. Tras la reacción a 37°C durante 1 hora, se lavó la placa 5 veces de la misma manera que anteriormente y se añadió a cada pocillo una disolución de tetrametilbencidina (TMB, BioFix). Tras una reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente, se detuvo la reacción con una disolución de ácido sulfúrico 0,5 M y se midió una absorbancia a 450 nm usando un espectrofotómetro de placa (NJ-2100, Japan Intermed). Como resultado, se seleccionó un pocillo que contenía hibridoma que puede producir un anticuerpo que se une a rsCD14(1-307)S286C.

A continuación, a partir del pocillo seleccionado, se realizó clonación mediante un método de dilución limitante según Tamie Ando y Takeshi Chiba: "Introduction to Monoclonal Antibody Experimental Manipulation", página 83, 1991 (Kodansha Ltd.). Tras 10 días, asimismo, se realizó un cribado usando como índice la reactividad con rsCD14(1-307)S286C y como se seleccionaron 6 clases de hibridomas. Se cultivaron los hibridomas seleccionados en FCS al 10%/medio RPMI1640 (Sigma) y entonces se cultivaron en medio de hibridoma-SFM (Invitrogen) para producir un anticuerpo. Se purificó el anticuerpo usando una columna con proteína G (columna ProSep-G, Millipore). Se determinó que el subtipo del anticuerpo F1146-17-2 purificado era IgG2b-κ de rata usando un kit de isotipado de rata (ZYMED).

A propósito, se preparó rsCD14(1-307)S286C usando el método descrito en el ejemplo 9 del documento WO 01/72993.

(Ejemplo 3) Estudio del sistema de ensayo con un método de EIA de tipo sándwich

Usando los anticuerpos descritos en los ejemplos 1 y 2, se estudió el sistema de ensayo con un método de EIA de tipo sándwich.

3-(1) Preparación de CD14 humana recombinante

En primer lugar, para preparar un anticuerpo monoclonal frente a rsCD14(1-285) que va a usarse como segundo anticuerpo en el método de ELISA de tipo sándwich, se preparó rsCD14(1-285) como inmunógeno en *E. coli*. Para expresar rsCD14(1-285) en *E. coli*, se construyó un plásmido de expresión pTrp1659 mediante el siguiente método.

En primer lugar, se sintetizaron el oligómero 8, linkS (5'-agc tta gga att t-3') (SEQ ID NO: 7) y el oligómero 8, linkA (5'-cta gaa att cct a-3') (SEQ ID NO: 8).

Se mezclaron esos oligómeros en cantidades equivalentes y se calentaron a 99°C durante 1 minuto, y entonces se hibridó la mezcla enfriándola gradualmente hasta temperatura ambiente. Además, se fosforiló el extremo 5'-terminal de los mismos mediante T4 polinucleótido cinasa para preparar un ligador.

A continuación, se sintetizaron el cebador sentido A (5'-aca tct aga tga cca cgc cag aac ct-3') (SEQ ID NO: 9) y el cebador antisentido (5'-ttt gga tcc tta cta gag atc gag cac tct-3') A (SEQ ID NO: 10) y se realizó PCR usando ADN polimerasa Pyrobest y el plásmido pM1659 descrito en el ejemplo 8 del documento WO 01/72993 como molde.

Tras haberse calentado una disolución de reacción durante 2 minutos a 90°C, se repitió 30 veces el ciclo de 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto.

El producto amplificado resultante de aproximadamente 900 pb se digirió doblemente con XbaI y BamHI para recoger fragmentos de ADN. El vector pM710 descrito en el ejemplo 10 del documento JP 06-025289 A se digirió

doblemente con HindIII y BamHI y entonces se sometió a electroforesis en gel de agarosa y se recogió. Tras ligamiento de tres vías del ligador ya fosforilado, fragmento de ADN amplificado por PCR / fragmento digerido con XbaI + BamHI y vector / fragmento de XbaI + BamHI, que se describieron anteriormente, se transformó el producto resultante en células competentes de *E. coli* (JM109 (TOYOBO)) para obtener un clon que contiene el plásmido diana. Se preparó ADN de plásmido mediante procedimientos de rutina.

Posteriormente, se preparó la cepa de transformante JE7924 para la producción de rsCD14(1-285) usando un método de electroporación.

En primer lugar, se restauró *E. coli* JE7924 (J. Bacteriol 173, pág. 4799, (1991)) a partir de una disolución madre en glicerol y se incubó en un medio LB a 37°C durante la noche. Además, se inocularon las bacterias en 50 ml de un medio LB nuevo y se incubó de manera continua hasta que la absorbancia a 600 nm alcanzó de 0,5 a 0,6, seguido por enfriamiento con hielo directamente de un matraz de cultivo durante 30 minutos. A continuación, se recogieron células de *E. coli* y se lavaron dos veces con agua destilada esterilizada enfriada con hielo y una vez con una disolución de glicerol al 10% enfriada con hielo, seguido por su suspensión en 100 µl de una disolución de glicerol al 10% enfriada con hielo. Se dispensó la suspensión en dos tubos con alícuotas de 50 µl y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido para preparar células competentes (JE7924), que se guardaron a -80°C hasta el momento de su uso.

A continuación, se transformaron 50 µl de células competentes JE7924 con aproximadamente 30 ng de pTrp1659 mediante un dispositivo de electroporación, Gene Pulser de Bio-Rad Laboratories, Inc. Además, los ajustes en este momento fueron una tensión de 2,5 kV y una resistencia de 200 Ω, y una capacitancia de 25 µF. Después de eso, se incubó el producto resultante en una placa de LB-agar que contenía 50 µg/ml de ampicilina durante la noche para obtener un clon transformado con pTrp1659. Se incubó el clon del mismo a 37°C durante la noche en un medio LB y entonces se inoculó en un medio nuevo, seguido por su incubación durante 5 horas adicionales. La DO a 600nm de la suspensión de cultivo alcanzó de 2 a 3, se añadió ácido 3-indolacrílico (Sigma) en una concentración final de 100 µg/ml y se incubó la mezcla a 37°C durante 4 horas, dando como resultado la expresión por inducción de rsCD14(1-285). A continuación, se recogió *E. coli* y entonces se preparó un cuerpo de inclusión usando el reactivo de extracción de proteínas Bug Buster (Novagen). Después de eso, se disolvió el cuerpo de inclusión en un tampón para SDS-PAGE y se llevó a cabo una SDS-PAGE para identificar la expresión de rsCD14(1-285) mediante western blot mediante un anticuerpo anti-CD14.

De manera similar, se preparó rsCD14(1-285) que iba a usarse como inmunógeno mediante incubación de una cepa de transformante JE7924 en 1 µl de un medio LB. En primer lugar, se centrifugó la disolución de cultivo. Tras haberse recogido las células de *E. coli*, se lavaron las células bacterianas con D-PBS y se añadieron 50 ml de reactivo de extracción de proteínas Bug Buster (Novagen, a continuación en el presente documento descrito como Bug Buster) a las células bacterianas recogidas. Se suspendieron las células bacterianas y se dejaron en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras lisis, se sometieron las células bacterianas a un tratamiento de sonicación durante 10 minutos (US-3, luchi Seieido) y se centrifugaron a 10000 x g a 4°C durante 20 minutos para eliminar un sobrenadante. Asimismo, se realizó un tratamiento de sonicación adicional con las células y se suspendió el precipitado resultante en 50 ml de Bug Buster. Se le añadió a la suspensión 1 ml de una lisozima 10 mg/ml (Seikagaku Corporation), y se agitó suavemente el conjunto y se dejó en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 200 ml de volumen 1/10 de Bug Buster a alta concentración a la mezcla y se agitó el conjunto, seguido por que se sometió a centrifugación de manera similar para eliminar un sobrenadante. Se suspendió el precipitado resultante mediante la adición de 200 ml de concentración 1/10 de Bug buster y entonces se centrifugó la suspensión de manera similar, seguido por la repetición de una operación de este tipo varias veces. Se añadieron 100 ml de D-PBS en el precipitado obtenido finalmente, dando como resultado un cuerpo de inclusión.

Para la preparación de rsCD14(1-285), se disolvió el cuerpo de inclusión en un tampón TE (pH 8,0, Nippon Gene) que contenía Triton-X100 al 1% y se sometió entonces la disolución a congelación y descongelación 3 veces, seguido por la recogida de un precipitado mediante centrifugación. Se disolvió el precipitado en el tampón TE (pH 8,0, Nippon Gene) que contenía Triton-X100 al 1% de nuevo, y se enfrió con hielo la disolución y entonces se sometió a un tratamiento ultrasónico durante 12 minutos con 250 A a intervalos de 10 segundos y se centrifugó, seguido por la recogida de un precipitado. Se disolvió el precipitado en un tampón TE (pH 8,0, Nippon Gene) que contenía Triton-X100 al 1% y NaOH 0,2 M, y entonces se trató a 37°C durante 10 minutos, se centrifugó, y se redisolvió tres veces, seguido por la recogida de un precipitado. Se disolvió el precipitado resultante en una disolución acuosa que contenía guanidina 6 M-ácido clorhídrico para preparar rsCD14(1-285) purificado. Se calculó la concentración del mismo mediante un ensayo de proteínas de Bradford usando BSA como patrón.

3-(2) Preparación de anticuerpo monoclonal anti-CD14

[1] Preparación de anticuerpo F1106-13-3

Usando rsCD14(1-285) derivado de *E. coli* descrito anteriormente como antígeno que va a administrarse, se preparó un anticuerpo monoclonal. En primer lugar, se mezclaron 20 µg de rsCD14(1-285) purificado con adyuvante completo de Freund (DIFCO) en cantidades equivalentes, seguido por la administración intraperitoneal de 200 µl de

la mezcla a un ratón ddh hembra de 6 semanas de edad. Tras 2 semanas, se mezclaron 20 µg de rsCD14(1-285) purificado con adyuvante incompleto de Freund (DIFCO) en cantidades equivalentes, seguido por la administración intraperitoneal de 200 µl de la mezcla. Se administraron por vía intraperitoneal 50 µl de antígeno al ratón 3 días antes de la fusión celular. Tras 3 días, se extirpó de manera aséptica el bazo. Se aislaron los linfocitos del bazo y se mezclaron con células de mieloma (P3x63-Ag. 8. U.1) en una razón de 10:1 y se realizó fusión con polietilenglicol según un método descrito en Tamie Ando y Takeshi Chiba: "Introduction to Monoclonal Antibody Experimental Manipulation", página 83, 1991 (Kodansha Ltd.). Tras haberse seleccionado hibridomas usando un medio HAT, se realizó un cribado de hibridomas que producen anticuerpos que se unen a rsCD14(1-285) mediante un método de ELISA.

En primer lugar, se diluyó rsCD14(1-285) con PBS (pH 6,4) a 0,4 µg/ml y se añadieron entonces 50 µl de la disolución resultante a cada pocillo de una inmunoplaaca (Maxisorb, NUNC) y se hizo reaccionar a 4°C durante la noche. Después de eso, se lavó la placa con agua sometida a intercambio iónico 5 veces y entonces se añadieron a cada pocillo 100 µl de PBS (pH 6,4) que contenía BSA al 0,5% para bloqueo. Entonces, se añadió a cada pocillo el sobrenadante de cultivo tomado como muestra y se permitió que reaccionase a 37°C durante 1 hora. Después de eso, se lavó la placa 3 veces con solución salina fisiológica que contenía Tween 20 al 0,05%. Posteriormente, se añadieron a cada pocillo 50 µl de una disolución obtenida mediante dilución de anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón marcado con peroxidasa (DAKO) 1000 veces con PBS que contenía suero de conejo al 10%. Tras una reacción a 37°C durante 1 hora, se lavó la placa 5 veces de la misma manera que anteriormente y se añadió a cada pocillo una disolución de tetrametilbencidina (TMB, BioFix). Tras una reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente, se detuvo la reacción con una disolución de ácido sulfúrico 0,5 M y se midió una absorbancia a 450 nm usando un espectrofotómetro de placa (NJ-2100, Japan Intermed). Basándose en el resultado, se seleccionó un pocillo que contenía hibridoma que produce un anticuerpo que se une a rsCD14(1-285). A continuación, a partir del pocillo seleccionado, se realizó clonación mediante un método de dilución limitante según Tamie Ando y Takeshi Chiba: "Introduction to Monoclonal Antibody Experimental Manipulation", página 83, 1991 (Kodansha Ltd.). Tras 10 días, asimismo, se realizó un cribado usando la reactividad con rsCD14(1-285) como índice para seleccionar hibridomas. Como resultado, se seleccionaron 12 tipos de hibridomas que producían el anticuerpo monoclonal anti-rsCD14(1-285).

Se cultivaron los hibridomas seleccionados en un medio FCS al 10%/ RPMI1640 (Sigma) y entonces se cultivaron en medio de hibridoma-SFM (Invitrogen) para producir un anticuerpo. Se purificó el anticuerpo usando una columna con proteína A (ProSep-A, Millipore).

Se determinó que el subtipo del anticuerpo F1106-13-3, que era un anticuerpo que tenía una sensibilidad particularmente alta, como IgG2b-κ usando el kit de isotipado de anticuerpo monoclonal de ratón IsoStrip (Roche).

[2] Preparación del anticuerpo F1031-8-3

Se preparó el anticuerpo F1031-8-3 usando el método descrito en el ejemplo 7 del documento WO 01/22085. Descrito brevemente, se disolvieron 20 µg de proteína CD14 derivada de sangre humana en solución salina fisiológica y se mezcló la disolución con adyuvante completo de Freund (DIFCO) en cantidades equivalentes. Entonces, tras 1 semana desde cada una de la administración intraperitoneal inicial y la segunda del mismo 2 semanas tras la inicial, se confirmó un nivel aumentado del título de anticuerpos en suero mediante un método de ELISA sobre la reactividad con Proteína CD14 humana recombinante como en el caso del ejemplo 5 del documento WO 01/22085. Se administraron por vía intraperitoneal unos 100 µg de antígeno a un ratón como administración final y tras 3 días se extirpó quirúrgicamente el bazo del ratón. Se aislaron los linfocitos del bazo y se mezclaron con células de mieloma (P3x63-Ag. 8. U.1) en una razón de 10:1 y se realizó fusión celular con polietilenglicol. Se seleccionaron los hibridomas usando un medio HAT y tras una semana se realizó un cribado de hibridomas que producen anticuerpos mediante el método de ELISA descrito anteriormente. Se clonó el hibridoma que había reaccionado con el antígeno CD14 soluble inmovilizado mediante un método de dilución limitante. Tras 10 días, de manera similar, se realizó un cribado para obtener un anticuerpo monoclonal anti-proteína CD14. Se obtuvo el anticuerpo F1031-8-3 que tenía el subtipo de IgG2b-κ determinado usando el kit de isotipado de anticuerpo monoclonal de ratón IsoStrip (Roche) como anticuerpo típico.

3-(3) Estudio del sistema de EIA de tipo sándwich

Para preparar un sistema que puede detectar específicamente una proteína que está presente en una gran cantidad en un paciente que presenta septicemia, se preparó un sistema de EIA de tipo sándwich usando los anticuerpos descritos en los ejemplos 1, 2 y 3-(2).

[1] Preparación de anticuerpo marcado con peroxidasa

Se preparó un anticuerpo marcado con peroxidasa según el método de Nakane *et al.* (J. Histochem. Cytochem., vol. 22, pág. 1084, 1974). Es decir, se disolvieron 4 mg de peroxidasa (Toyobo) en agua destilada y se hizo reaccionar entonces la disolución a 25°C durante 20 minutos mediante la adición de 100 mM de ácido peryódico. Tras la finalización de la reacción, se añadió etilenglicol al 1,5% al producto de reacción y se hizo reaccionar el conjunto a 25°C durante 10 minutos, seguido por diálisis frente a un tampón acetato 1 mM (pH 4,4). Cada uno del anticuerpo

F1031-8-3 y el anticuerpo F1106-13-3 purificados se dializó frente a un tampón bicarbonato 10 mM (pH 9,5), y entonces se mezclaron 4 mg de peroxidasa activada mediante la adición de 70 µl de un tampón bicarbonato 0,2 M (pH 9,5) por 4 mg, con el anticuerpo en cantidades equivalentes para permitir una reacción a 25°C durante 2 horas. A continuación, se añadió 4 mg/ml de borohidruro de sodio y entonces se continuó con la reacción durante 2 horas adicionales a 4°C. Se dializó la disolución de reacción frente a PBS, dando como resultado un anticuerpo F1031-8-3 marcado con peroxidasa (a continuación en el presente documento, puede describirse como F1031-8-3-HRP) y anticuerpo F1106-13-3 marcado con peroxidasa (a continuación en el presente documento, puede describirse como F1106-13-3-HRP). Se calculó la concentración de anticuerpo a partir de la cantidad de anticuerpo usado y el volumen de la disolución de anticuerpo marcado.

10 [2] Preparación de sistema de EIA de tipo sándwich

Se preparó un sistema de EIA de tipo sándwich en 2 etapas usando el anticuerpo contra S68 preparado como anticuerpo inmovilizado en el ejemplo 1 y los anticuerpos preparados en el ejemplo 3-(2)[1] y [2] como anticuerpos marcados. Es decir, se diluyó el anticuerpo contra S68 con D-PBS (pH 7,4) a 10 µg/ml y entonces se añadieron 50 µl de la disolución resultante a cada pocillo de una inmunoplaqueta (Maxisorb, NUNC) y se hizo reaccionar a 4°C durante la noche. Después de eso, se lavó la placa con agua sometida a intercambio iónico 5 veces y entonces se añadieron a cada pocillo 100 µl de D-PBS que contenía StabilGuard al 0,1% (SurModics, Inc) y Tween 20 al 0,1% para efectuar el bloqueo. Usando como diluyente PBS (pH 7,4) que contenía suero de donante normal al 1% (suero del que se retiró el antígeno CD14 soluble usando 3C10, descrito a continuación en el presente documento como suero que absorbe CD14; se preparó 3C10 a partir del hibridoma ATCC228-TIB obtenido de la Colección Americana de Cultivos Tipo) y usando PBS (pH 7,4) que contenía BSA al 0,1% como disolución de dilución, se prepararon muestras diluidas de sueros humanos de donantes normales y sueros humanos de pacientes que presentaban septicemia mediante dilución de los sueros 20 veces, respectivamente. Se añadió una muestra diluida en una concentración de 50 µl por pocillo y se hizo reaccionar a 37°C durante 2 horas.

Tras la finalización de la reacción, se lavó la muestra tres veces con solución salina fisiológica que contenía Tween 20 al 0,05% y se añadieron a cada pocillo 50 µl de F1031-8-3-HRP o F1106-13-3-HRP diluido hasta 0,6 µg/ml con PBS 76 mM (pH 8,0) que contenía suero de rata al 5%, suero de ratón al 1% y Tween 20 al 0,1%. Tras una reacción a 37°C durante 2 horas, se lavó la placa 5 veces de la misma manera que anteriormente y se añadió a cada pocillo una disolución de tetrametilbencidina (TMB, BioFix). Tras una reacción durante 20 minutos a temperatura ambiente, se detuvo la reacción con una disolución de ácido sulfúrico 0,5 M y se midió una absorbancia a 450 nm usando un espectrofotómetro de placa (NJ-2100, Japan Intermed). Como resultado, tal como se muestra en la tabla 1, pudo someterse a ensayo una proteína soluble en sangre, que no podría aumentar en un donante normal pero que aumenta en un paciente que presenta septicemia en el sistema en el que se usó anticuerpo derivado del péptido S68.

[3] Preparación de sistema de EIA de tipo sándwich <2>

Se preparó un sistema de EIA de tipo sándwich en 2 etapas usando el anticuerpo F1146-17-2 preparado como anticuerpo inmovilizado en el ejemplo 2 y el anticuerpo preparado en el ejemplo 3-(2)[2] como anticuerpo marcado. Se diluyó el anticuerpo F1146-17-2 con PBS (pH 6,4) hasta 120 µg/ml y entonces se añadieron 50 µl de la disolución resultante a cada pocillo de una inmunoplaqueta (Maxisorb, NUNC) y se hizo reaccionar a 56°C durante 30 minutos. Después de eso, se lavó la placa con agua sometida a intercambio iónico 5 veces y entonces se añadieron a cada pocillo 100 µl de PBS que contenía StabilGuard al 0,1% (SurModics, Inc) y Tween 20 al 0,1% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) para efectuar el bloqueo. Usando como diluyente PBS (pH 6,4) que contenía BSA al 1%, se prepararon muestras diluidas de sueros humanos de donantes normales y sueros humanos de pacientes que presentaban septicemia mediante dilución de los sueros 10 veces, respectivamente. Se añadió una muestra diluida en una concentración de 50 µl por pocillo y se hizo reaccionar a 25°C durante 2 horas.

Tras la finalización de la reacción, se lavó la placa tres veces con solución salina fisiológica que contenía Tween 20 al 0,05% y se añadieron a cada pocillo 50 µl de anticuerpo F1031-8-3 marcado con peroxidasa diluido hasta 0,5 µg/ml mediante tampón fosfato 76 mM (pH 8,0) que contenía suero de rata al 5%, suero de ratón al 1% y Tween 20 al 0,1%. Tras una reacción a 25°C durante 2 horas, se lavó la placa 5 veces de la misma manera que anteriormente y se añadió a cada pocillo una disolución de tetrametilbencidina (TMB, BioFix). Tras una reacción durante 20 minutos a temperatura ambiente, se detuvo la reacción con una disolución de ácido sulfúrico 0,5 M y se midió una absorbancia a 450 nm usando un espectrofotómetro de placa (NJ-2100, Japan Intermed). Como resultado, de manera similar al anticuerpo contra S68, en el caso del anticuerpo monoclonal específico contra el péptido S68 tal como se muestra en la tabla 1, que casi no se encontró en los sueros de donantes normales pero que se encontró en un alto nivel en los sueros de pacientes que presentaban septicemia, pudo someterse a ensayo. Es decir, el resultado confirmó que un anticuerpo que se une al péptido S68 puede preparar un sistema de tipo sándwich independientemente de si el anticuerpo es policlonal o monoclonal.

En la tabla 1, “++” representa una absorbancia de 4 veces o más a 450 nm en comparación con la absorbancia del propio diluyente y “+” representa una absorbancia de 2 veces o más, y “-” representa una absorbancia igual a la absorbancia del diluyente.

Tabla 1

Combinación de anticuerpos		Nivel medido	
Lado de inmovilización	Lado de marcaje	Paciente que presenta septicemia	Donante normal
anticuerpo contra S68	anticuerpo F1031-8-3	++	-
anticuerpo contra S68	anticuerpo F1106-13-3	++	-
anticuerpo F1146-17-2	anticuerpo F1031-8-3	+	-

(Ejemplo 4) Especificidad del anticuerpo contra S68

Para confirmar la especificidad del anticuerpo contra S68 preparado en el ejemplo 1, los inventores estudiaron si se produce bloqueo por un péptido mediante el mismo ensayo que el del ejemplo 3-(3). Es decir, se diluyó el péptido S68 (secuencia de aminoácidos en las posiciones 53 a 68), polipéptido sintético preparado de la misma manera que el del ejemplo 1 (secuencia de aminoácidos en las posiciones 53 a 58, secuencia de aminoácidos en las posiciones 57 a 62 y secuencia de aminoácidos en las posiciones 59 a 64), o péptido de control negativo (Cys Glu Gly Asn Gly Asn Asn Phe Glu Ser Arg Glu Ala Cys) hasta 0, 0,1, 1 y 10 µg/ml y se añadieron 25 µl de cada disolución diluida a 25 µl de cada una de las disoluciones diluidas 50 veces de los sueros obtenidos de pacientes que presentaban septicemia y los sueros de donantes normales para iniciar una reacción competitiva mediante el mezclado con anticuerpo contra S68. Después de eso, se determinaron los niveles de la proteína soluble unida al anticuerpo contra S68 sin inhibición por ningún péptido.

Como resultado, tal como se muestra en la figura 1, tanto en los sueros de los donantes normales que muestran bajos niveles como de pacientes que presentan septicemia que muestran altos niveles, se inhibió la unión entre anticuerpo contra S68 y la proteína soluble en suero en el caso del péptido S68 pero no se inhibió en el caso de otros péptidos parciales (que contiene cada uno 6 aminoácidos) y un péptido de control negativo. El resultado anterior confirmó que una proteína que se detecta en sangre por el anticuerpo contra S68 se reconoce específicamente por el anticuerpo contra S68. Además, el resultado también confirmó que la secuencia reconocida por el anticuerpo requiere una longitud de al menos 7 aminoácidos porque no puede lograrse inhibición mediante tres clases de péptidos sintéticos (el número de aminoácidos: 6) correspondientes a los péptidos parciales del péptido S68.

(Ejemplo 5) Constante de velocidad de reacción del anticuerpo preparado

Se analizaron las especificidades y las constantes de velocidad de reacción del anticuerpo contra S68 preparado en el ejemplo 1 y el anticuerpo F1146-17-2 preparado en el ejemplo 2 usando Biacore 3000 (Biacore), respectivamente. En primer lugar, se preparó el péptido S68-BSA que iba a inmovilizarse por la misma vía descrita en el ejemplo 1 usando BSA maleimida (BSA activada por maleimida Imject, PIERCE). A continuación, se inmovilizó el péptido S68-BSA sobre un chip sensor CM5 (Biacore) usando un kit de acoplamiento de amina (Biacore). Se realizó un ensayo de manera que se usó HBS-EP (Biacore) como tampón de corrida y se inyectó una serie de dilución (50, 100, 150, 200 y 300 nM) de anticuerpo F1146-17-2 en las células de flujo. Se realizó el análisis de datos usando el software Biaevaluation versión 3.0 (Biacore) restando los datos de la célula de referencia de los datos de medición de la célula de flujo del péptido S68-BSA. Como resultado de analizar una constante de disociación (KD), el anticuerpo F1146-17-2 mostró una afinidad de hasta $4,8 \times 10^{-9}$ M. A propósito, el valor de KD de anticuerpo policlonal contra el péptido S68 de conejo purificado específicamente medido de manera similar fue de $2,2 \times 10^{-10}$ M.

(Ejemplo 6) Especificidad del anticuerpo monoclonal anti-CD14

6-(1) Análisis del anticuerpo F1106-13-3

Para aclarar una región de unión (epítipo) del anticuerpo F1106-13-3, se usó para el análisis una membrana de biblioteca peptídica (Custom SPOTs, Sigma Genosys) sobre la que se sintetizó la secuencia de aminoácidos de CD14 del extremo N-terminal del mismo, 10 aminoácidos cada vez. Es decir, se bloqueó la membrana basándose en el manual de instrucciones de la misma y entonces se hizo reaccionar con anticuerpo F1106-13-3, se lavó, y entonces se hizo reaccionar con anticuerpo anti-ratón marcado con β-galactosidasa. Tras haberse lavado la membrana, se detectó una secuencia peptídica a la que se unió el anticuerpo, usando X-gal. A propósito, se analizaron las secuencias peptídicas en la membrana de biblioteca peptídica usando 19 péptidos que se sintetizaron de manera que se sometieron 10 aminoácidos a la síntesis cada vez de modo que se solapasen dos aminoácidos de los extremos C-terminal respectivos de las secuencias de aminoácidos en las posiciones 1 a 154. Se prepararon los péptidos de la misma manera que la del ejemplo 1-(1).

El resultado encontró que el anticuerpo F1106-13-3 se une a la región correspondiente a una secuencia de aminoácidos en las posiciones 17 a 26 (CNFSEPQPDW) del extremo N-terminal de CD14 de alto peso molecular.

6-(2) Análisis del anticuerpo F1031-8-3 <1>

Para confirmar la especificidad del anticuerpo F1031-8-3, se determinó la actividad de unión usando rsCD14(1-285) derivado de *E. coli* descrito en el ejemplo 3-(1) y rsCD14(1-356) y rsCD14(1-307)S286C preparados a partir de células COS usando los métodos descritos en los ejemplos 8 y 9 del documento WO 01/72993.

- 5 En primer lugar, se inmovilizó rsCD14(1-356), rsCD14(1-307)S286C, rsCD14(1-285) o BSA 250 ng/mancha sobre una membrana, Hybond-C extra (Amersham Biosciences), y tras secarla se bloqueó mediante Tween 20 al 0,05% que contenía 0,05 g/ml de leche desnatada (Meiji Dairies Corporation), PBS (pH 6,4). Tras haberse dejado en reposo el producto resultante durante 1 hora a temperatura ambiente, se añadió anticuerpo F1031-8-3 diluido hasta 3 µg/ml con Tween 20 al 0,05% que contenía BSA al 0,5%, PBS (pH 6,4) y se hizo reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido por lavado con Tween 20 al 0,05%, PBS (pH 6,4).

- 15 A continuación, se añadió anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón marcado con peroxidasa (DAKO) diluido 500 veces con Tween 20 al 0,05% que contenía suero de conejo al 10%, PBS (pH 6,4) y se hizo reaccionar durante 30 minutos a 37°C. Entonces, se lavó la membrana de manera similar, seguido por la confirmación de la actividad de unión del anticuerpo con el kit de ECL (Amersham Biosciences). Como resultado, tal como se muestra en la tabla 2, el anticuerpo F1031-8-3 se unió a rsCD14(1-285) derivado de *E. coli*, rsCD14(1-307)S286C y rsCD14(1-356) no a BSA. Por tanto, el resultado encontró que el anticuerpo F1031-8-3 reconoció específicamente todos los tipos de proteínas CD14. En la tabla 2, "+" representa una situación en la que se detectó una mancha sobre una película mediante la ECL y "-" representa una situación en la que no se detectó una mancha.

Tabla 2

	rsCD14 (1-356)	rsCD14 (1-307) S286C	rsCD14 (1-285)	BSA
Actividad de unión	+	+	+	-

20 6-(3) Análisis del anticuerpo F1031-8-3 <2>

Se analizó una región de unión (epítipo) del anticuerpo F1031-8-3. En otras palabras, en el sistema de EIA de tipo sándwich del ejemplo 3-(3)[2] en el que se usó anticuerpo contra S68 como el inmovilizado y se usó F1031-8-3-HRP como el marcado, se realizó una prueba de inhibición usando anticuerpo F1106-1-3.

- 25 En primer lugar, como en el caso del ejemplo 3-(3)[2], se añadieron 100 ng/ml de la preparación patrón a y se hizo reaccionar con una placa con anticuerpo contra S68 inmovilizado. Tras haberse lavado la placa, antes de la adición de F1031-8-3-HRP, se añadieron unos 25 µl de tampón que contenía 6 µg/ml de anticuerpo F1106-13-3, anticuerpo IgG de ratón o sin anticuerpo. Entonces, se añadieron 25 µl de anticuerpo F1031-8-3-HRP, seguido por la medición mediante la misma vía que la del ejemplo 3-(3)[2].

- 30 Tal como se muestra en la tabla 3, no se produjo inhibición en el sistema de adición de anticuerpo de IgG ratón adición mientras que se produjo la inhibición de la unión entre F1031-8-3 y la preparación patrón por el anticuerpo F1106-13-3. Este hecho indicó que el anticuerpo F1106-13-3 puede unirse a al menos una región que va a reconocerse por el anticuerpo F1031-8-3. A propósito, se calculó una "tasa de inhibición" en la tabla 3 a partir de cada absorbancia que disminuyó en el momento de definir la absorbancia del tampón solo como el 100%.

Tabla 3

Aditivo	Tasa de inhibición (%)
Anticuerpo IgG de ratón	2
Anticuerpo F1106-13-3	70

35 (Ejemplo 7) Kit de ensayo para proteína soluble

7-(1) Formato típico de kit de ensayo para sistema de EIA de tipo sándwich

Se describirá a continuación un formato típico de un kit para proteína soluble usando una combinación de anticuerpos inmovilizados y marcados que muestran altos niveles de la proteína soluble en la muestra de pacientes que presentaban septicemia y bajos niveles en la muestra de donantes sanos en el ejemplo 3-(3).

- 40 <1> Anticuerpo inmovilizado: placa sobre la que se inmoviliza el anticuerpo contra S68

<2> Anticuerpo marcado: anticuerpo F1031-8-3 marcado con peroxidasa

<3> Disolución de sustrato (disolución de tetrametilbencidina)

Otros materiales auxiliares

Ejemplo de formato de un sistema de placa

<4> Disolución de lavado de placa (disolución de NaCl al 0,9%, Tween 20 al 0,05%)

<5> Disolución de dilución de muestra (disolución de PBS que contiene BSA al 0,1%)

<6> Reactivo de detención (disolución de H₂SO₄ 0,5 M)

5 <7> Preparación patrón (CD14(1-307)S286C)

Instrumentos de medición para realizar un ensayo usando el kit de ensayo anterior <ejemplo de referencia>

<8> Espectrofotómetro de placa (por ejemplo, E-Max (Molecular Devices Corporation))

7-(2) a (11) Ejemplos de formato del kit de ensayo para sistema de EIA de tipo sándwich

10 Además de 7-(1), se muestran los ejemplos del kit de ensayo para un sistema de EIA de tipo sándwich en la tabla 4. <1> representa una sustancia de unión inmovilizada sobre una placa. <2> representa una sustancia de unión marcada. Los elementos constituyentes de <3> a <7> y un instrumento de medición <8> como ejemplo de referencia son idénticos a 7-(1). <9> representa un anticuerpo con una segunda sustancia de unión específica unida. “-” representa sin descripción.

Tabla 4

	<1>	<2>	<9>
(2)	anticuerpo F1146-17-2	F1031-8-3-HRP	-
(3)	anticuerpo contra S68	F1106-13-3-HRP	-
(4)	anticuerpo F1146-17-2	F1106-13-3-HRP	-
(5)	anticuerpo F1031-8-3	anticuerpo contra S68-HRP	-
(6)	anticuerpo F1031-8-3	F1146-17-2-HRP	-
(7)	anticuerpo F1106-13-3	anticuerpo contra S68-HRP	-
(8)	anticuerpo F1106-13-3	F1146-17-2-HRP	-
(9)	anticuerpo F1031-8-3	SA-HRP	Anticuerpo contra Bio-S68
(10)	Str	F1031-8-3-HRP	Anticuerpo contra Bio-S68
(11)	anticuerpo contra S68	SA-HRP	Bio-F1031-8-3

15 7-(12) Curva patrón del kit de ensayo para sistema de EIA de tipo sándwich

Usando el kit de ensayo de (1), se realizó un ensayo de la misma manera que la del ejemplo 3-(3)[2]. Es decir, se diluyó el anticuerpo contra S68 hasta 10 µg/ml con D-PBS (pH 7,4) y entonces se añadieron 50 µl de la disolución resultante a cada pocillo de una inmunoplate (Maxisorb, NUNC). Tras una reacción a 4°C durante la noche, se lavó la placa cinco veces con agua sometida a intercambio iónico y se bloqueó mediante la adición a cada pocillo de 100 µl de D-PBS que contenía StabilGuard al 0,1% (SurModics, Inc.) y Tween 20 al 0,1%. A continuación, se usó PBS 76 mM (pH 7,4) que contenía suero que absorbe CD14 al 1% y BSA al 0,1% como diluyente para preparar una serie de dilución de 0, 3, 25, 60, 100 y 150 ng/ml de preparación patrón de proteína CD14(1-307)S286C.

25 Se añadió la serie de dilución de la preparación patrón en una cantidad de 50 µl por pocillo y se hizo reaccionar durante 2 horas a 37°C. Tras la finalización de la reacción, se lavó la placa tres veces con solución salina fisiológica que contenía Tween 20 al 0,05%. Entonces, se añadieron a cada pocillo 50 µl de anticuerpo marcados diluidos con peroxidasa hasta 0,6 µg/ml con PBS 76 mM (pH 8,0) que contenía Tween 20 al 0,1%. Tras una reacción a 37°C durante 2 horas, se lavó la placa cinco veces de la misma manera que anteriormente y se añadió a cada pocillo una disolución de tetrametilbencidina (TMB, BioFix). Tras una reacción durante 20 minutos a temperatura ambiente, se terminó la reacción mediante una disolución de ácido sulfúrico 0,5 M y se midió una absorbancia a 450 nm usando un espectrofotómetro de placa (NJ-2100, Japan Intermed). Se preparó una curva patrón mostrada en la figura 2. Se realizó un sistema de ensayo sencillo con alta sensibilidad como una sensibilidad de medición de 0,6 ng/ml (blanco + 3 D.E.).

7-(13) Especificidad del sistema de EIA de tipo sándwich

35 Para estudiar la influencia de CD14 de alto peso molecular presente en suero humano sobre el sistema de ensayo preparado, se añadió CD14 soluble derivada de suero de donante normal a una concentración de 0 a 4 µg/ml a la preparación patrón de CD14(1-307)S286C para llevar a cabo el mismo ensayo que el del punto (12). Como resultado, tal como se muestra en la figura 3, no hubo ninguna influencia sobre el nivel medido aunque la concentración del antígeno CD14 soluble derivado de suero de donante normal fuese de 4 µg/ml. El resultado encontró que la reactividad cruzada del presente sistema de EIA de tipo sándwich con CD14 de alto peso molecular era del 0,3% o menos. En otras palabras, el resultado confirmó que el presente sistema no detecta CD14 de alto peso molecular en suero humano y es específico para una proteína soluble que muestra un alto nivel en suero de un

paciente que presenta septicemia.

7-(14) Evaluación sobre el kit de ensayo para sistema de EIA de tipo sándwich

Se evaluó la reproducibilidad de los resultados de ensayo del kit del punto (1). El coeficiente de variación (CV) de la reproducibilidad dentro de la serie usando 3 clases de muestras como en el caso del punto (12) era del 5,8, el 3,6 y el 3,5% y la reproducibilidad entre mediciones era del 6,2, el 5,2 y el 5,1%, respectivamente. Por tanto, se obtuvieron buenos resultados. Además, la tasa de recuperación en la prueba de recuperación/adición era del 88 al 109%, lo que era satisfactorio. No se observó influencia de un anticoagulante (heparina, ácido cítrico o EDTA). Los resultados descritos anteriormente mostraron que el presente kit tiene una capacidad suficiente para el ensayo de la proteína soluble en sangre.

(Ejemplo 8) Identificación de proteína soluble en sangre

8-(1) Cromatografía de filtración en gel <1>

Para analizar la sustancia en suero de un paciente que presenta septicemia tal como se detecta mediante el kit de ensayo descrito en el ejemplo 7-(1), se fraccionó el suero de un paciente que presentaba septicemia a través de una columna de cromatografía de filtración en gel Superdex 200PC 3,2/30 (Amersham Biosciences) con SMART SYSTEM (Amersham Biosciences) usando D-PBS como tampón de elución. Entonces, se sometió a ensayo cada fracción usando el kit de ensayo descrito en el ejemplo 7-(1) y el kit de EIA para CD14 disponible comercialmente (IBL-Hamburg). Se calculó el peso molecular de la misma mediante la calibración de la columna usando aldolasa (158 kDa), BSA (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa) y quimotripsina (25 kDa) del kit de calibración LMW y el kit de calibración HMW (Amersham Biosciences).

Como resultado, tal como se muestra en la figura 4, el kit de EIA para CD14 disponible comercialmente detectó antígeno CD14 soluble que tiene un peso molecular de aproximadamente 57 kDa, que se definió como antígeno CD14 soluble de alto peso molecular de 49 a 55 kDa notificado convencionalmente. Por otra parte, en el kit descrito en el ejemplo 7-(1), se detectó un pico aproximadamente a un peso molecular de 35 a 45 kDa pero no se detectó ningún pico aproximadamente a 57 kDa. Por tanto, el resultado confirmó que el kit descrito en el ejemplo 7-(1) detecta específicamente sólo una proteína soluble presente en sangre.

8-(2) Cromatografía de filtración en gel <2>

Como en el caso del punto (2)-<1>, se fraccionaron 50 µl de suero de un paciente que presentaba septicemia a través de una columna de cromatografía de filtración en gel Superdex 75 10/300 GL (Amersham Biosciences) usando acetato de amonio 200 mM (pH 6,8) como tampón de elución y se sometió a ensayo usando cada kit. Se calculó el peso molecular del mismo mediante la calibración de la columna usando BSA (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), quimotripsinógeno (25 kDa) y ribonucleasa A (13,7 kDa) del kit de calibración LMW y el kit de calibración HMW (Amersham Biosciences).

Se muestran los resultados en la figura 5. En el kit descrito en el ejemplo 7-(1), se detectó un pico derivado de la proteína soluble aproximadamente a un peso molecular de 25 a 35 kDa.

8-(3) Cromatografía en columna de afinidad con anticuerpo F1025-3-1

Cuando se aplica una fracción que produce picos (por ejemplo, la fracción 12) derivada de la proteína soluble obtenida en el punto (2)-<2> a una cromatografía en columna de afinidad con anticuerpo F1025-3-1, se eluye un pico derivado de la proteína soluble en una fracción que no se absorbe en columna de afinidad. A propósito, pueden realizarse el ajuste y el funcionamiento de la columna de afinidad con anticuerpo F1025-3-1 basándose en el método descrito en el ejemplo 10 del documento WO 01/22085.

(Ejemplo 9) Purificación de proteína soluble en sangre de suero de paciente que presenta septicemia

9-(1) Preparación de portador F1024-1-3-Sepharose 4B

Se añadió una alícuota de 55 mg del anticuerpo F1024-1-3 preparado (la línea celular de hibridoma depositada con el número de registro FERMBP-7511, tal como se describió anteriormente), que se describió en el ejemplo 2 del documento WO01/72993, a 20 ml de ECH-Sepharose 4B (Amersham Biosciences) y entonces se añadió carbodiimida soluble en agua (Dojindo Laboratories, Co., Ltd.) en una concentración final de 0,1 M para llevar a cabo una reacción de acoplamiento a 4°C durante la noche. Posteriormente, se lavó la mezcla de reacción con acetato de sodio 0,1 M (pH 5,0), seguido por la recogida del anticuerpo F1024-1-3 sin reaccionar. Se midieron las absorbancias tanto de la disolución de anticuerpo antes de la reacción de acoplamiento de la disolución de lavado a 280 nm, respectivamente, para determinar una eficacia de acoplamiento (nivel convertido: 0,714 mg/ml). Como resultado, se reveló que el anticuerpo F1024-1-3 tenía una eficacia de acoplamiento del 55% y 1,5 mg del anticuerpo F1024-1-3 podían unirse a 1 ml del portador.

A continuación, se añadió etanolamina 1 M (pH 7,4) a la mezcla para llevar a cabo una reacción de bloqueo a temperatura ambiente durante una hora, y se lavó entonces el portador con 100 ml de acetato de sodio 0,1 M/NaCl

0,5 M (pH 4,0) y posteriormente con 100 ml de Tris-HCl 0,1 M/NaCl 0,5 M (pH 8,0). Se repitió adicionalmente este procedimiento dos veces para preparar 20 ml de portador F1024-1-3-Sepharose 4B.

9-(2) Preparación de portador S68-Sepharose 4 FF

Se dializó una alícuota de 18 mg del anticuerpo contra S68 preparado en el ejemplo 1-(4) a 4°C durante la noche usando una membrana de diálisis (Spectrum, Co., Ltd.) que tiene un punto de corte de peso molecular de 10 kDa y 2,5 l de un dializado (es decir, NaHCO₃ 0,2 M (pH 8,3) que contenía NaCl 0,5 M). Además, se sustituyó el dializado por nuevo tres veces. Posteriormente, se añadieron 8 ml de la columna con Sepharose 4 Fast Flow activada con NHS (Amersham Biosciences) equilibrada previamente con NaHCO₃ 0,2 M (pH 8,3) que contenía NaCl 0,5 M, a la disolución de anticuerpo contra S68 dializada para llevar a cabo una reacción de acoplamiento a 4°C durante la noche. Tras la terminación de la reacción de acoplamiento, se lavó el anticuerpo contra S68 sin reaccionar con NaHCO₃ 0,2 M (pH 8,3) que contenía NaCl 0,5 M y entonces se recogió. Se midieron las absorbancias a 280 nm de la disolución de anticuerpo antes de y después de la reacción de acoplamiento, respectivamente, para determinar una eficacia de acoplamiento (nivel convertido: 0,714 mg/ml). Como resultado, se reveló que el anticuerpo contra S68 tenía una eficacia de acoplamiento del 79% y 1,8 ml del anticuerpo contra S68 podían unirse a 1 ml del portador. A continuación, se añadió monometanolamina 0,5 M (pH 8,3) que contenía NaCl 0,5 M, al portador para llevar a cabo una reacción de bloqueo a 4°C durante la noche. Tras la terminación de la reacción de bloqueo, se lavó el portador con 300 ml de acetato de sodio 0,1 M (pH 4,0) que contenía NaCl 0,5 M y posteriormente con 300 ml de NaHCO₃ 0,2 M (pH 8,3) que contenía NaCl 0,5 M. Se repitió adicionalmente este procedimiento dos veces para preparar 8 ml del portador S68-Sepharose 4 Fast Flow.

9-(3) SDS-PAGE

Se llevó a cabo SDS-PAGE usando un gel de SDS-PAGE al 12,5% en condiciones no reductoras, según los procedimientos de Laemmli (Laemmli UK., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 15 de agosto de 1970; 227 (259): 680-5). Es decir, se añadió un volumen de Tris-SDS-Sepharol (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.) a dos volúmenes de la muestra y entonces se calentó la mezcla a 100°C durante 5 minutos, seguido por la aplicación de la mezcla al gel de SDS-PAGE al 12,5% (ATTO Corporation) para llevar a cabo electroforesis usando el sistema de tampón discontinuo de Laemmli a 25 mA durante 90 minutos. Tras la terminación de la electroforesis, se tiñó el gel con un kit de tinción con plata, 2D Silver Stain II "Daiichi" (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.). Para la determinación del peso molecular, un marcador de peso molecular usado fueron los patrones de doble color "Precision Plus Protein"™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

9-(4) Western blot

Se empapó papel de filtro cortado previamente para ajustarse al tamaño del gel de SDS-PAGE con una disolución de metanol al 5%/Tris 25 mM/ácido ε-aminocaproico 40 mM y entonces se puso sobre una placa de cátodo de un sistema de transferencia semiseca de electrodo de platino BE330 (Biocraft Ltd.). A continuación, según el punto anterior (3), tras llevar a cabo SDS-PAGE, se empapó el gel con la misma disolución y entonces se dispuso sobre el papel de filtro sin producir burbujas de aire en el mismo. Posteriormente, se dispuso sobre el gel una membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot Transfer-Medium, Bio-Rad Laboratories, Inc.), equilibrada previamente en metanol al 5%/Tris 25 mM, sin producir burbujas de aire en la misma. Además, también se dispuso papel de filtro empapado previamente con la misma disolución sobre la misma sin producir burbujas de aire en la misma y finalmente se dispuso el papel de filtro empapado con metanol al 5%/Tris 300 mM sobre el mismo sin producir burbujas de aire. Además, se puso un electrodo anódico sobre el mismo para llevar a cabo la transferencia a 2 mA/cm² a temperatura ambiente durante dos horas. Tras la terminación de la transferencia, se empapó la membrana de nitrocelulosa con Block-Ace (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) para llevar a cabo una operación de bloqueo a 37°C durante una hora. Después de eso, se permitió que reaccionase la membrana de nitrocelulosa con 10 ml de 6,8 µg/ml de anticuerpo F1031-8-3 a 37°C durante dos horas y entonces se lavó con Tween 20 al 0,05%/PBS, seguido por la reacción con un conjugado de anticuerpo anti-IgG de ratón - HRP (DAKO A/S) a 37°C durante una hora. Tras la terminación de la reacción, se lavó la membrana de nitrocelulosa con Tween 20 al 0,05%/PBS. Tras eliminar por lavado los conjugados sin reaccionar, entonces se empapó la membrana con 50 ml de TMB-H (Moss., Inc.) que se diluyó dos veces con agua destilada para producir luminiscencia a 4°C durante la noche en la oscuridad.

9-(5) Purificación de proteína soluble en sangre del suero de paciente que presenta septicemia

Se rellenó una alícuota de 1 ml del F1024-1-3-Sepharose 4 FF preparada en el ejemplo 9-(1) en la columna Econo-Column (Bio-Rad Laboratories, Inc.) de 1 cm de diámetro interno y entonces se equilibró con D-PBS (pH 7,4) que contenía Tween 20 al 0,05%. Simultáneamente, se rellenó 1 ml del S68-Sepharose 4FF preparado en el ejemplo 9-(2) en la columna Econo-Column de 1 cm de diámetro interno y entonces se equilibró con D-PBS (pH 7,4) que contenía Tween 20 al 0,05%. Posteriormente, se conectaron estas dos columnas en tándem de manera que se dispuso la columna con F1024-1-3-Sepharose™ 4B en la punta de la columna con S68-Sepharose™ 4FF. Entonces, se suministraron 18 ml del suero de un paciente que presentaba septicemia al conjunto de columnas en tándem a una velocidad de flujo de 0,02 ml/min. Se eliminó por lavado la proteína que no pudo adsorberse sobre la columna con D-PBS (pH 7,4) que contenía Tween 20 al 0,05%. Después de eso, se separó la columna con S68-Sepharose 4FF del conjunto y se eluyó la proteína adsorbida sobre la columna con S68-Sepharose 4FF a una velocidad de flujo

de 0,2 ml/min. con HCl 10 mM que contenía Tween 20 al 0,05%, durante lo cual se recogieron alícuotas de 2 ml en 10 recipientes, de manera secuencial. A cada uno de los recipientes de fracción se le añadieron previamente 200 µl de bicarbonato de amonio 500 mM, de modo que el pH del eluato pudiera devolverse inmediatamente a pH neutro. Se determinó la concentración de la proteína soluble en sangre en cada fracción que va a detectarse mediante el kit del ejemplo 7-(1) y entonces se liofilizó la fracción que contenía la proteína tras reunirse.

Tras la liofilización, entonces se disolvió el polvo liofilizado mediante la adición de 0,2 ml de una disolución de acetato de amonio 150 mM que contenía Tween 20 al 0,05%, seguido por centrifugación a 3.500 x g durante 10 minutos.

Se sometió el sobrenadante a una filtración en gel usando Superdex 75 10/300GL (Amersham Biosciences). El tampón de elución usado era una disolución de acetato de amonio 150 mM que contenía Tween 20 al 0,05% y entonces se añadió a la columna dotada con 0,2 ml de la muestra a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min. Desde 7 u 8 minutos tras la adición de la muestra, se recogieron alícuotas de 0,45 ml en 40 recipientes, sucesivamente.

Se sometió cada fracción a la medición con el kit del ejemplo 7-(1) y un kit de EIA para CD14 disponible comercialmente (IBL-Hamburg). Como resultado, la proteína soluble en sangre que podía detectarse mediante el kit del ejemplo 7-(1) se encontró en las fracciones 11-13 con un pico en la fracción 12, y se obtuvieron 1,1 g de proteína soluble en sangre a partir de 18 ml del suero del paciente que presentaba septicemia. Además, el pico de la proteína estaba ubicado en la posición de 29 ± 5 kDa. Los marcadores de peso molecular usados fueron BSA (67,0 kDa), ovoalbúmina (43,0 kDa), quimotripsinógeno A (25,0 kDa) y ribonucleasa A (13,7 kDa) en kit de calibración LMW de filtración en gel (Amersham Biosciences), respectivamente.

Posteriormente, se sometieron estas fracciones de la filtración en gel al análisis de western blot mostrado en el ejemplo 9-(4). Se identificó la proteína soluble en sangre que podía detectarse mediante el kit del ejemplo 7-(1) y entonces determinó el peso molecular de la misma, usando los patrones de doble color Precision plus protein™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Como resultado, la concentración de la proteína aumentó o disminuyó de acuerdo con los resultados de la medición con las fracciones sometidas a filtración en gel con el kit del ejemplo 7-(1). Para la proteína soluble en sangre que tiene un pico en la fracción 12, se detectó una banda de 13 ± 2 kDa en peso molecular (figuras 6 y 7).

(Ejemplo 10) Purificación de proteína soluble en sangre procedente de suero humano normal

10-(1) Purificación de proteína soluble en sangre procedente de suero humano normal

Se analizó cuantitativamente un suero humano normal adquirido de Nippon Biotest Laboratories inc. usando el kit del ejemplo 7-(1), dando como resultado un nivel de 61 ng/ml.

Posteriormente, se rellenaron 20 ml del portador F1024-1-3-Sepharose 4B preparado en el ejemplo 9-(1) en una columna XK 26/columna 20 (Amersham Biosciences) y entonces se equilibró con D-PBS (pH 7,4) que contenía Tween 20 al 0,05%. Además, se rellenaron 8 ml del portador S68-Sepharose 4FF preparado en el ejemplo 9-(2) en una columna XK 16/columna 20 (Amersham Biosciences) y asimismo se equilibró con D-PBS (pH 7,4) que contenía Tween 20 al 0,05%.

A continuación, se conectaron estas dos columnas en tándem de manera que se dispuso la columna con F1024-1-3-Sepharose 4B en la punta de la columna con S68-Sepharose 4FF. Entonces, se suministraron 1,3 l del suero humano normal en el conjunto de columnas conectadas a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Se eliminó por lavado la proteína que no pudo adsorberse sobre la columna con D-PBS (pH 7,4) que contenía Tween 20 al 0,05%. Después de eso, se separó del conjunto la columna con S68-Sepharose 4FF y se eluyó la proteína adsorbida sobre la columna con S68-Sepharose 4FF a una velocidad de flujo de 1 ml/min. durante 160 minutos con 10 mM HCl que contenía Tween 20 al 0,05%, durante lo cual se recogieron alícuotas de 20 ml en diferentes recipientes, sucesivamente. A cada uno de los recipientes usados, se le añadieron previamente 2 ml de bicarbonato de amonio 500 mM, de modo que el pH del eluato pudiera devolverse inmediatamente a pH neutro. Se determinó la concentración de la proteína soluble en sangre en cada fracción que iba a detectarse mediante el kit del ejemplo 7-(1) y entonces se liofilizó la fracción que contenía tal proteína tras reunirse.

Se disolvió el polvo liofilizado resultante mediante la adición de 1 ml de una disolución de acetato de amonio 150 mM que contenía Tween 20 al 0,05%, y entonces se filtró a través de un filtro de tamaño de poro de 0,22 µm (Myllex GV13, Millipore), seguido por filtración en gel con una columna Superdex 75 10/300 GL (Amersham Biosciences). El tampón de elución usado era una disolución de acetato de amonio 150 mM que contenía Tween 20 al 0,05% y entonces se añadió a la columna dotada con 0,5 ml de la muestra a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min. Desde 7 u 8 minutos tras la adición de la muestra, se recogieron alícuotas de 0,45 ml en 40 recipientes, sucesivamente. Se llevó a cabo la filtración en gel dos veces.

Se sometió cada fracción a la medición con el kit del ejemplo 7-(1) y un kit de EIA para CD14 disponible comercialmente (IBL-Hamburg). Como resultado, la proteína soluble en sangre que podía detectarse mediante el kit del ejemplo 7-(1) se encontró en las fracciones 11-13 con un pico en la fracción 12. Además, el pico de la proteína que se obtuvo de la misma manera que la del ejemplo 9-(4) estaba ubicado en la posición de 29 ± 5 kDa.

Posteriormente, se sometieron estas fracciones obtenidas mediante filtración en gel al análisis de western blot mostrado en el ejemplo 9-(4). Se identificó la proteína soluble en sangre que podía detectarse mediante el kit del ejemplo 7-(1) y entonces determinó el peso molecular de la misma, usando los patrones de doble color Precision plus protein™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Como resultado, la concentración de la proteína aumentó o disminuyó de acuerdo con los resultados de la medición con las fracciones sometidas a filtración en gel con el kit del ejemplo 7-(1). Para la proteína soluble en sangre que tiene un pico en la fracción 12, se detectó una banda de 13 ± 2 kDa en peso molecular (figura 8).

Se reunió la fracción anterior y se liofilizó. Se disolvió la preparación liofilizada resultante mediante la adición de 100 μ l de una disolución de acetato de amonio 150 mM que contenía Tween 20 al 0,05%. Posteriormente, usando el kit del ejemplo 7-(1), se determinó la cantidad de la proteína soluble en sangre recogida. Como resultado, se obtuvieron 19 μ g de la proteína soluble en sangre a partir de 1,3 l del suero humano normal.

10-(2) Identificación de la secuencia de aminoácidos

[1] Electrotransferencia

La proteína soluble en sangre que podía detectarse mediante el kit del ejemplo 7-(1) y liofilizada en el ejemplo 10-(1) se reveló en un gel de acrilamida mediante SDS-PAGE descrita en el ejemplo 9-(3) y entonces se sometió a electrotransferencia sobre una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (denominado a continuación en el presente documento PVDF). En otras palabras, se puso papel de filtro empapado con una disolución de metanol al 20%/Tris 25 mM/ácido ϵ -aminocaproico 40 mM sobre un cátodo de un sistema de transferencia, que es sistema de transferencia semiseca con electrodo de platino (Biocraft Ltd.), y entonces se dispusieron sobre el mismo un gel de acrilamida tras electroforesis y una membrana de PVDF (Clear Blot Membrane P (ATTO Corporation)). Además, se dispusieron papel de filtro empapado con metanol al 20%/Tris 25 mM y papel de filtro empapado con metanol al 20%/0,3 M Tris sobre los mismos en este orden. Finalmente, se puso un electrodo anódico del sistema sobre los mismos para llevar a cabo una transferencia a una corriente constante de 2 mA/cm² durante una hora.

[2] Detección de la proteína transferida

Se empapó la membrana de PVDF tras la electrotransferencia con una disolución de azul brillante de Coomassie G250 al 0,1%/ácido acético al 10%/acetonitrilo al 30% durante aproximadamente cinco minutos, seguido por decoloración apropiada con una disolución de ácido acético al 10%/acetonitrilo al 30% para detectar la proteína de interés.

[3] Análisis de la secuencia de aminoácidos

Se cortó la banda de proteína de 13 ± 2 kDa en peso molecular que se detectó sobre la membrana de PVDF, de la membrana con un cortador limpio y entonces se transfirió a un tubo de microcentrifugación de 1,7 ml. Se lavó el fragmento de membrana de PVDF tres veces con una disolución de ácido trifluoroacético al 0,1%/metanol al 50% y adicionalmente con metanol, seguido por el secado completo del fragmento. Se analizó la secuencia de aminoácidos usando un secuenciador de proteínas, Procise 494 cLC (Applied Biosciences JAPAN, Ltd.). Se montó el fragmento de membrana de PCDV tras lavado en el secuenciador de proteínas y se fijó entonces un ciclo analítico requerido para llevar a cabo el análisis. Como resultado, como secuencia principal, se confirmó un péptido que tenía una secuencia de aminoácidos de Thr Thr Pro Glu Pro Xaa Glu Leu Asp Asp Glu en el extremo N-terminal.

A propósito, Xaa puede ser Cys, Asn, Ser, Thr, o cualquiera de otros aminoácidos modificados basándose en los rasgos del secuenciador de proteínas. Sin embargo, considerando que la proteína analizada es una proteína derivada de CD14, puede ser Cys. Además, el análisis de aminoácidos con el método de alquilación reductora puede revelar que Xaa es Cys.

A partir de esos resultados, la fracción en la que se extrajo la banda de 13 ± 2 kDa en peso molecular de SDS-PAGE al 12,5% en condiciones no reductoras tras la filtración en gel, tiene un buen grado de pureza. Por tanto, se encuentra que la proteína soluble en sangre que va a detectarse mediante el kit del ejemplo 7-(1) estaba purificada.

Además, se encontró que la proteína soluble en sangre detectada mediante el kit del ejemplo 7-(1) era una proteína novedosa que tiene una secuencia de aminoácidos de Thr Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu desde el primer residuo de CD14 en el extremo N-terminal y un peso molecular de 13 ± 2 kDa determinado mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Además, como la proteína soluble en sangre puede detectarse mediante el kit del ejemplo 7-(1), se reconoce que la proteína se unirá específicamente al anticuerpo preparado usando un péptido que consiste en 16 residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 2 como antígeno.

A partir de los resultados de los ejemplos 9 y 10, se revela que la proteína soluble en sangre detectada mediante el kit del ejemplo 7-(1) y confirmada en el suero de un paciente que presenta septicemia también puede encontrarse en el suero humano normal. Además, la proteína se recogería a una mayor tasa en el suero de un paciente que presenta septicemia.

Además, aunque se usó un sistema de ensayo de tipo sándwich usando MEM-18 (Monosan) como anticuerpo

inmovilizado y 3C10 marcado como anticuerpo marcado en vez del kit IBL usado en los ejemplos 8-10, se obtuvieron los mismos resultados que los obtenidos mediante el kit IBL.

Se llevó a cabo el marcaje según la descripción en el ejemplo 3-(3) y se preparó el sistema de ensayo de tipo sándwich según el ejemplo 7-(1).

5 (Ejemplo 11) Medición en pacientes que presentaban diversas clases de enfermedades

Se usaron 10 ejemplos a partir de los que se identificaron aislados (tabla 5) como los sueros de pacientes que presentaban septicemia. Además, se llevó a cabo el ensayo usando el kit de ensayo descrito en el ejemplo 7-(1) con 52 ejemplos de donantes normales (hombres, 31 ejemplos y mujeres, 21 ejemplos), y pacientes que presentaban diversas clases de enfermedades (20 enfermedades, 60 ejemplos).

10

Tabla 5

Número	Sexo	Edad	Bacterias
1	Hombre	41	Bacterias negativas para coagulasa
2	Mujer	44	Bacterias negativas para coagulasa
3	Mujer	61	Bacterias <i>Faecium</i>
4	Hombre	52	Bacterias <i>Serratia</i>
5	Hombre	37	<i>Escherichia coli</i>
6	Mujer	67	<i>Escherichia coli</i>
7	Hombre	70	<i>Staphylococcus aureus</i>
8	Hombre	51	<i>Pantoea agglomerans</i>
9	Mujer	81	<i>Escherichia coli</i>
10	Hombre	77	<i>Escherichia coli</i>

El nivel de proteína soluble en suero de un donante normal tal como se detecta mediante el kit del ejemplo 7-(1) estaba en el intervalo de 0,008 a 0,100 µg/ml y el promedio del mismo era de 0,04 µg/ml. En el caso de un paciente que presentaba septicemia, el nivel de la proteína soluble estaba en el intervalo de 0,190 a 7,260 µg/ml y el promedio del mismo era de 2,0 µg/ml. El nivel de la proteína soluble del paciente que presentaba septicemia era mayor que los de los donantes normales y pacientes que presentaban otras clases diversas de enfermedades. Entre los pacientes que presentaban otras clases diversas de enfermedades, no hubo ningún paciente que mostrase un alto nivel, en comparación con el del donante normal.

15

(Ejemplo 12) Comparación con kit de ELISA disponible comercialmente para proteína CD14 soluble en sangre

12-(1) Ensayo de proteína CD14 soluble en sangre de pacientes que presentaban diversas clases de enfermedades

20

Se sometieron a prueba las muestras del ejemplo 11 usando el kit de ELISA para CD14 disponible comercialmente (IBL-Hamburg). El nivel de proteína CD14 soluble en suero de un donante normal estaba en el intervalo de 5,6 a 11,2 µg/ml pero se observó un ejemplo de un alto nivel en el caso de un paciente que presentaba septicemia. Sin embargo, se encontraron muchos casos que mostraban altos niveles de proteína CD14 soluble en sueros de pacientes que presentaban diversas clases de enfermedad, de modo que no hubo diferencia con respecto a los

25

12-(2) Comparación con el kit que usa anticuerpo contra S68

Se realizaron la comparación con y la investigación de los niveles medidos de la proteína soluble determinada en el ejemplo 11. Tal como se muestra en la tabla 6, el kit de EIA para CD14 disponible comercialmente mostró una diferencia de casi 1,7 veces como máximo entre los donantes normales, los pacientes de diversas enfermedades y los pacientes con septicemia, mientras que el kit de ensayo del ejemplo 7-(1) mostró una diferencia de 50 veces entre los donantes normales y los pacientes con septicemia a pesar de no haber diferencia entre los donantes normales y los pacientes de diversas enfermedades. Por tanto, el resultado mostró claramente que el nivel medido mediante el kit de ensayo del ejemplo 7-(1) aumenta específicamente en la septicemia.

30

Tabla 6

	Nivel de CD14 en sangre (µg/ml)			Razón septicemia/normal
	Normal	Diversas clases de enfermedades	Septicemia	
Kit de ensayo del ejemplo 7-(1)	0,04	0,06	2,0	50,0
EIA para CD14 disponible comercialmente	7,6	9,0	13,2	1,7

Se proporcionó el nivel promedio + 3 D.E. de los donantes normales sometidos a prueba como nivel de punto de corte (kit de medición del ejemplo 7-(1): 0,134 µg/ml, EIA para CD14 disponible comercialmente: 11,14 µg/ml) y entonces se dividieron los análisis en muestras positivas (septicemia) y muestras negativas (normal + diversas enfermedades). Se mostraron los resultados en la tabla 7. Según los resultados, se calcularon una tasa de identidad entre ambos kits ((el número de identidad para EIA positivo + el número de identidad para EIA negativo) / total x 100), sensibilidad (el número de identidad para EIA positivo / muestras positivas x 100), y especificidad (el número de identidad para EIA negativo / muestras negativas x 100). Como resultado, tal como se muestra en la tabla 8, en el caso del kit del ejemplo 7-(1), la tasa de identidad era del 94,3%, la sensibilidad era del 100,0% y la especificidad era del 93,8%. Por tanto, se encontró que el kit del ejemplo 7-(1) podía ser útil en diagnóstico diferencial en septicemia mediante la definición del nivel de punto de corte. Por otra parte, en el caso del EIA para CD14 disponible comercialmente, no hubo sensibilidad y especificidad que fuesen específicas para permitir el diagnóstico de septicemia.

Tabla 7

Clasificación	Muestra positiva	Muestra negativa		Total
Enfermedad	Septicemia	Normal	Diversas clases de enfermedades	
Kit de ensayo del ejemplo 9-(1)	10	51	54	115
EIA para CD14 disponible comercialmente	6	51	45	102
Total	0	52	60	122

Tabla 8

	Kit de ensayo del ejemplo 7-(1)	EIA para CD14 disponible comercialmente
Tasa de identidad (%)	94,3%	83,6%
Sensibilidad (%)	100,0%	60,0%
Especificidad (%)	93,8%	85,7%

(Ejemplo 13) Preparación de fragmento de CD14 soluble recombinante

Se preparó este fragmento para expresar la proteína soluble en sangre purificada en el ejemplo 10 (también puede denominarse a continuación en el presente documento subtipo de CD14 soluble, o abreviarse como sCD14-ST de bajo peso molecular) como proteína recombinante.

13-(1) Construcción de plásmido para expresión de producto modificado de CD14 con extremo C-terminal deleciónado

Para preparar un fragmento de CD14 soluble recombinante (también puede denominarse a continuación en el presente documento subtipo de CD14 soluble recombinante o abreviarse como rsCD14-ST), se construyó un plásmido que produce CD14 con extremo C-terminal deleciónado.

Plásmidos de expresión que son pCAG65, pCAG70, pCAG75, pCAG80, pCAG85, pCAG90, pCAG95, pCAG100, pCAG105 y pCAG110, que expresan cada uno en células de mamífero moléculas de CD14 humana (SEQ ID NO: 3) incluyendo:

1) una molécula en la que se delecióna una parte de desde la posición 66 hasta el extremo C-terminal (se describirá a continuación en el presente documento como CD14 (1-65), y lo mismo puede decirse a continuación en el presente documento);

2) una molécula en la que se delecióna una parte de desde la posición 71 hasta el extremo C-terminal (CD14 (1-70));

3) una molécula en la que se delecióna una parte de desde la posición 76 hasta el extremo C-terminal (CD14 (1-75));

4) una molécula en la que se delecióna una parte de desde la posición 81 hasta el extremo C-terminal (CD14 (1-80));

5) una molécula en la que se delecióna una parte de desde la posición 86 hasta el extremo C-terminal (CD14 (1-85));

6) una molécula en la que se delecióna una parte de desde la posición 91 hasta el extremo C-terminal

(CD14 (1-90));

7) una molécula en la que se deleciona una parte de desde la posición 96 hasta el extremo C-terminal (CD14 (1-95));

8) una molécula en la que se deleciona una parte de desde la posición 101 hasta el extremo C-terminal (CD14 (1-100));

9) una molécula en la que se deleciona una parte de desde la posición 106 hasta el extremo C-terminal (CD14 (1-105)); y

10) una molécula en la que se deleciona una parte de desde la posición 111 hasta el extremo C-terminal (CD14 (1-110)) se construyeron usando el método descrito a continuación.

Se diseñaron los siguientes cebadores: un cebador sentido 1 (5'-TTT CCT ACA GCT CCT GGG-3') (SEQ ID NO: 11) y un cebador antisentido 1 (5'-GG GGT ACC TTA GTC AGC ATA CTG CCG CGG GTC-3') (SEQ ID NO: 12); un cebador antisentido 2 (5'-GG GGT ACC TTA GAG AGC CTT GAC CGT GTC AGC-3') (SEQ ID NO: 13); un cebador antisentido 3 (5'-GG GGT ACC TTA GAG CCG CCG CAC GCG GAG AGC-3') (SEQ ID NO: 14); un cebador antisentido 4 (5'-GG GGT ACC TTA TGC GGC TCC CAC TGT GAG CCG-3') (SEQ ID NO: 15); un cebador antisentido 5 (5'-GG GGT ACC TTA CTG AGC AGG AAC CTG TGC GGC-3') (SEQ ID NO: 16); un cebador antisentido 6 (5'-GG GGT ACC TTA GGC GCC TAC CAG TAG CTG AGC-3') (SEQ ID NO: 17); un cebador antisentido 7 (5'-GG GGT ACC TTA CGC TAG CAC ACG CAG GGC GCC-3') (SEQ ID NO: 18); un cebador antisentido 8 (5'-GG GGT ACC TTA CTT GAG GCG GGA GTA CGC TAG-3') (SEQ ID NO: 19); un cebador antisentido 9 (5'-GG GGT ACC TTA CTC GAG CGT CAG TTC CTT GAG-3') (SEQ ID NO: 20); y un cebador antisentido 10 (5'-GG GGT ACC TTA GGT TAT CTT TAG GTC CTC GAG-3') (SEQ ID NO: 21). A continuación, se llevó a cabo PCR usando pCAG356 como molde y un conjunto de cebadores: un cebador sentido 1 y un cebador antisentido 1; un cebador sentido 1 y un cebador antisentido 2; un cebador sentido 1 y un cebador antisentido 3; un cebador sentido 1 y un cebador antisentido 4; un cebador sentido 1 y un cebador antisentido 5; un cebador sentido 1 y un cebador antisentido 6; un cebador sentido 1 y un cebador antisentido 7; un cebador sentido 1 y un cebador antisentido 8; un cebador sentido 1 y un cebador antisentido 9; y un cebador sentido 1 y un cebador antisentido 10 respectivamente. Se fijó la condición de reacción de PCR para calentar a 90°C durante 2 minutos, seguido por la repetición 30 veces de un ciclo de (i) calentamiento a 98°C durante 10 segundos, (ii) calentamiento a 50°C durante 30 segundos, y (iii) calentamiento a 72°C durante 1 minuto, para obtener de ese modo un producto. Se digirieron doblemente los productos resultantes usando las enzimas de restricción EcoRI y KpnI para recoger cada fragmento de 0,4 kb a 0,5 kb. Se ligaron esos fragmentos a un fragmento de aproximadamente 4,8 kb obtenido mediante escisión de pCAG356 con las enzimas de restricción EcoRI y KpnI, seguido por transformación de *E. coli* JM109 según el método convencional para obtener cada uno de los plásmidos de expresión. Se observa que pCAG356 es un plásmido obtenido mediante la inserción de un gen CD14 derivado de un plásmido pUCH14 P-4 descrito en el documento WO98/39438 en pCGAAS (GENE, vol.15 págs. 269-277 (1989)).

13-(2) Construcción de plásmido de expresión de CD14 que tiene secuencia de escisión de proteasa insertada en el mismo

La cantidad de rsCD14-ST producida mediante el método de producción usando el plásmido descrito en el ejemplo 13-(1) era muy pequeña. Por tanto, se consideró que el fragmento expresado en el método de producción de rsCD14-ST usando el plásmido descrito en el ejemplo 1-(1) no podía usarse como material de referencia que ha de purificarse para obtener un producto puro. Por tanto, se seleccionó un método que implicaba las etapas de insertar una secuencia de escisión de una proteasa que escinde específicamente en la posición 64 de CD14 que tiene 356 residuos de aminoácido de longitud en el plásmido, escindir específicamente la secuencia mediante una proteasa tras la expresión de la CD14 de longitud completa, aislar una parte en las posiciones 1-64 de SEQ ID NO: 3 de la parte restante y purificar para preparar rsCD14-ST. Se usaron dos secuencias de escisión que incluían una secuencia de reconocimiento de la proteasa PreScission y una secuencia de reconocimiento de trombina para la proteasa.

13-(2)-1 Construcción de plásmido de expresión de rsCD14-ST (PSP64/356)

Se construyó un plásmido para la expresión de rsCD14 (también denominado a continuación en el presente documento rsCD14-ST (PSP64/356)) que tiene una secuencia de reconocimiento de la proteasa PreScission (8 residuos amino: LEVLFGGP, cada uno representado por una única letra) insertada entre los aminoácidos de Ala en la posición 64 y Asp en la posición 65 de CD14 humana descrita en SEQ ID NO: 3, mediante el método descrito a continuación. Se diseñaron y sintetizaron un cebador sentido 1 (5'-TTT CCT ACA GCT CCT GGG-3'), un cebador sentido 2 (5'-GCT CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC GAC ACG GTC AAG GCT CTC CGC GTG CGG-3') (SEQ ID NO: 22), un cebador antisentido 11 (5'-GTC GGG CCC CTG GAA CAG AAC TTC CAG AGC ATA CTG CCG CGG GTC GGC GTC CGC-3') (SEQ ID NO: 23) y un cebador antisentido 12 (5'-TCT CCA TTC CTG TGT TGC GC-3') (SEQ ID NO: 24), respectivamente. Se usó un plásmido pCAG356 en el que se insertó una secuencia génica estructural de CD14 humana soluble descrita en SEQ ID NO: 3, como molde para llevar a cabo PCR usando A: el cebador sentido 1 y el cebador antisentido 11 y B: el cebador sentido 2 y el cebador antisentido 12. Las condiciones

de reacción de PCR fueron: para A, calentamiento a 90°C durante 2 min., seguido por la repetición 30 veces de un ciclo de (i) 98°C durante 10 s, (ii) 50°C durante 30 s y (iii) 72°C durante 1 min.; y para B, calentamiento a 90°C durante 2 min., seguido por la repetición 30 veces de un ciclo de (i) 98°C durante 10 s, (ii) 46°C durante 30 s y (iii) 72°C durante 1 min. Se recogieron los productos amplificados por PCR resultantes A: aproximadamente 0,5 kb y B: aproximadamente 0,5 kb. Posteriormente, se llevaron a cabo reacciones de PCR usando estas dos mezclas como moldes y el cebador sentido 1 y el cebador antisentido 12, respectivamente. Se usaron las mismas condiciones de reacción de PCR que las de A anteriormente. Se recogió el producto amplificado por PCR resultante de aproximadamente 0,9 kb y entonces se escindió mediante las enzimas de restricción EcoRI y XhoI. Se ligó el fragmento obtenido a un fragmento de aproximadamente 5,2 kb obtenido mediante la escisión de pCAG356 con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI, seguido por transformación de *E. coli* JM109 mediante el método convencional. El plásmido obtenido se denominó pCAG356 (PSP64/356). Además, se digirió pCAG356 con las enzimas de restricción EcoRI y KpnI y se recogió un fragmento de aproximadamente 1,3 kb. Este fragmento se ligó a un fragmento de aproximadamente 4,4 kb obtenido mediante la digestión del vector de expresión en células de mamífero pTK-2043 que tiene el promotor de EF-1 α humano con EcoRI y KpnI, seguido por transformación de *E. coli* JM109 mediante el método convencional. Por consiguiente, se obtuvo pTK356 (PSP64/356).

13-(2)-2 Construcción del plásmido de expresión de rsCD14-ST (2ST64/356)

Se construyó un plásmido para la expresión de rsCD14 (también denominado a continuación en el presente documento rsCD14-ST (2ST64/356) que tiene una secuencia de reconocimiento de trombina (6 residuos amino: LVPRGS) insertada entre los aminoácidos de Ala en la posición 64 y Asp en la posición 65 en CD14 humana descrita en SEQ ID NO: 3, mediante el método descrito a continuación. Se diseñaron y sintetizaron un cebador sentido 3 (5'-CTG GTT CCG CGT GGT TCC GAC ACG GTC AAG-3') (SEQ ID NO: 25), un cebador antisentido 13 (5'-GAA CCA CGC GGA ACC AGA GCA TAC TGC CGC-3') (SEQ ID NO: 26) y un cebador antisentido 14 (5'-CGG GAT CCT CAA TGA TGA TGA TGA TGA TGG-3') (SEQ ID NO: 27), respectivamente. Se usó un plásmido pCAG356-His que tiene una secuencia génica estructural de una molécula en la que se añadió una etiqueta de His (His X 6) al extremo C-terminal de una CD14 humana soluble de un plásmido pCAG356, como molde para llevar a cabo PCR usando A: el cebador sentido 1 y el cebador antisentido 13 y B: el cebador sentido 3 y el cebador antisentido 14. Las condiciones de reacción de PCR fue calentamiento a 96°C durante 2 min., seguido por la repetición 25 veces de un ciclo de (i) 96°C durante 30 s, (ii) 55°C durante 30 s y (iii) 72°C durante 1 min. Se recogieron los productos amplificados por PCR resultantes A: aproximadamente 0,5 kb y B: aproximadamente 0,9 kb. Posteriormente, se llevaron a cabo reacciones de PCR usando las dos mezclas como molde y el cebador sentido 1 y el cebador antisentido 4, respectivamente. Se usaron las mismas condiciones de reacción de PCR que las de A anteriormente. Se recogió el producto amplificado por PCR resultante de aproximadamente 1,4 kb y entonces se insertó en un vector pT7-Blue (T). Se confirmó la secuencia de nucleótidos, seguido por escisión con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. Se ligó el fragmento obtenido de aproximadamente 1,3 kb a un fragmento de aproximadamente 4,4 kb obtenido mediante digestión de pTK-2043 con EcoRI y BamHI, seguido por transformación de *E. coli* JM109 mediante el método convencional. Por consiguiente, se obtuvo pTK356H (TB64).

13-(3) Preparación de rsCD14-ST

13-(3)-1 Preparación de rsCD14-ST

Se transfectó cada plásmido descrito en (1) en células COS-1 (ATCC: CRL-1650) usando Eugene 6 (Roche). En otras palabras, según el manual, se mezclaron 1,7 μ l/ml de un reactivo de transfección con 4 μ g/ml del plásmido y se añadió la mezcla a un medio de cultivo, seguido por la adición de células COS-1. Entonces, se incubaron las células a 37°C. Tras 72 horas, se recogió el sobrenadante de cultivo. Se centrifugó el sobrenadante de cultivo y entonces se filtró a través de un filtro de 0,22 μ m.

13-(3)-2 Preparación de rsCD14

Se llevó a cabo la transfección de los plásmidos (pTK356 (PSP64/356) y pTK356H (TB64)) que contienen cada uno un gen que codifica para la secuencia de rsCD14-ST tal como se describe en (2)-1 y (2)-2, usando Eugene 6 (Roche) para células COS-1. En otras palabras, según el manual, se mezclaron 1,7 μ l/ml de un reactivo de transfección con 4 μ g/ml del plásmido y se añadió la mezcla a un medio de cultivo, seguido por la adición de células COS-1. Entonces, se incubaron las células a 37°C. Tras 72 horas, se recogió el sobrenadante de cultivo, mientras que se suministró un medio nuevo. Se incubaron adicionalmente las células durante 96 horas y también se recogió el sobrenadante de cultivo. Se centrifugó el sobrenadante de cultivo y entonces se filtró a través de un filtro de 0,22 μ m, seguido por purificación.

13-(3)-3 Preparación de rsCD14-ST (2)

A partir de cada sobrenadante de cultivo producido en el punto (3)-2, se purificaron rsCD14-ST (PSP64/356) y rsCD14-ST (2ST64/356) y entonces se escindieron mediante una proteasa, seguido por purificación de sCD14-ST.

<1> Purificación de rsCD14-ST (2ST64)

Se llevaron a cabo los siguientes procedimientos a 4°C a menos que se especifique de otro modo.

Se vertió un volumen equivalente de una disolución acuosa de sulfato de níquel 0,1 M en el portador Chelating-Sepharose FF (Amersham Biosciences). Entonces, se vertieron tres volúmenes de agua destilada en la columna para eliminar por lavado el níquel sin reaccionar. Por consiguiente, se preparó un portador níquel-Sepharose.

Se aplicaron 1000 ml de sobrenadante de cultivo de COS-1 obtenido en el punto (3)-2 a una columna con níquel-Sepharose de 40 ml equilibrada con PBS a una velocidad de flujo de 8 ml/min para eliminar por lavado con PBS la proteína no adsorbida. Posteriormente, se eluyó cualquier proteína no adsorbida específicamente mediante PBS que contenía imidazol 20 mM y entonces se eluyó la proteína de interés mediante PBS que contenía imidazol 500 mM. Se dializó el eluato frente a PBS durante la noche.

Se determinó la concentración de proteína en el dializado usando el procedimiento descrito en el ejemplo 15-(3) a continuación. Basándose en este resultado, se añadió proteasa trombina (Amersham Biosciences) de modo que se obtuviese la razón de enzima:sustrato = 1: 50 (U:µg) y entonces se dejó en reposo a 22°C durante la noche, seguido por que se llevó a cabo la reacción de escisión con trombina.

Se terminó la reacción enzimática mediante la adición de 1/10 volúmenes de una disolución acuosa de benzamidina 100 mM.

Posteriormente, a la mezcla resultante se le añadieron dos volúmenes de un tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,5) que contenía urea 8 M. Se vertió la disolución en una columna con Q-Sepharose HP de 3 ml (Amersham Biosciences) equilibrada previamente con un tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,5) que contenía urea 8 M a una velocidad de flujo de 3 ml/min. Se eliminó por lavado la proteína no adsorbida con el mismo tampón y se eluyó entonces la proteína adsorbida con un gradiente de concentración lineal de NaCl 0-500 mM (50 minutos). Se recogieron alícuotas de 3 ml del eluato en diferentes recipientes, secuencialmente. Se determinó el contenido de una fracción, que correspondía a rsCD14-ST (también denominado a continuación en el presente documento rsCD14-ST (2ST64)) obtenido mediante el corte de la posición 65 de rCD14-ST (2ST64/356) de cada fracción, mediante el kit descrito en el ejemplo 7-(3).

Se reunió la fracción que contenía rsCD14-ST (2ST64) y entonces se dializó durante la noche para una disolución acuosa de hidrogenocarbonato de amonio 150 mM, seguido por liofilización. Se disolvió la preparación liofilizada resultante en PBS que contenía urea 8 M y entonces se suministró a una columna Superdex 75 10/300 GL (Amersham Biosciences) equilibrada previamente con el mismo tampón a una velocidad de flujo de 0,4 ml/min. Se llevaron alícuotas de 0,45 µl de la disolución de columna a 40 recipientes, respectivamente. Se confirmó la pureza de rsCD14-ST (2ST64) en cada fracción mediante SDS-PAGE y entonces se reunieron. Es decir, se añadió un volumen equivalente de Tris-SDS-Sephasol (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.) a cada fracción y entonces se calentó a 100°C durante cinco minutos, seguido por la aplicación de la mezcla a un gel de e-PAGE al 5-20% (ATTO Corporation) para llevar a cabo electroforesis usando los procedimientos de Laemmli a 25 mA durante 90 minutos. Tras la terminación de la electroforesis, se tiñó el gel con el kit de tinción con plata, 2D Silver Stain II "Daiichi" (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.). Se dializó la preparación de 2ST64 frente a agua destilada durante la noche para obtener una preparación purificada final. Se determinó la concentración de proteína en la preparación purificada final según el procedimiento descrito en el ejemplo 15-(3) a continuación. A partir de la operación descrita anteriormente, se obtuvieron 452 µg de rsCD14-ST (2ST64) a partir del sobrenadante de 1.000 ml del medio de cultivo de células COS-1. Se confirmó la pureza de la preparación purificada así obtenida usando SDS-PAGE. Tal como se muestra en la figura 9, se detectó como una única banda.

<2> Purificación de rsCD14-ST (PSP64)

Se llevaron a cabo los siguientes procedimientos a 4°C a menos que se especifique de otro modo.

Se aplicó el sobrenadante de cultivo de COS-1 obtenido en el punto (3)-2 a la columna con 3C10-Sepharose 4FF equilibrada previamente con PBS a una velocidad de flujo de 9 ml/min., y entonces se eliminó por lavado la proteína no adsorbida con PBS, seguido por la elución de la proteína adsorbida mediante HCl 10 mM. A la fracción eluida se le añadieron 1/10 volúmenes de bicarbonato de amonio 500 mM, de modo que el pH del eluato pudiera devolverse inmediatamente a pH neutro. Después de eso, se liofilizó la fracción eluida. Además, se preparó la columna con 3C10-Sepharose 4FF tal como sigue: se dializó el anticuerpo 3C10 a 4°C durante la noche usando una membrana de diálisis que tenía un punto de corte de peso molecular de 10 kDa y 2,5 µl de un dializado (es decir, NaHCO₃ 0,2 M (pH 8,3) que contenía NaCl 0,5 M). Se sustituyó el dializado por nuevo tres veces. Posteriormente, se añadió la columna con Sepharose 4 Fast Flow activada con NHS (Amersham Biosciences) equilibrada previamente con NaHCO₃ 0,2 M (pH 8,3) que contenía NaCl 0,5 M a la disolución de anticuerpo 3C10 dializado para llevar a cabo una reacción de acoplamiento a 4°C durante la noche. A continuación, se añadió monometanamina 0,5 M (pH 8,3) que contenía NaCl 0,5 M al portador para llevar a cabo una reacción de bloqueo a 4°C durante la noche. Tras la terminación de la reacción de bloqueo, se lavó el portador con acetato de sodio 0,1 M (pH 4,0) que contenía NaCl 0,5 M y posteriormente con NaHCO₃ 0,2 M (pH 8,3) que contenía NaCl 0,5 M.

Se disolvió la preparación liofilizada resultante en un tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7) que contenía EDTA 1 mM y NaCl 150 mM y entonces se determinó la concentración de proteína en la misma según el procedimiento descrito en el ejemplo 15-(3) a continuación. Después de eso, se añadió la proteasa PreScission (Amersham Biosciences) de

modo que se obtuviese la razón de enzima:sustrato = 1:3 (U:µg) y entonces se dejó en reposo a 4°C durante la noche para llevar a cabo a la reacción de escisión. Tras la terminación de la reacción, a la mezcla resultante se le añadieron dos volúmenes de un tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,5) que contenía urea 8 M y entonces se aplicó la mezcla a una columna con Q-Sepharose HP de 2 ml a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Se eliminó por lavado la proteína no adsorbida con el mismo tampón y entonces se eluyó mediante un gradiente de concentración lineal de NaCl 0-500 mM (100 minutos). Se recogieron alícuotas de 3 ml del eluato en diferentes recipientes, secuencialmente. Se determinó el contenido de una fracción, que correspondía a rsCD14-ST (también denominado a continuación en el presente documento rsCD14-ST (PSP64)) obtenido mediante corte de rCD14-ST (PSP64/356) de cada fracción en la posición 65, mediante el kit descrito en el ejemplo 7-(3).

Se reunió la fracción que contenía rsCD14-ST (PSP64) y entonces se dializó durante la noche para una disolución acuosa de hidrogenocarbonato de amonio 150 mM, seguido por liofilización. Se disolvió la preparación liofilizada resultante en PBS que contenía urea 8 M y entonces se suministró a una columna Superdex 75 10/300 GL (Amersham Biosciences) equilibrada previamente con el mismo tampón a una velocidad de flujo de 0,4 ml/min. Se llevaron alícuotas de 0,45 ml de la disolución de columna a 40 recipientes, respectivamente. Se confirmó la pureza de rsCD14-ST (PSP64) en cada fracción mediante SDS-PAGE mostrada en el punto <1> y entonces se reunió. Se dializó la preparación de rsCD14-ST (PSP64) frente a agua destilada durante la noche para obtener una preparación purificada final. Se determinó la concentración de la proteína en la preparación purificada final según el procedimiento descrito en el ejemplo 15-(3) a continuación. A partir de la operación descrita anteriormente, se obtuvieron 368 µg de PSP64 a partir del sobrenadante de 13.000 ml del medio de cultivo de células COS-1. Se confirmó la pureza de la preparación purificada así obtenida usando SDS-PAGE. Tal como se muestra en la figura 9, se detectó como una única banda.

(Ejemplo 14) Evaluación de rsCD14-ST

14-(1) Medición de la concentración usando el kit del ejemplo 7-(3)

Para confirmar si se producía rsCD14-ST en el sobrenadante del medio de cultivo preparado en el ejemplo 13-(3)-1, se determinó la concentración de rsCD14-ST en cada sobrenadante de cultivo usando el kit del ejemplo 7-(3).

Se muestran los resultados en la tabla 9. Además, se sometió cada sobrenadante de cultivo a un análisis de western blot mediante el método descrito en el ejemplo 9-(4). Como resultado, no se detectó ninguna banda en absoluto. A partir de este hecho, se determinó que el contenido real de proteína podía ser muy pequeño aunque pudiera producirse rsCD14-ST y detectarse mediante un kit de detección de alta sensibilidad.

Tabla 9

Producto delecionadoado	1-65	1-70	1-75	1-80	1-85	1-90	1-95	1-100	1-105	1-110
Concen-tración (µg/ml)	195	590	273	100	55	16	0,43	0,21	0,29	0,18

Por ejemplo, el producto delecionadoado 1-65 representa un fragmento de las posiciones 1 a 65 de SEQ ID NO: 3 (rsCD14 (1-65)).

14-(2) Detección de rsCD14-ST mediante western blot

Se confirmaron las reactividades de sCD14-ST preparada en el ejemplo 10-(1) y rsCD14-ST (PSP64) preparada en el ejemplo 13-(3)-3 frente al anticuerpo F1106-13-3, el anticuerpo F1031-8-3 y el anticuerpo contra S68, respectivamente. En otras palabras, se llevó a cabo SDS-PAGE usando un gel de SDS-poliacrilamida al 12,5% en condiciones no reductoras según los procedimientos de Laemmli. Se añadió un volumen equivalente de Tris-SDS-Septrasol (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.) a la muestra y entonces se llevó a cabo un tratamiento con SDS a 4°C durante la noche, seguido por la aplicación de la mezcla a un gel de e-PAGEL al 12,5% (ATTO Corporation) para llevar a cabo electroforesis usando el sistema de tampón discontinuo de Laemmli a 40 mA durante 40 minutos.

Se empapó papel de filtro cortado previamente para ajustarse al tamaño del gel de SDS-PAGE con una disolución de metanol al 5%/Tris 25 mM/ácido ε-aminocaproico 40 mM y entonces se puso sobre la placa del cátodo del sistema de transferencia semiseca con electrodo de platino BE320 (Biocraft Ltd.). Posteriormente, se empapó el gel con la misma disolución y entonces se dispuso sobre el papel de filtro sin producir burbujas de aire en el mismo. Después de eso, se dispusieron membranas de nitrocelulosa (Trans-Blot Transfer-Medium, Bio-Rad Laboratories, Inc.), equilibradas previamente en metanol al 5%/Tris 25 mM, sobre el gel sin producir burbujas de aire en el mismo. Además, también se dispuso el papel de filtro empapado previamente con la misma disolución sobre las mismas sin producir burbujas de aire en las mismas y finalmente se dispuso papel de filtro empapado con metanol al 5%/Tris 300 mM sobre el mismo sin producir burbujas de aire. Además, se puso el electrodo anódico sobre el mismo para llevar a cabo transferencia a 2 mA/cm² a temperatura ambiente durante dos horas. Tras la terminación de la transferencia, se empaparon las membranas de nitrocelulosa con Block-Ace (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.)

para llevar a cabo una operación de bloqueo a 37°C durante 80 minutos. Después de eso, se permitió que reaccionasen las membranas de nitrocelulosa con 6,8 µg/ml de anticuerpo F1106-13-3, 6,8 µg/ml de anticuerpo F1031-8-3 y 6,8 µg/ml de anticuerpo contra S68 de uno en uno, a 37°C durante 80 minutos y entonces se lavaron con Tween 20 al 0,05%/PBS, seguido por la reacción de las membranas de nitrocelulosa que se hicieron reaccionar con anticuerpo F1106-13-3 y el anticuerpo F1031-8-3 con un conjugado de anticuerpo anti-IgG de ratón - HRP (DAKO) y la reacción de la membrana de nitrocelulosa que se hizo reaccionar con anticuerpo contra S68 con un conjugado de anticuerpo anti-IgG de conejo - HRP (DAKO) a 37°C durante una hora, respectivamente. Tras la terminación de la reacción, se lavaron las membranas de nitrocelulosa con Tween 20 al 0,05%/PBS. Tras haberse eliminado por lavado el conjugado sin reaccionar, se añadieron 4 ml de ECL (Plus) (Amersham Biosciences) y entonces se hizo reaccionar el conjunto a temperatura ambiente durante cinco minutos, seguido por su colocación en Hyperfilm TM ECL (Amersham Biosciences) y su exposición durante 90 segundos.

Por consiguiente, sCD14-ST y PSP64 mostraron reactividades casi similares frente a tres anticuerpos diferentes, respectivamente.

(Ejemplo 15) Análisis de las propiedades físicas de rsCD14-ST

Se analizaron las propiedades físicas de rsCD14-ST (2ST64) y rsCD14-ST (PSP64) preparados en el ejemplo 13-(3)-3, respectivamente. Para ambos fragmentos, no hay diferencia entre sus productos finales purificados excepto por la proteasa usada para la escisión y, por tanto, son sustancialmente el mismo material en cuanto a rsCD14-ST.

15-(1) Análisis de la secuencia de aminoácidos N-terminal

Se llevó a cabo el análisis de la secuencia de aminoácidos N-terminal usando el secuenciador de proteínas, Procise 494 cLC (Applied Biosystems Japan Ltd.). Como resultado del análisis con la preparación de rsCD14-ST (2ST64) purificada, se confirmó que la secuencia de aminoácidos (TTPEPCELDG) (SEQ ID NO: 1) era un componente principal del primer residuo de CD14. No se confirmó ninguna secuencia de aminoácidos distinta a la de CD14.

15-(2) Espectrometría de masas

Se incubó la preparación de rsCD14-ST (2ST64) purificada a 37°C durante cuatro horas en un tampón fosfato de sodio 20 mM que contenía N-glicosidasa F (Roche Diagnostics K.K.) para eliminar las cadenas de azúcar. Se desmineralizó el 2ST64 con las cadenas de azúcar eliminadas resultante, con ZipTipC18 (Millipore) y se proporcionó como muestra para espectrometría de masas. El espectrómetro de masas usado fue el Autoflex II TOF (Bruker Daltonics Inc.). Se preparó una disolución de matriz disolviendo ácido sinápico de modo que estuviese saturado en trifluoroacetato al 0,1%:acetonitrilo = 2: 1. Se mezcló la muestra para espectrometría de masas con la disolución de matriz a una razón de 1:4 y se usó una alícuota de 1 µl de la misma en la espectrometría de masas. Como resultado de la espectrometría de masas, se detectó como pico principal el pico de peso molecular correspondiente al peso molecular teórico de 7663,5 de la parte del péptido de rsCD14-ST(2ST64). También teniendo en cuenta los resultados del análisis de la secuencia de aminoácidos N-terminal se confirmó que se obtuvo una molécula que tenía una estructura primaria tal como se designó (molécula que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones 1-64 en CD14).

15-(3) Determinación de la concentración de proteína

Se llevó a cabo la medición de concentración de proteína usando el kit de ensayo de BRP (Bio-Rad Laboratories, Inc.) con una preparación patrón de BSA (Bio-Rad Laboratories, Inc.) según el manual adjunto. En otras palabras, se añadieron 1,5 ml de reactivo colorante diluido cinco veces con agua destilada a 30 µl de la muestra diluida hasta diversas concentraciones con la disolución patrón de BSA y PBS y entonces se dejó en reposo la mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos, seguido por la medición de la absorbancia de la muestra a 595 nm usando un espectrofotómetro DU-7400 (Beckmann) para determinar la concentración de proteína en la muestra a partir de la curva de calibración de BSA.

15-(4) Estimación del peso molecular

Para confirmar que rsCD14-ST preparada en el ejemplo 13-(3)-3 y sCD14-ST purificada de pacientes que presentaban septicemia o donantes normales eran proteínas similares, se compararon sus pesos moleculares usando western blot.

Se usó la preparación de sCD14-ST purificada a partir del suero humano normal de manera que se disolvió la preparación liofilizada obtenida en el ejemplo 10-(1) en 100 µl de agua destilada.

Mediante western blot usando el anticuerpo F1031-8-3 representado en el ejemplo 14-(2), se llevó a cabo la comparación entre pesos moleculares usando los patrones de doble color Precision Plus Protein™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Por consiguiente, tal como se muestra en la figura 10, se detectó sCD14-ST derivada de suero humano a un peso molecular de 12,9 kDa, se detectó rsCD14-ST (2ST64) a 12,6 kDa y se detectó rsCD14-ST (PSP64) a 12,6 kDa.

15-(5) Comparación con la actividad específica de la preparación patrón de rsCD14(1-307) S286C

Se determinó la concentración de rsCD14-ST(2ST64) preparado en el ejemplo 13-(3)-3 usando el kit del ejemplo 7-(1) y la preparación patrón de rsCD14 (1-307) S286C y se calculó en cuanto a un valor de EIA por concentración de proteína. En otras palabras, se diluyó rsCD14-ST (2ST64) hasta 100 pg/ml mediante una dilución de muestra del kit. Además, se prepararon 50 y 25 pg/ml de la muestra y entonces se sometieron a la medición con el kit. Como resultado, el valor de rsCD14 (1-307) S286C convertido por 1 pg de sCD14-ST (2ST64) era de 352 pg, de modo que se mostró que el presente kit tenía una reactividad extremadamente alta frente a rsCD14-ST (2ST64).

15-(6) Influencia sobre la capacidad de unión a LPS y la producción de IL-6

Se investigó si rsCD14-ST tenía capacidad de unión a LPS como en la CD14 de longitud completa y el efecto de la inhibición de la producción de IL-6 descrita en el documento WO01/72993.

15-(6)-1 Actividad inhibidora de rsCD14-ST (PSP64) sobre la producción de IL-6

Para investigar la actividad inhibidora de sCD14-ST (PSP64) sobre la producción de IL-6, se llevó a cabo el siguiente experimento. Se inocularon células endoteliales vasculares umbilicales humanas HUVEC (Sanko Junyaku, Co., Ltd.) en una placa de 96 pocillos a una concentración de 2×10^4 células/pocillo con un medio RPMI1640 (Sigma Corporation) que contenía el 2% de FBS inactivado y entonces se incubaron bajo el 5% de CO₂ a 37°C durante la noche. Al día siguiente, se preparó un medio RPMI1640 que contenía suero humano al 2% (denominado a continuación en el presente documento FBS inactivado al 2%/RPMI) y entonces se preparó una muestra mediante la dilución de 2 veces de la concentración deseada de 3C10 que era rsCD14-ST (PSP64) o el anticuerpo anti-CD14, con FBS inactivado al 2%/RPMI. Además, se diluyó LPS (*E. coli* 055: B5, DIFCO) hasta 20 ng/ml con FBS inactivado al 2%/RPMI. Se desechó el sobrenadante de cultivo de las células HUVEC incubadas durante la noche y entonces se lavaron dos veces con un medio RPMI1640 que contenía HSA al 0,1% (Sigma). Se añadieron la muestra y el diluyente de LPS a 50 µl/pocillo, respectivamente. Se incubó la mezcla bajo el 5% de CO₂ a 37°C durante aproximadamente 18 horas adicionales. Después de eso, se determinó cuantitativamente la cantidad de IL-6 en el sobrenadante de cultivo usando el kit de detección de IL-6 humana (Eli-PAIR hIL-6: Invitrogen). Por consiguiente, se inhibió casi el 50% de la producción de IL-6 mediante aproximadamente 0,1 µg/ml de 3C10, mientras que rsCD14-ST (PSP64) no pudo mostrar actividad inhibidora ni siquiera cuando se añadió rsCD14-ST (PSP64) hasta 10 µg/ml.

15-(6)-2 Actividad de unión a LPS de rsCD14-ST (PSP64)

Se investigó la presencia de capacidad de unión a LPS en rsCD14-ST (PSP64) usando el kit Endospecy (Seikagaku Corporation) con referencia a J.B.C., vol. 270, n.º 3 (1995), págs. 1382-1387, "CD14 soluble Truncated at Amino Acid 152 Binds LPS and Enables Cellular Response to LPS". Es decir, se diluyó LPS (*E. coli* 055: B5, DIFCO) con PBS(-) que contenía BSA al 0,01% (denominado a continuación en el presente documento BSA al 0,01%/PBS) para preparar 0,6 ng/ml de una disolución de LPS. Además, se diluyó rhLBP (R&D Systems) con PBS(-) que contenía HSA al 0,1% hasta 100 µg/ml y entonces se mezcló con la disolución de LPS para preparar una disolución de LPS/LBP (la concentración de LPS era de aproximadamente 0,6 ng/ml y la concentración de LBP era de aproximadamente 0,3 nM). Posteriormente, se diluyó rsCD14-ST (PSP64) o rsCD14 (1-356) con BSA al 0,01%/PBS hasta una concentración deseada y entonces se mezcló con la disolución de LPS/LBP en cantidades equivalentes. Tras una reacción a 37°C durante una hora, se añadió el lisado de Endospecy C (conjunto Endospecy-ES-24S; Seikagaku Corporation) y entonces se dejó en reposo el conjunto a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Después de eso, se añadió ácido acético al 25% a la mezcla para terminar la reacción. Entonces, se determinó la absorbancia a 405 nm para calcular la concentración de LPS en la disolución de reacción (denominada a continuación en el presente documento una concentración de LPS libre). Además, se formó una curva de calibración llevando a cabo la operación similar a la de la muestra tras sólo someter el diluyente de LPS a una reacción a 37°C durante una hora. Como resultado, para rCD14 (1-356), una disminución en la cantidad de LPS libre dependía de la concentración de rCD14 (1-356) añadida y se confirmó entonces la unión entre rCD14 (1-356) y LPS.

Sin embargo, para rsCD14-ST (PSP64), aunque se añadiera hasta 100 nM, la cantidad de LPS libre no se alteraba. Se encuentra que rsCD14-ST (PSP64) no tiene capacidad de unión a LPS.

(Ejemplo 16) Examen de la preparación patrón de rsCD14-ST

16-(1) Creación de la curva patrón basándose en la preparación patrón de rsCD14-ST

Se creó una curva patrón usando rsCD14-ST(2ST64) preparado en el ejemplo 13-(3)-3. Es decir, se diluyó rsCD14-ST (2ST64) con un diluyente descrito en el ejemplo 7-(12) para preparar una serie de concentración de 0,06, 0,5, 1,2, 2 y 3 ng/ml, y entonces se llevó a cabo la medición usando el kit del ejemplo 7-(1). Se usó un diluyente como blanco. Tal como se muestra en la figura 11, la absorbancia aumenta a medida que aumenta la concentración. Por tanto, se confirmó que rsCD14-ST (2ST64) puede usarse como preparación patrón del kit.

16-(1) Creación de la curva patrón basándose en la preparación patrón de rsCD14-ST

Se midieron sCD14-ST en el suero humano normal y sCD14-ST en el suero que contenía EDTA usando el kit preparado en el ejemplo 7-(3). En el suero que contenía EDTA, la concentración de sCD14-ST era aproximadamente el doble de alta que en el suero. Esto es debido a que EDTA puede afectar al sistema de ensayo. Por tanto, cuando se añadió EDTA al diluyente de modo que tuviera una concentración de 0,2 mg/ml, aumentó el valor de medición del suero, dando como resultado que no hubiera diferencia con respecto al suero que contenía EDTA. Sin embargo, se observó una disminución en la reactividad para una curva patrón creada usando una preparación patrón de rsCD14 (1-307) S286C. Se encuentra que la presencia o ausencia de EDTA afecta al valor de lectura. Por otra parte, cuando se usa rsCD14-ST como preparación patrón, la adición de EDTA no afecta a la curva patrón. Por consiguiente, se determinó que rsCD14-ST es más preferible para la preparación patrón.

10 (Ejemplo 17) Preparación de anticuerpo usando rsCD14-ST

17-(1) Preparación de anticuerpo policlonal específico contra rsCD14-ST

Para preparar el anticuerpo policlonal contra rsCD14-ST(PSP64) preparado en el ejemplo 13-(3)-3, se inmunizó un conejo. Es decir, se diluyeron 20 µg de rsCD14-ST(PSP64) con 500 µl de solución salina fisiológica y entonces mezcló con 500 µl de adyuvante completo de Freund (DIFCO) en cantidades equivalentes, seguido por la administración subcutánea de la mezcla en el dorso de conejo hembra blanco de Nueva Zelanda (Kitayama Labes) que pesaba de 2,0 a 2,4 kg. Tras 2 semanas, se diluyeron 20 µg de rsCD14-ST (PSP64) con 500 µl de solución salina fisiológica y se mezcló la disolución con 500 µl de adyuvante incompleto de Freund (DIFCO) en cantidades equivalentes, seguido por la administración subcutánea de la mezcla en el dorso. Tras dos semanas adicionales, se administraron 20 µg de rsCD14-ST (PSP64) de la misma manera. Tras una semana desde la administración, se recogió sangre de la vena de la oreja y entonces se aisló antisuero de la sangre mediante el método convencional, seguido por la purificación del anticuerpo. Al principio, se añadió sulfato de amonio al antisuero de manera que la concentración saturada final de sulfato de amonio alcanzase el 33% y entonces se agitó a 4°C durante una hora, seguido por centrifugación de un sedimento precipitado. Posteriormente, se disolvió el precipitado en un PBS de Dulbecco (denominado a continuación en el presente documento PBS (pH 7,4)) y entonces se dializó durante la noche. Se filtró el dializado y entonces se aplicó a una columna con proteína A (Procep-A, Millipore). Se eluyó la fracción de IgG acoplada en la misma con un tampón clorhidrato de glicina 0,1 M (pH 3,0), dando como resultado anticuerpo purificado. Entonces, se dializó el anticuerpo frente a PBS (pH 7,4) y entonces se calculó la concentración de proteína a partir de la absorbancia a 280 nm (coeficiente de absorción: 0,714 mg/ml). A continuación en el presente documento, el anticuerpo resultante se denominará anticuerpo policlonal anti-PSP64 o anticuerpo anti-PSP64.

17-(2) Preparación de anticuerpo monoclonal específico contra sCD14-ST

Para potenciar la antigenicidad, se añadió dinitrofluorobenceno (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a rsCD14-ST (PSP64) preparado en el ejemplo 13-(3)-3 de modo que tuviera una concentración final del 0,1% y entonces se incubó el conjunto a temperatura ambiente durante una hora, seguido por diálisis con PBS (pH 7,4), dando como resultado antígeno que va a administrarse (también denominado a continuación en el presente documento antígeno DNP-PSP64). Entonces, se disolvieron 30 µg del antígeno DNP-PSP64 en 100 µl de solución salina fisiológica y entonces se mezcló la disolución con una cantidad igual de adyuvante completo de Freund (DIFCO), seguido por la administración de 100 µl de antígeno a la planta de la almohadilla de cada pata trasera de una rata Wistar hembra de 8 semanas. Tras dos semanas, se extirpó el ganglio linfático ilíaco y entonces se llevó a cabo fusión celular. Se llevó a cabo la fusión celular según Tamie Ando y Takeshi Chiba: "Introduction to Monoclonal Antibody Experimental Manipulation", página 83, 1991 (Kodansha Ltd.). En otras palabras, se separaron los linfocitos del ganglio linfático usando un separador celular (Falcon) y se mezclaron con células de mieloma (Sp2/O-Ag14) a una razón de 5:1, seguido por fusión celular usando polietilenglicol. Se suspendieron las células fusionadas en un medio HAT y se seleccionaron los hibridomas, seguido por cribado de los hibridomas que producían el anticuerpo diana.

Se realizó el cribado mediante un método de ELISA en el que se inmovilizó rsCD14-ST(PSP64) directamente sobre una placa. Es decir, se añadieron 50 µl de rsCD14-ST(PSP64) diluido con tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) a 2,5 µg/ml a cada pocillo de una inmunoplaaca (Maxisorb, NUNC) y se dejó en reposo a 4°C durante la noche. Después de eso, se lavó la placa con agua sometida a intercambio iónico cinco veces y entonces se añadieron a cada pocillo 100 µl de PBS (pH 7,4) que contenía StabliGuard al 2% (SurModics, Inc.), seguido por dejar la placa en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente para efectuar el bloqueo. Entonces, se añadió a cada pocillo el sobrenadante de cultivo tomado como muestra de los hibridomas seleccionados y se permitió que reaccionase a 37°C durante 1 hora. Después de eso, se lavó la placa tres veces con solución salina fisiológica que contenía Tween 20 al 0,05%. Posteriormente, se añadieron a cada pocillo 50 µl de una disolución obtenida mediante dilución de anticuerpo anti-inmunoglobulina de rata marcado con peroxidasa (DAKO) 1.000 veces con PBS (pH 7,4) que contenía suero de conejo al 10%. Tras una reacción a 37°C durante 1 hora, se lavó la placa cinco veces de la misma manera que anteriormente y se añadió a cada pocillo una disolución de tetrametilbencidina (TMB, BioFix). Tras una reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente, se terminó la reacción con una disolución de ácido sulfúrico 0,5 M y se determinó una absorbancia a 450 nm usando un espectrofotómetro de placa (Multiscan JX, Thermo Electron Corporation). Como resultado, se seleccionó un pocillo que contenía hibridoma que puede producir un anticuerpo que se une a proteína 2ST64. A continuación, a partir del pocillo seleccionado, se realizó clonación mediante un

método de dilución limitante según Tamie Ando y Takeshi Chiba: "Introduction to Monoclonal Antibody Experimental Manipulation", página 97, 1991 (Kodansha Ltd.). Tras 10 días, asimismo, se realizó un cribado usando como índice la reactividad con proteína 2ST64 y se seleccionaron 6 clases de hibridomas. Se cultivaron los hibridomas seleccionados en a FCS al 10%/medio RPMI-1640 (Sigma) y entonces se cultivaron en medio de hibridoma-SFM (Invitrogen) para producir un anticuerpo. Se purificó el anticuerpo usando una columna con proteína G (columna Prosep-G, Millipore). Se determinaron los subtipos del anticuerpo F1237-3-4 y el anticuerpo F1237-4-4 purificados usando un kit de tipificación de rata (ZYMED) y como resultado estos subtipos eran rata IgG2a- κ y IgG2b- κ de rata.

17-(3) Preparación de anticuerpo policlonal anti-rsCD14-ST específico contra rsCD14-ST sin unión a CD14 de alto peso molecular

Para preparar anticuerpo policlonal que se une específicamente a sCD14-ST que se encuentra en pacientes que presentan septicemia pero no a CD14 de alto peso molecular, se inmuniza un conejo con rCD14-ST (PSP64) preparado en el ejemplo 13-(3)-3. Es decir, se diluyen 20 μ g de rsCD14-ST (PSP64) con 500 μ l de solución salina fisiológica y entonces se mezcla con 500 μ l de adyuvante completo de Freund (DIFCO) en cantidades equivalentes, seguido por la administración subcutánea de la mezcla en el dorso de conejo hembra blanco de Nueva Zelanda (Kitayama Labes) que pesa de 2,0 a 2,4 kg. Tras 2 semanas, se diluyen 20 μ g de rsCD14-ST (PSP64) con 500 μ l de solución salina fisiológica y se mezcla la disolución con 500 μ l de adyuvante incompleto de Freund (DIFCO) en cantidades equivalentes, seguido por la administración subcutánea de la mezcla en el dorso.

Tras dos semanas adicionales, se administran 20 μ g de rsCD14-ST (PSP64) de la misma manera. Tras una semana desde la administración, se recoge sangre de la vena de la oreja y se aísla entonces antisuero de la sangre mediante el método convencional, seguido por la purificación del anticuerpo.

Al principio, se añade sulfato de amonio al antisuero de manera que la concentración saturada final de sulfato de amonio alcanzase el 33% y entonces se agita a 4°C durante una hora, seguido por la centrifugación de un sedimento precipitado.

Posteriormente, se disuelve el precipitado en un PBS de Dulbecco (denominado a continuación en el presente documento PBS (pH 7,4)) y entonces se dializa durante la noche. Se filtra el dializado y entonces se aplica a una columna con proteína A (Procep-A, Millipore). Se eluye la fracción de IgG acoplada a la misma con un tampón clorhidrato de glicina 0,1 M (pH 3,0), dando como resultado anticuerpo purificado. Tras diálisis con PBS (pH 7,4), se calcula la concentración de proteína a partir de la absorbancia a 280 nm (coeficiente de absorción: 0,714 mg/ml). El anticuerpo policlonal anti-PSP64 purificado resultante se purifica específicamente usando una resina acoplada con CD14 de alto peso molecular preparada en el ejemplo 22 o con rsCD14(1-356) preparado en el ejemplo 6 para obtener anticuerpo que puede unirse sólo a rsCD14-ST. Es decir, según el manual, se acoplan 5 mg de CD14 de alto peso molecular o rsCD14 (1-356) con columna de HP activada con NHS HiTrap (Amersham Biosciences) para preparar una columna de afinidad para purificación específica.

A continuación, se aplica el anticuerpo purificado mediante la columna con proteína A a la columna de afinidad para purificación específica, mientras que se recoge el anticuerpo que no puede unirse a CD14 de alto peso molecular o rsCD14 (1-356). Se condensa el anticuerpo resultante. Tras diálisis con PBS (pH 7,4), se calcula la concentración de proteína a partir de la absorbancia a 280 nm (coeficiente de absorción: 0,714 mg/ml).

17-(4) Preparación de anticuerpo monoclonal anti-rsCD14-ST específico contra rsCD14-ST, que no se une a CD14 de alto peso molecular

Para potenciar la antigenicidad, se añade dinitrofluorobenceno (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a rsCD14-ST (PSP64) preparado en el ejemplo 13-(3)-3 de modo que tenga una concentración final del 0,1% y entonces se incuba el conjunto a temperatura ambiente durante una hora, seguido por diálisis con PBS (pH 7,4), dando como resultado antígeno que va a administrarse (también denominado a continuación en el presente documento antígeno DNP-PSP64). Entonces, se disuelven 30 μ g del antígeno DNP-PSP64 en 100 μ l de solución salina fisiológica y entonces se mezcla la disolución con una cantidad igual de adyuvante completo de Freund (DIFCO), seguido por la administración de 100 μ l de antígeno a la planta de la almohadilla de cada pata trasera de un ratón ddY o una rata Wistar hembra de 8 semanas. Tras dos semanas, se extirpa el ganglio linfático ilíaco y entonces se lleva a cabo fusión celular. Se lleva a cabo la fusión celular según Tamie Ando y Takeshi Chiba: "Introduction to Monoclonal Antibody Experimental Manipulation", página 83, 1991 (Kodansha Ltd.). En otras palabras, se separan los linfocitos del ganglio linfático usando un separador celular (Falcon) y se mezclan con células de mieloma (Sp2/O-Ag14) a una razón de 5:1, seguido por fusión celular usando polietilenglicol. Se suspenden las células fusionadas en un medio HAT y se seleccionan hibridomas, seguido por cribado de hibridomas que producen el anticuerpo diana.

Se realiza el cribado mediante un método de ELISA en el que se inmoviliza rsCD14-ST (PSP64), CD14 de alto peso molecular o rsCD14(1-356) directamente sobre una placa. Es decir, se añaden 50 μ l de rsCD14-ST (PSP64), CD14 de alto peso molecular o rsCD14 (1-356) diluido con PBS (pH 7,4) hasta 2,5 μ g/ml a cada pocillo de una inmunoplaqueta (Maxisorb, NUNC) y se deja en reposo a 4°C durante la noche. Después de eso, se lava la placa con agua sometida a intercambio iónico cinco veces y entonces se añaden a cada pocillo 100 μ l de PBS (pH 7,4) que contiene StabilGuard al 2% (SurModics, Inc.), seguido por dejar la placa en reposo durante 1 hora a temperatura

ambiente para efectuar el bloqueo. Entonces, se añade a cada pocillo el sobrenadante de cultivo tomado como muestra de los hibridomas seleccionados y se permite que reaccione a 37°C durante 1 hora. Después de eso, se lava la placa tres veces con solución salina fisiológica que contiene Tween 20 al 0,05%. Posteriormente, se añaden a cada pocillo 50 µl de una disolución obtenida mediante dilución de anticuerpo anti-inmunoglobulina de rata marcado con peroxidasa (DAKO) o anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón marcado con peroxidasa (DAKO) 1.000 veces con PBS (pH 7,4) que contiene suero de conejo al 10%. Tras una reacción a 37°C durante 1 hora, se lava la placa cinco veces de la misma manera que anteriormente y se añade a cada pocillo una disolución de tetrametilbencidina (TMB, BioFix). Tras una reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente, se termina la reacción con una disolución de ácido sulfúrico 0,5 M y se determina una absorbancia a 450 nm usando un espectrofotómetro de placa (Multiscan JX, Thermo Electron Corporation). Como resultado, se selecciona un pocillo que contiene hibridoma que puede producir un anticuerpo que se une a rsCD14-ST pero no a CD14 de alto peso molecular o rsCD14 (1-356). A continuación, a partir del pocillo seleccionado, se realiza la clonación mediante un método de dilución limitante según Tamie Ando y Takeshi Chiba: "Introduction to Monoclonal Antibody Experimental Manipulation", página 97, 1991 (Kodansha Ltd.). Tras 10 días, se realiza el cribado asimismo usando como índice la reactividad con la proteína 2ST64 y se selecciona un hibridoma. Se cultiva el hibridoma seleccionado en FCS al 10%/medio RPMI-1640 (Sigma) y entonces se cultiva en medio de hibridoma-SFM (Invitrogen) para producir un anticuerpo. Se purifica el anticuerpo usando una columna con proteína G (Prosep-G columna, Millipore) o una columna con proteína A (Prosep-A, Millipore). Tras diálisis con PBS (pH 7,4), se calcula la concentración de proteína a partir de la absorbancia a 280 nm (coeficiente de absorción: 0,714 mg/ml). Se determina el subtipo del anticuerpo purificado usando un kit disponible comercialmente.

17-(5) Selección de anticuerpo monoclonal anti-rsCD14-ST específico contra sCD14-ST, que no depende del método de almacenamiento de la muestra

Se obtiene el anticuerpo monoclonal para el kit en el que el estado de conservación no afecta a los resultados de medición. Es decir, se determina sCD14-ST como anticuerpo en el lado del marcador en un sistema de tipo sándwich descrito en el ejemplo 22 entre los anticuerpos monoclonales frente a rsCD14-ST preparados en el ejemplo 17-(4). Tras seleccionarse el anticuerpo que tiene la propiedad de aumentar en un paciente que presenta septicemia, se determina sCD14-ST en la muestra. Se lleva a cabo la medición tanto en la muestra almacenada en un estado congelado como en la muestra almacenada a temperatura ambiente durante 24 horas y entonces se seleccionó una combinación de anticuerpos con una pequeña diferencia entre sus valores medidos.

(Ejemplo 18) Reactividad del anticuerpo policlonal anti-sCD14-ST(PSP64)

Se confirmó la reactividad del anticuerpo policlonal anti-PSP64 preparado en el ejemplo 17-(1). Igual que en el caso del ejemplo 17-(2), se inmovilizó rsCD14-ST (PSP64). Se diluyeron el antisuero que contiene anticuerpo policlonal anti-PSP64 preparado en el ejemplo 17-(1) y suero de conejo normal como control 500 veces con PBS (pH 7,4) y entonces se diluyeron en serie hasta 32.000 veces para preparar sus diluciones en serie, respectivamente. Se añadió cada diluyente a cada pocillo tras bloqueo y entonces se hizo reaccionar a 37°C durante una hora, seguido por lavado tres veces con solución salina fisiológica que contenía Tween 20 al 0,05%. Posteriormente, se añadieron a cada pocillo 50 µl de una disolución en la que se diluyó anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo marcado con peroxidasa (DAKO) 1.000 veces con PBS (pH 7,4) que contenía suero de cabra al 10%. Tras la reacción a 37°C durante una hora, se lavó el pocillo cinco veces de la misma manera que anteriormente y se añadió a cada pocillo una disolución de tetrametilbencidina (TMB, BioFix). Tras una reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente, se terminó la reacción con una disolución de ácido sulfúrico 0,5 M y se determinó una absorbancia a 450 nm usando un espectrofotómetro de placa (MultiScan JX, Thermo Electron Corporation) para confirmar la unión a rsCD14-ST (PSP64). Tal como se muestra en la figura 12, el conejo al que se le administró rsCD14-ST (PSP64) mostró un aumento en la absorbancia que dependía del factor de dilución, mientras que el suero de conejo normal no mostró tal aumento y entonces se confirmó la producción de anticuerpo específico contra la proteína rsCD14-ST (PSP64).

(Ejemplo 19) Preparación de sistema de ensayo de sCD-14-ST usando anticuerpo anti-rsCD14-ST

Se diluyó anticuerpo policlonal contra el péptido S68 hasta 10 µg/ml con D-PBS (pH 7,4) y entonces se añadieron 50 µl de la disolución resultante a cada pocillo de una inmunoplaaca (Maxisorb, NUNC). Tras una reacción a 4°C durante la noche, se lavó la placa cinco veces con agua sometida a intercambio iónico y se bloqueó mediante la adición de 100 µl de D-PBS que contenía StabliGuard al 0,1% (SurModics, Inc.) y Tween 20 al 0,1% a cada pocillo. A continuación, se usó PBS 76 mM (pH 7,4) que contenía suero que absorbe CD14 al 1% y BSA al 0,1% como diluyente para preparar una serie de dilución de 0, 0,031, 0,063, 0,125, 0,25, 0,5 y 1,2 ng/ml de preparación patrón de proteína rsCD14-ST (2ST64). Se añadió la serie de dilución de la preparación patrón en una cantidad de 50 µl por pocillo y se hizo reaccionar durante dos horas a 37°C. Tras la finalización de la reacción, se lavó la placa tres veces con solución salina fisiológica que contenía Tween 20 al 0,05%. Entonces, se añadieron a cada pocillo 50 µl de suero bovino fetal al 1%/disolución de hibridoma-SFM que contenía anticuerpo F1237-3-4.

Tras una reacción a 37°C durante una hora, se lavó la placa tres veces de la misma manera que anteriormente y se añadieron a cada pocillo 50 µl de un anticuerpo anti-inmunoglobulina de rata marcado con peroxidasa (DAKO) que se diluyó hasta la concentración de 1/1.000 con D-PBS (pH 7,4) que contenía suero de conejo al 10%. Tras una reacción a 37°C durante una hora, se lavó la placa cinco veces de la misma manera que anteriormente y se añadió a

cada pocillo una disolución de tetrametilbencidina (TMB, BioFix). Tras una reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente, se terminó la reacción mediante una disolución de ácido sulfúrico 0,5 M y se determinó una absorbancia a 450 nm usando un espectrofotómetro de placa (MultiScan JX, Thermo Electron Corporation). Se preparó una curva patrón mostrada en la figura 13.

5 (Ejemplo 20) Ensayo de suero con sistema de ensayo de sCD14-ST novedoso

Se usó el sistema de EIA de tipo sándwich preparado en el ejemplo 19 para determinar los sueros de cinco donantes normales y cinco pacientes que presentaban septicemia. Como resultado, tal como se muestra en la tabla 10, la concentración de sCD14-ST en el suero de donante normal era de 1 ng/ml mientras que la del paciente con septicemia era de 6,47 ng/ml, que era casi seis veces más alto que el primero. Por tanto, igual que en el caso del ejemplo 11, pudieron diagnosticarse los pacientes que presentaban septicemia. Además, las concentraciones eran diferentes de las del ejemplo 11 y la diferencia se debía a la diferencia en las preparaciones patrón tal como se describe en el ejemplo 16.

Tabla 10

N.º de muestra	Clasificación	Concentración (ng/ml)
N1	Normal	0
N2	Normal	1,7
N3	Normal	0,76
N4	Normal	3,16
N5	Normal	0
S1	Septicemia	8,44
S2	Septicemia	5,02
S3	Septicemia	9,02
S4	Septicemia	4,26
S5	Septicemia	5,6

(Ejemplo 21) Evaluación de anticuerpo monoclonal específico contra la proteína sCD14-ST

15 Para aclarar la especificidad del anticuerpo contra sCD14-ST, se determinó la afinidad del anticuerpo frente a cada una de diversas proteínas CD14. Además, se determinó la afinidad del anticuerpo frente a cada uno de diversos antígenos mediante un sistema de EIA con antígeno inmovilizado.

21-(1) Medición de la constante de disociación (KD) usando BIACORE

Se analizaron las constantes de velocidad de reacción del anticuerpo F1237-3-4 preparado en el ejemplo 17-(2) y el anticuerpo 3C10 (ATCC TIB-228) que es anticuerpo anti-CD14, usando Biacore 3000 (Biacore). En primer lugar, se inmovilizaron por separado rsCD14-ST (2ST64) y rsCD14 (1-356) sobre un chip sensor CM5 (Biacore) usando un kit de acoplamiento de amina (Biacore). Se realizó un ensayo de manera que se usó HBS-EP (Biacore) como tampón de corrida y se inyectó una serie de dilución (de 1,25 nM a 640 nM, que podía cambiarse dependiendo del anticuerpo) de cada anticuerpo en células de flujo. Se realizó el análisis de datos usando el software de evaluación BIA versión 4.1 (Biacore) restando los datos de la célula de referencia de los datos de medición de la célula de flujo de cada antígeno que estaba inmovilizado y también restando sólo los datos de medición del tampón de corrida. Como resultado de analizar una constante de disociación (KD) usando el análisis Bivalent, tal como se muestra en la figura 11, el anticuerpo F1237-3-4 mostró alta afinidad por rsCD14-ST, pero no pudo calcularse la KD del mismo debido a que no hubo unión sustancial a rsCD14 (1-356). 3C10 no pudo unirse sustancialmente a rsCD14-ST y mostró alta afinidad por rsCD14 (1-356).

Tabla 11

Nombre del anticuerpo	Constante de disociación KD (M)	
	rsCD14-ST	rsCD14(1-356)
Anticuerpo F1237-3-4	$5,75 \times 10^{-8}$	no disponible
Anticuerpo 3C10	no disponible	$6,69 \times 10^{-10}$

21-(2) Análisis de especificidad antigénica usando sistema de EIA con antígeno inmovilizado

Se analizan las reactividades del anticuerpo F1237-3-4 preparado en el ejemplo 17-(2) y el anticuerpo 3C10 (que es anticuerpo anti-CD14) contra CD14 de alto peso molecular usando el sistema de EIA con antígeno inmovilizado. Es decir, se diluye CD14 de alto peso molecular preparada por la misma vía que la del ejemplo 13-(2) hasta 2,5 µg/ml con D-PBS (pH 7,4). Entonces, se añaden 50 µl de la disolución resultante a cada pocillo de una inmunoplaaca (Maxisorb, NUNC) y posteriormente se deja en reposo a 4°C durante la noche. A continuación, se lava la placa cinco veces con agua sometida a intercambio iónico y se bloquea mediante la adición de 100 µl de PBS (pH 7,4) que contiene StabilGuard al 2% (SurModics, Inc.) a cada pocillo. Se diluyen cada uno el anticuerpo F1237-3-4 y el

anticuerpo 3C10 hasta 1 µg/ml con PBS (pH 7,4).

Entonces, se añade la disolución resultante a cada pocillo y se permite que reaccione a 37°C durante una hora, seguido por lavado tres veces con solución salina fisiológica que contiene Tween 20 al 0,05%. Posteriormente, se prepara una disolución mediante dilución de anticuerpo anti-inmunoglobulina marcado con peroxidasa (DAKO) para cada uno de los anticuerpos 1.000 veces con PBS (pH 7,4) que contiene suero al 10% y entonces se añaden a cada pocillo 50 µl de la disolución resultante. Tras una reacción a 37°C durante una hora, se lava la placa cinco veces de la misma manera que anteriormente y se añade a cada pocillo una disolución de tetrametilbencidina (TMB, BioFix). Tras una reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente, se termina la reacción mediante una disolución de ácido sulfúrico 0,5 M y se determina una absorbancia a 450 nm usando un espectrofotómetro de placa (Multi-Scan JX Thermo Electron Corporation). Como resultado, se confirmó que 3C10 se une fuertemente a CD14 de alto peso molecular, mientras que el anticuerpo F1237-3-4 no puede unirse, sustancialmente.

(Ejemplo 22) Preparación (2) de sistema de ensayo de sCD14-ST usando anticuerpo anti-rsCD14-ST

22-(1) Método de EIA de tipo sándwich

Se prepararon sistemas de EIA de tipo sándwich mediante diversas combinaciones de anticuerpos enumeradas en la tabla 12 según el método descrito en el ejemplo 3-(3). Tal como se muestra en la tabla 12, cualquiera de los sistemas de ensayo de sCD14 usando los anticuerpos monoclonales preparados en el ejemplo 17 aumentó específicamente en pacientes que presentaban septicemia pero no en donantes normales.

Tabla 12

Combinación de anticuerpos		Valores medidos	
Lado de inmovilización	Lado de marcaje	Pacientes con septicemia	Donantes normales
Anticuerpo policlonal contra el péptido S68	Anticuerpo F1237-3-4	+	-
Anticuerpo policlonal contra el péptido S68	Anticuerpo F1237-4-4	+	-

22-(2) Método de EIA competitivo

Se añade a cada pocillo el anticuerpo F1237-3-4 diluido hasta 10 µg/ml con PBS y entonces se deja en reposo a 4°C durante la noche para unirse de ese modo entre sí. Posteriormente, se bloquea con StabGuard al 2%/PBS (pH 7,4). Después de eso, se añaden 25 µl de cada uno de los sueros de paciente con septicemia y donante normal a la placa y posteriormente se añade antígeno rsCD14-ST marcado con peroxidasa diluido hasta 0,5 µg/ml con PBS (pH 7,4) que contiene BSA al 1% y Tween 20 al 0,1%. Tras la reacción a 37°C durante una hora, se lava cada uno de los pocillos a la placa tres veces con solución salina fisiológica que contenía Tween 20 al 0,05%. Se añade una disolución de TMB (BioFix) al pocillo para permitir el desarrollo de color, seguido por la terminación de tal reacción con una disolución acuosa 0,5 M de ácido sulfúrico. Además, se determina una absorbancia a 450 nm. Una disminución en la absorbancia depende de la concentración de sCD14-ST en sangre. Por tanto, el valor medido refleja la cantidad de sCD14-ST en sangre. Se confirmó que los donantes normales tienen menores concentraciones de sCD14-ST, mientras que las concentraciones de pacientes que presentan septicemia son específicamente altas. Además, los materiales de marcaje que van a usarse incluyen otras enzimas, compuestos radiactivos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes químicos, oro coloidal, colorante y partículas de látex.

(Ejemplo 23) Cribado de anticuerpos para someter a ensayo proteína soluble en sangre

Con el fin de preparar un sistema de ensayo de proteína soluble en sangre, purificada e identificada en el ejemplo 9, se construyeron dos métodos de cribado diferentes útiles para el ensayo.

23-(1) Preparación de anticuerpos para cribado

Pueden prepararse anticuerpos para cribado unidos a cualquier péptido que tiene de 6 a 20 residuos de aminoácido consecutivos seleccionados de las secuencias de aminoácidos descritas en SEQ ID NO: 3 según la descripción del ejemplo 1. Alternativamente, pueden prepararse los anticuerpos tal como sigue: (i) se sintetiza un péptido mediante el método convencional basándose en la secuencia completa de CD14 y entonces se prepara el antígeno de inmunización para formar el antígeno; (ii) se purifica antígeno CD14 soluble purificado en suero y entonces se usa como inmunógeno para formar el anticuerpo; (iii) se prepara proteína CD14 recombinante usando células COS o de *E. coli* y entonces se usa como inmunógeno para formar el anticuerpo; y (iv) se someten diversos antígenos CD14 preparados a desnaturalización térmica y tratamiento con DNP o similar y entonces se usan como inmunógenos para formar los anticuerpos.

Por ejemplo, se preparan el anticuerpo P001 (anticuerpo preparado usando un péptido que consiste en residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 4 como antígeno) y anticuerpo P002 (anticuerpo preparado usando un péptido que consiste en residuos de aminoácido descritos en SEQ ID NO: 5 como antígeno) mediante el método descrito en

el ejemplo 1 y entonces se unen a proteínas transportadoras, seguido por la administración para preparar anticuerpos, respectivamente. Además, también se prepararon el anticuerpo contra S68 preparado en el ejemplo 1-(4), el anticuerpo F1146-17-2 preparado en el ejemplo 2, el anticuerpo F1031-8-3 preparado en el ejemplo 3-(2)[2], el anticuerpo F1106-13-3 preparado en el ejemplo 3-(2)[1], el anticuerpo F1237-3-4 preparado en el ejemplo 17-(2) y el anticuerpo anti-PSP64 preparado en el ejemplo 17-(1) como muestras para cribado, respectivamente. Tal como se describió anteriormente, se usaron anticuerpos unidos a péptidos que consisten cada uno en de 6 a 20 residuos de aminoácido consecutivos seleccionados de las secuencias de aminoácidos descritas en SEQ ID NO: 3 para cribar un anticuerpo que pueda detectar específicamente proteína soluble en sangre según los procedimientos descritos a continuación.

23-(2) Inmovilización de antígeno

Éste es un método de selección para un anticuerpo para su uso para someter a ensayo proteína soluble en sangre, que se caracteriza por el uso de la diferencia en reactividad del anticuerpo frente a la proteína CD14 de alto peso molecular derivada de un donante normal. En el método de selección, se analiza la reactividad frente a la proteína CD14 de alto peso molecular mediante inmovilización de antígeno, mediante lo cual se lleva a cabo cribado para determinar un anticuerpo que no pueda unirse a la CD14 de alto peso molecular en suero del donante normal pero que se una a la proteína soluble en sangre.

[1] Preparación de CD14 de alto peso molecular

Al principio, se preparó la proteína CD14 de alto peso molecular tal como sigue. Se aplicó suero humano (Nippon Biotest Laboratories inc.) a la columna con resina de unión al anticuerpo 3C10 (5 ml) y entonces se lavó con PBS, seguido por elución con una disolución acuosa de urea 6 M. Se dializó el eluato frente a PBS y entonces se liofilizó, seguido por fraccionamiento con cromatografía de filtración en gel (Superdex 75 10/300GL, Amersham Biosciences). Se analizó cada una de las fracciones resultantes usando el kit de ensayo de proteína CD14 soluble disponible comercialmente (kit IBL) y entonces se reunió la fracción de CD14 de alto peso molecular que puede reaccionar con el kit IBL y se liofilizó. Se disolvió el producto liofilizado y se sometió de nuevo a la medición con el kit IBL para calcular la concentración del mismo.

[2] Método de EIA con antígeno inmovilizado

Se llevó a cabo un método de EIA con antígeno inmovilizado tal como sigue. En primer lugar, se pusieron 2,5 µg/ml de CD14 de alto peso molecular en cada pocillo de la placa y se dejaron en reposo a 4°C durante la noche para su unión. Entonces, se bloqueó mediante StabGuard al 2%/PBS (pH 7,4) y se diluyó 1 µg/ml de cada anticuerpo con PBS y entonces se añadió a cada uno de los pocillos en los que se inmovilizaron los antígenos respectivos. Tras una reacción a 37°C durante una hora, se lavó el pocillo tres veces con solución salina fisiológica que contenía Tween 20 al 0,05%. Posteriormente, se diluyó anticuerpo anti-γ-globulina marcado con peroxidasa (DAKKO) para cada anticuerpo con PBS (pH 7,4) que contenía suero de conejo al 10% y Tween 20 al 0,05% y se permitió que reaccionase a temperatura ambiente durante una hora. Asimismo, se lavó el pocillo cinco veces y entonces se añadió una disolución de TMB (BioFix) al pocillo para el desarrollo de color, seguido por la terminación de la reacción con una disolución acuosa de ácido sulfúrico 0,5 M. Posteriormente, se midió la absorbancia del anticuerpo a 450 nm. Para la CD14 de alto peso molecular, se seleccionó un anticuerpo que no provocaba aumento en la absorbancia. Se seleccionó el anticuerpo F1237-3-4 según el método anterior.

En lugar de que el anticuerpo se una a la placa, sCD14-ST puede unirse a la placa para permitir la selección de un anticuerpo que no se une a sCD14-ST.

A continuación, se lleva a cabo el ensayo dot-blot tal como sigue. En primer lugar, se aplica en puntos CD14 de alto peso molecular sobre el medio de transferencia Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories, Inc.) a 400 ng/punto y entonces se seca. Posteriormente, se bloquea usando Block-Ace al 100% (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.). Se permite que reaccionen dos tipos de CD14 de inmovilización, y cada uno de diversos anticuerpos anti-CD14 diluidos con PBS (pH 7,4) que contiene Block-Ace al 10%, Tween 20 al 0,05% a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, se lava el medio cinco veces durante cinco minutos con PBS (pH 7,4) que contiene Tween 20 al 0,05%. Posteriormente, se diluye anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo marcado con peroxidasa (DAKKO, P448) con PBS (pH 7,4) que contiene Block-Ace al 10% y Tween 20 al 0,05%, seguido por la reacción con cada membrana a temperatura ambiente durante una hora. Asimismo, se lava cinco veces y se determina la presencia o ausencia de la unión de anticuerpo como luminiscencia en un detector de luminiscencia (CoolSaver AE-6955, ATTO Corporation) por medio de ECL-PLUS (Amersham Biosciences). Para la CD14 de alto peso molecular usada para el cribado, se selecciona el anticuerpo del que no pudo detectarse ningún punto.

23-(3) Inmunoensayo de tipo sándwich

Éste es un método de selección para un anticuerpo para su uso para someter a ensayo proteína soluble en sangre, que se caracteriza por el uso de diferencia entre las cantidades detectadas de los sueros de donantes normales y pacientes que presentan septicemia. Se prepara un sistema de ELISA de tipo sándwich combinando dos anticuerpos anti-CD14 diferentes y entonces se usan para someter a ensayo donantes normales y pacientes que presentan

septicemia.

[1] Preparación de anticuerpo marcado con peroxidasa

Se preparó un anticuerpo marcado con peroxidasa según la descripción del ejemplo 3-(3) usando el anticuerpo preparado en 12-(1).

5 [2] Preparación de sistema de EIA de tipo sándwich

Se diluyó cada anticuerpo para cribado hasta 10 µg/ml con D-PBS (pH 7,4) y entonces se añadieron 50 µl de la disolución resultante a cada pocillo de una inmunoplaaca (Maxisorb, NUNC). Tras una reacción a 4°C durante la noche, se lavó el pocillo con agua sometida a intercambio iónico cinco veces y se añadieron 100 µl de D-PBS que contenía StabilGuard al 2% (SurModics, Inc) a cada pocillo para efectuar el bloqueo. Usando como diluyente PBS (pH 7,4) que contenía BSA al 0,1%, se prepararon una serie de dilución de preparación patrón de proteína S286C de 0, 3, 12, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 y 200 ng/ml y una muestra diluida 10 veces. Entonces, se añadieron a cada pocillo 50 µl de cada una de la serie de dilución y la muestra diluida y entonces se hicieron reaccionar a 37°C durante una hora. Tras la terminación de la reacción, se lavó el pocillo tres veces con solución salina fisiológica que contenía Tween 20 al 0,05%. Posteriormente, se diluyó anticuerpo marcado con peroxidasa hasta 1 µg/ml con PBS que contenía suero de rata al 2%, suero de ratón al 1% y Tween 20 al 0,1% y entonces se añadieron a cada pocillo 50 µl de la disolución resultante. Tras una reacción a 37°C durante una hora, se lavó el pocillo cinco veces de la misma manera que anteriormente y se añadió a cada pocillo una disolución de tetrametilbencidina (TMB, BioFix). Tras una reacción durante 20 minutos a temperatura ambiente, se terminó la reacción mediante una disolución de ácido sulfúrico 0,5 M y se midió una absorbancia a 450 nm usando un espectrofotómetro de placa (NJ-2100, Japan Intermed).

[3] Cribado de anticuerpo usando el sistema de EIA de tipo sándwich

Con respecto a una combinación que permite que el sistema forme una curva patrón, se llevó a cabo cribado para determinar si podía detectarse específicamente la proteína soluble en sangre. Se sometieron los sueros obtenidos de dos pacientes con septicemia y dos donantes normales a la medición en el sistema de ensayo preparado en [1]. Se llevó a cabo cribado para una combinación de anticuerpos que puede detectar específicamente pacientes con septicemia mediante la selección de una combinación de anticuerpos en el sistema de ensayo que muestran mayores niveles en los pacientes con septicemia pero menores niveles en los donantes normales. Como resultado, se seleccionaron las combinaciones de anticuerpos descritas en los ejemplos 7-(1) a (8) y el ejemplo 22. Además, puede obtenerse un valor de medición de CD14 de alto peso molecular en cada suero mediante el kit IBL de antemano y entonces puede seleccionarse una combinación de anticuerpos del sistema de ensayo que no determina la CD14 de alto peso molecular.

(Ejemplo 24) Método de cribado de anticuerpos usando rsCD24-ST

Se investigaron dos métodos diferentes para el cribado de anticuerpos usando rsCD14-ST.

24-(1) Método de EIA con antígeno inmovilizado

35 Como método de cribado para un anticuerpo que puede detectar específicamente sCD14-ST, se llevó a cabo el método de cribado de anticuerpos descrito en el ejemplo 17-(2) (es decir, un método que utiliza ELISA en el que se inmoviliza rsCD14-ST (PSP64) directamente sobre una placa).

40 Se muestran los resultados de cribado de diversos anticuerpos en la tabla 13. En este caso, MY4 (Colter), MEM18 (Monosan), 61D3 (Southern Biotechnology Associates, Inc.), y diversas clases de γ-globulina usados en el presente documento estaban disponibles comercialmente.

Tabla 13

Anticuerpo	Unión a rsCD14-ST(PSP64)
F1237-3-4	++
S68	++
F1106-13-3	++
F1031-8-3	++
P001	+
P002	++
MY4	-
3C10	-
MEM18	-
61D3	-
γ-Globulina de ratón	-

γ -Globulina de rata	-
γ -Globulina de conejo	-

24-(2) Método de EIA de tipo sándwich

- Se preparó el sistema de EIA de tipo sándwich descrito en el ejemplo 23-(2) para el método de cribado para un anticuerpo que puede detectar específicamente sCD14-ST. Es decir, se inmovilizaron sobre una placa diversos anticuerpos que van a proporcionarse como muestras diana de cribado y entonces se llevó a cabo el cribado mediante el método de ELISA de tipo sándwich usando el anticuerpo F1106-13-3 marcado con peroxidasa o el anticuerpo F1031-8-3 marcado con peroxidasa y usando rsCD14-ST (PSP64) para el antígeno.

Se muestran los resultados de cribado de diversos anticuerpos en la tabla 14. En este caso, el anticuerpo anti-HCG usado estaba disponible comercialmente.

Tabla 14

Anticuerpo	Unión a rsCD14-ST(PSP64)
F1237-3-4	++
S68	++
F1106-13-3	-
F1031-8-3	-
P001	+
P002	+
3C10	-
61D3	-
Anticuerpo anti-HCG	-
γ -Globulina de rata	-
γ -Globulina de conejo	-

10 (Ejemplo 25) Síntesis química de sCD14-ST

Se sintetizó químicamente un polipéptido soluble que tiene aminoácidos en las posiciones 1 a 70 en el extremo N-terminal de CD14 humana (denominado a continuación en el presente documento sCD14(1-70)).

- Se usó un sintetizador de péptidos ABI433A (Applied) y entonces se alinearon columnas de aminoácidos según las secuencias de aminoácidos para llevar a cabo síntesis automática. Se retiró el péptido sintetizado de una resina mediante el método convencional y entonces se recuperó mediante precipitación con éter. Se redisolvió el péptido resultante en agua destilada y entonces se liofilizó. Tras la disolución, se eluyó el péptido en bruto así obtenido a través de un gradiente lineal del 5-70% de acetonitrilo mediante el uso de HPLC de fase inversa C18 (CAPCELL-PAK, Shiseido Co., Ltd.). Por consiguiente, se recogió una fracción que contenía un péptido de interés. Se liofilizó la fracción recogida y se proporcionó como péptido purificado. Se disolvió el péptido purificado en el diluyente descrito en el ejemplo 7-(12) y entonces se sometió la disolución a la medición con el kit descrito en el ejemplo 7-(3). Como resultado, el péptido purificado reaccionó fuertemente con el kit descrito en el ejemplo 7-(3), de modo que también pudo proporcionarse sCD14-ST preparado químicamente como preparación patrón.

(Ejemplo 26) Medición con sCD14-ST expresado a partir de células THP-1 tratadas con elastasa

- Se suspendieron células THP-1 (1×10^6 células) estimuladas con vitamina D3 en medio RPMI1640 de cultivo que contenía BSA al 0,1% y entonces se añadió elastasa de leucocito humano (Elastin Products Company, Inc.) al medio de modo que tuviera una concentración final de 1 μ M. Por consiguiente, se preparó una mezcla de reacción que tenía un volumen final de 200 μ l.

- Posteriormente, se incubó la mezcla de reacción a 37°C durante 1, 3, 10, 30 ó 60 minutos. Entonces, se terminó la reacción enzimática mediante la adición de fluoruro de fenilmetilsulfonilo. Se recogió el sobrenadante de cada mezcla de reacción y entonces se detectó la concentración de sCD14-ST en el sobrenadante mediante el kit del ejemplo 7-(1).

Como resultado, la concentración de sCD14-ST aumentó tres minutos tras la adición de elastasa y entonces disminuyó gradualmente.

Aplicabilidad industrial

- Según la presente invención, se proporciona un antígeno novedoso que tiene la secuencia de CD14 en sangre humana. También se proporciona un método para diagnosticar o detectar septicemia que se logra sometiendo a ensayo el antígeno.

La presente invención proporciona además un fragmento soluble recombinante que tiene naturaleza inmunológica

similar al antígeno, y un método para producir el fragmento soluble recombinante.

Lista de secuencias

<110> Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Antígeno CD14 soluble novedoso

<130> EP6173FZ163pau

<140> Documento EP 05 739 312.6

<141> 11-05-2005

<150> Documento PCT/JP2005/008635

<151> 11-05-2005

<150> Documento JP 2004-141600

<151> 11-05-2004

<160> 27

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> humana

<400> 1

Thr Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu
1 5 10

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> humana

<400> 2

Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

<210> 3

<211> 356

<212> PRT

<213> humana

<400> 3

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

Leu Met Ala Ala Leu Cys Pro His Lys Phe Pro Ala Ile Gln Asn Leu
 195 200 205
 Ala Leu Arg Asn Thr Gly Ile Glu Thr Pro Thr Gly Val Cys Ala Ala
 210 215 220
 Leu Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro His Ser Leu Asp Leu Ser His Asn
 225 230 235 240
 Ser Leu Arg Ala Thr Val Asn Pro Ser Ala Pro Arg Cys Met Trp Ser
 245 250 255
 Ser Ala Leu Asn Ser Leu Asn Leu Ser Phe Ala Gly Leu Glu Gln Val
 260 265 270
 Pro Lys Gly Leu Pro Ala Lys Leu Arg Val Leu Asp Leu Ser Cys Asn
 275 280 285
 Arg Leu Asn Arg Ala Pro Gln Pro Asp Glu Leu Pro Glu Val Asp Asn
 290 295 300
 Leu Thr Leu Asp Gly Asn Pro Phe Leu Val Pro Gly Thr Ala Leu Pro
 305 310 315 320
 His Glu Gly Ser Met Asn Ser Gly Val Val Pro Ala Cys Ala Arg Ser
 325 330 335
 Thr Leu Ser Val Gly Val Ser Gly Thr Leu Val Leu Leu Gln Gly Ala
 340 345 350
 Arg Gly Phe Ala
 355

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> humana

<400> 4
 Thr Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu Asp Phe Arg Cys Val
 1 5 10 15
 Cys

<210> 5
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> humana

<400> 5
 Arg Cys Val Cys Asn Phe Ser Glu Pro Gln Pro Asp Trp Ser Glu Ala
 1 5 10 15
 Phe Gln Cys

<210> 6
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> humana

<400> 6
 Thr Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu Asp Phe Arg Cys Val
 1 5 10 15
 Cys Asn Phe Ser Glu Pro Gln Pro Asp Trp Ser Glu Ala Phe Gln Cys
 20 25 30
 Val Ser Ala Val Glu Val Glu Ile His Ala Gly Gly Leu Asn Leu Glu
 35 40 45
 Pro Phe Leu Lys Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala
 50 55 60
 Asp Thr Val Lys
 65

<210> 7
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN sintetizado (oligómero: 8linkS)

<400> 7
 agcttaggaa ttt

	<210> 8	
	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> ADN sintetizado (oligómero: 8linkA)	
	<400> 8	
10	ctagaaattc cta	13
	<210> 9	
	<211> 26	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN sintetizado (cebador sentido A)	
	<400> 9	
20	acatctagat gaccacgcca gaacct	26
	<210> 10	
	<211> 30	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN sintetizado (cebador antisentido A)	
30	<400> 10	
	tttggatcct tactagagat cgagcaatct	30
	<210> 11	
35	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> ADN sintetizado (cebador sentido 1)	
	<400> 11	
	tttcctacag ctctctggg	18
45	<210> 12	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> ADN sintetizado (cebador antisentido 1)	
	<400> 12	
	gggggtacctt agtcagcata ctgccgcggg tc	32
	<210> 12	
55	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> ADN sintetizado (cebador antisentido 2)	
	<400> 13	
	gggggtacctt agagagcctt gaccgtgtca gc	32
65	<210> 14	

<211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> ADN sintetizado (cebador antisentido 3)

<400> 14
 ggggtacctt agagccgccg cacgcggaga gc 32

10 <210> 15
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> ADN sintetizado (cebador antisentido 4)

20 <400> 15
 ggggtacctt atgcggctcc cactgtgagc cg 32

25 <210> 16
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN sintetizado (cebador antisentido 5)

30 <400> 16
 ggggtacctt actgagcagg aacctgtgcg gc 32

35 <210> 17
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN sintetizado (cebador antisentido 6)

40 <400> 17
 ggggtacctt aggcgcctac cagtagctga gc 32

45 <210> 18
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN sintetizado (cebador antisentido 7)

50 <400> 18
 ggggtacctt acgctagcac acgcagggcg cc 32

55 <210> 19
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> ADN sintetizado (cebador antisentido 8)

<400> 19
 ggggtacctt acttgaggcg ggagtacgct ag 32

<210> 20
 <211> 32
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN sintetizado (cebador antisentido 9)

 10 <400> 20
 ggggtacctt actcgagcgt cagttccttg ag 32

 <210> 21
 <211> 32
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN sintetizado (cebador antisentido 10)

 20 <400> 21
 ggggtacctt aggttatctt taggtcctcg ag 32

 <210> 22
 <211> 54
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> ADN sintetizado (cebador sentido 2)

 <400> 22
 gctctggaag ttctgttcca ggggcccgc acggtcaagg ctctccgcgt gcgg 54

 35 <210> 23
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> ADN sintetizado (cebador antisentido 11)

 <400> 23
 gtcgggcccc tggaacagaa cttccagagc atactgccgc gggtcggcgt ccgc 54

 45 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> ADN sintetizado (cebador antisentido 12)

 <400> 24
 55 **tctccattcc tgtgttgccg** 20

 <210> 25
 <211> 30
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN sintetizado (cebador sentido 3)

	<400> 25 ctggttccgc gtggttccga cacggtcaag	30
5	<210> 26 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> ADN sintetizado (cebador antisentido 13)	
	<400> 26 gaaccacgcg gaaccagagc atactgccgc	30
15	<210> 27 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> ADN sintetizado (cebador antisentido 14)	
25	<400> 27 cgggatcctc aatgatgatg atgatgatgg	30

REIVINDICACIONES

1. Antígeno CD14 soluble, que tiene los siguientes rasgos característicos 1) a 3):
 - 1) un peso molecular de 13 +/- 2 kDa cuando se mide mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras;
 - 2) una secuencia de aminoácidos en la que está presente la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 en su extremo N-terminal; y
 - 3) capacidad para unirse específicamente a un anticuerpo, que se une a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, preparándose el anticuerpo usando dicho péptido como antígeno.
2. Fragmento de CD14 soluble recombinante, que consiste en una secuencia de aminoácidos desde una cualquiera de las posiciones 1 a 17 hasta una cualquiera de las posiciones 59 a 90 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, teniendo dicho fragmento de CD14 soluble recombinante los siguientes rasgos característicos 1) a 3):
 - 1) un peso molecular de 13 +/- 2 kDa cuando se mide mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras;
 - 2) sin capacidad para unirse específicamente al anticuerpo 3C10 y el anticuerpo MEM-18; y
 - 3) capacidad para unirse específicamente a un anticuerpo, que se une a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, preparándose el anticuerpo usando dicho péptido como antígeno.
3. Método *in vitro* para diagnosticar o detectar septicemia, en el que se somete a ensayo el antígeno CD14 soluble según la reivindicación 1.
4. Método para diagnosticar o detectar septicemia según la reivindicación 3, que comprende las siguientes etapas de:
 - 1) someter a ensayo el antígeno CD14 soluble según la reivindicación 1 en la sangre recogida de un paciente;
 - 2) comparar el valor sometido a ensayo con el valor habitual para un donante normal; y
 - 3) evaluar si el sujeto tiene septicemia.
5. Método para producir el fragmento de CD14 soluble recombinante según la reivindicación 2, que comprende las etapas de:
 - (i) producir un fragmento de CD14 soluble recombinante que tiene una secuencia de aminoácidos en la que el extremo N-terminal es una cualquiera de las posiciones 1 a 17 de SEQ ID NO: 3 y el extremo C-terminal es una cualquiera de las posiciones 134 a 356 de SEQ ID NO: 3; en el que se ha incorporado la secuencia de un sitio de escisión para una proteasa en el sentido de 3' de una cualquiera de las posiciones 59 a 70 de SEQ ID NO: 3 mediante sustitución o inserción;
 - (ii) escindir el fragmento de CD14 soluble recombinante preparado en (i) con la proteasa predeterminada; y
 - (iii) recuperar el fragmento del lado N-terminal escindido en ii).

FIG. 1A

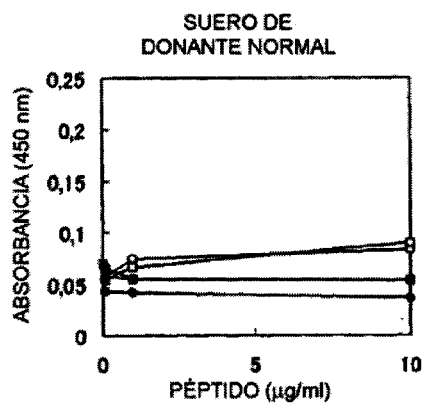


FIG. 1B

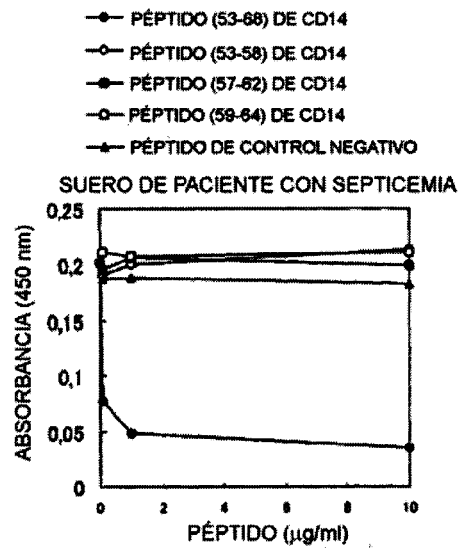


FIG. 2

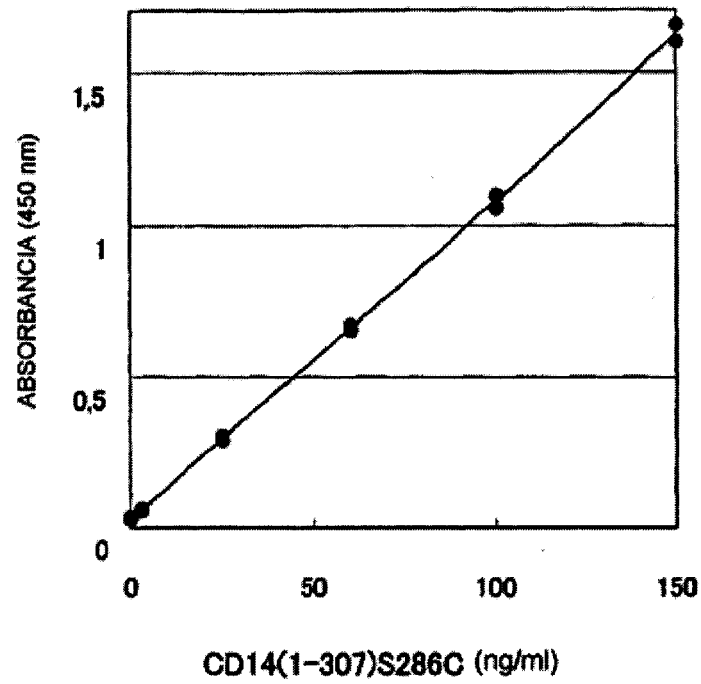


FIG. 3

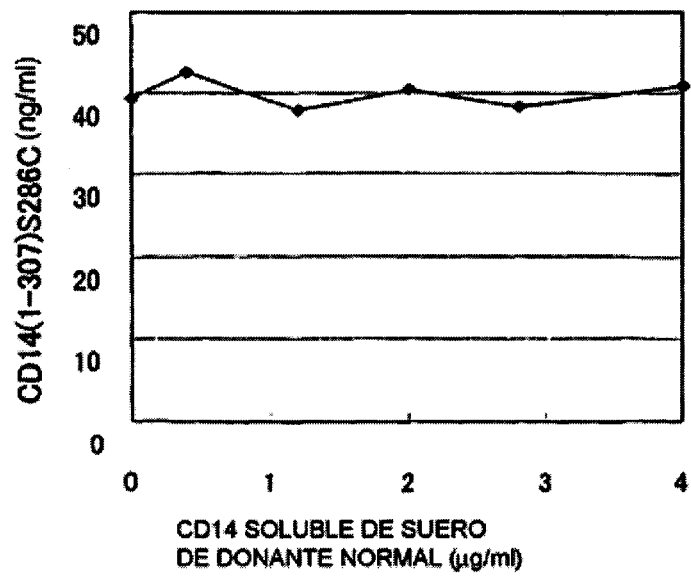


FIG. 4

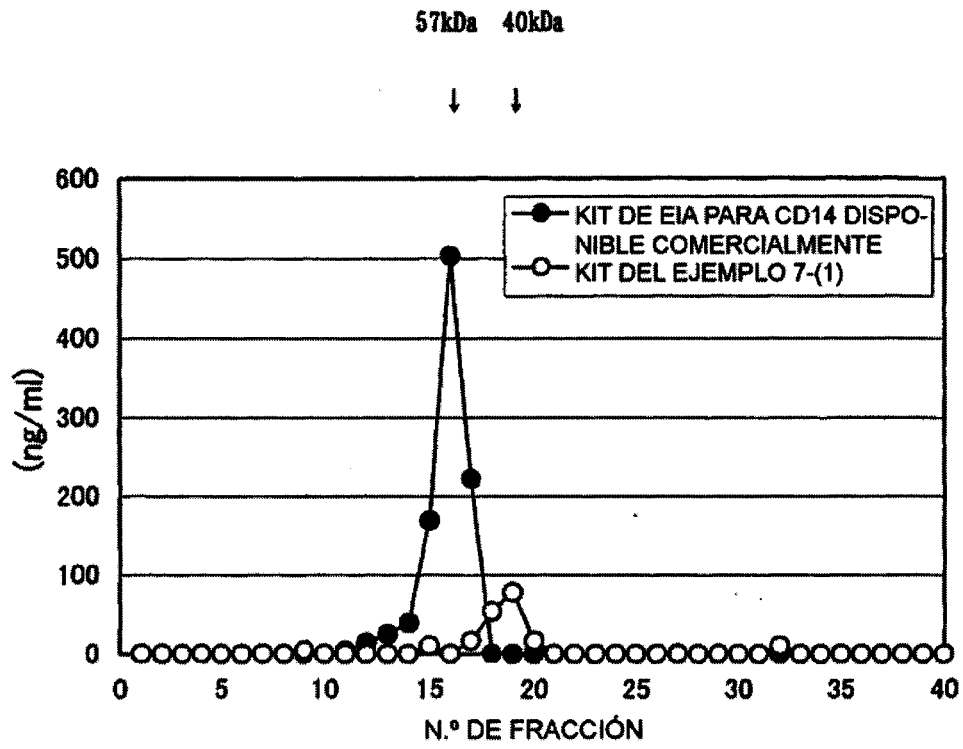


FIG. 5

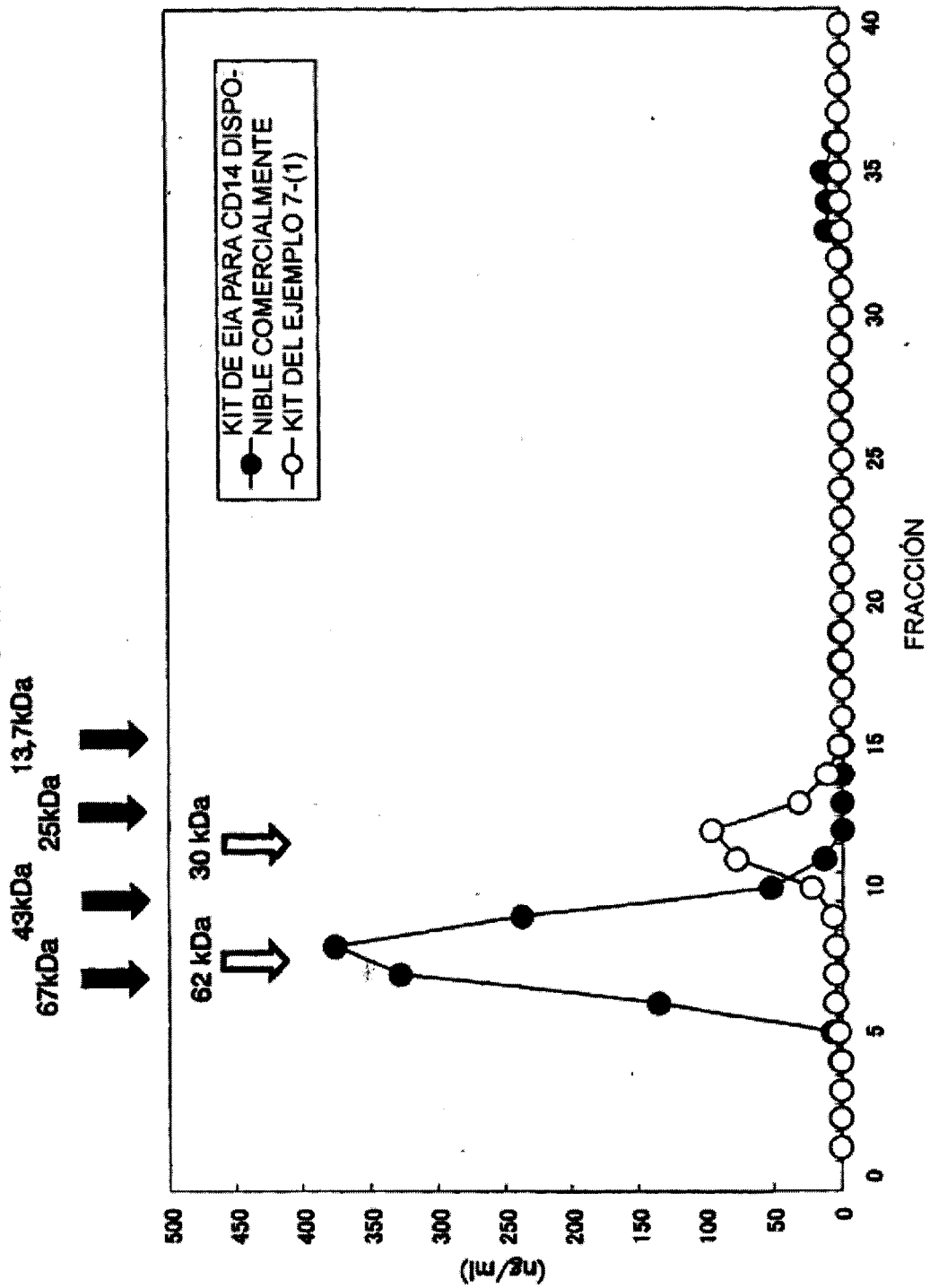


FIG. 6

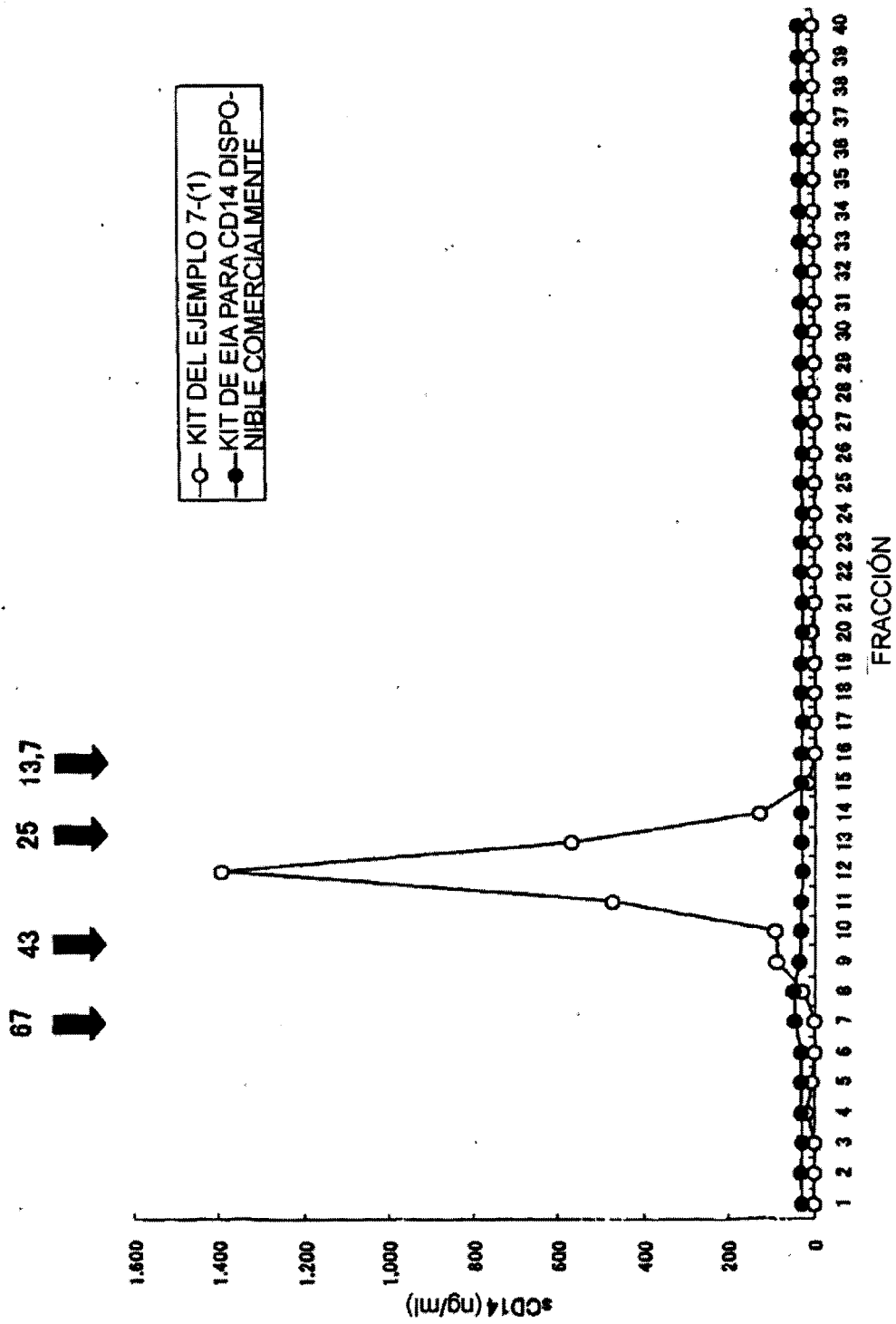


FIG. 7

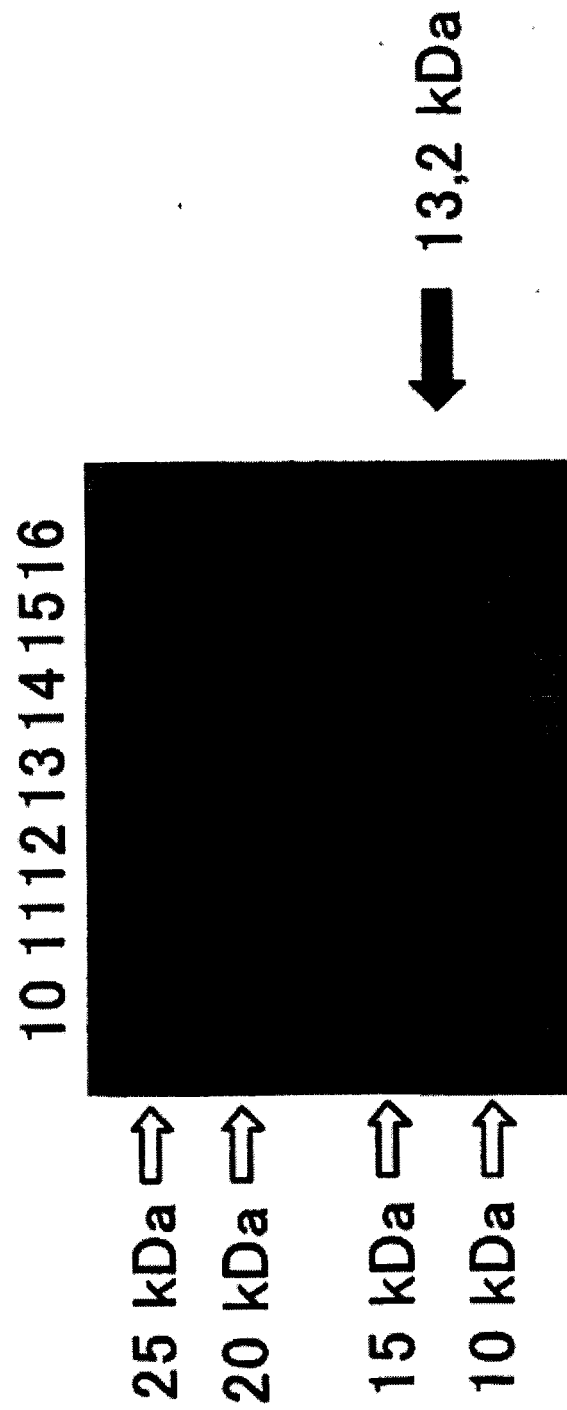


FIG. 8

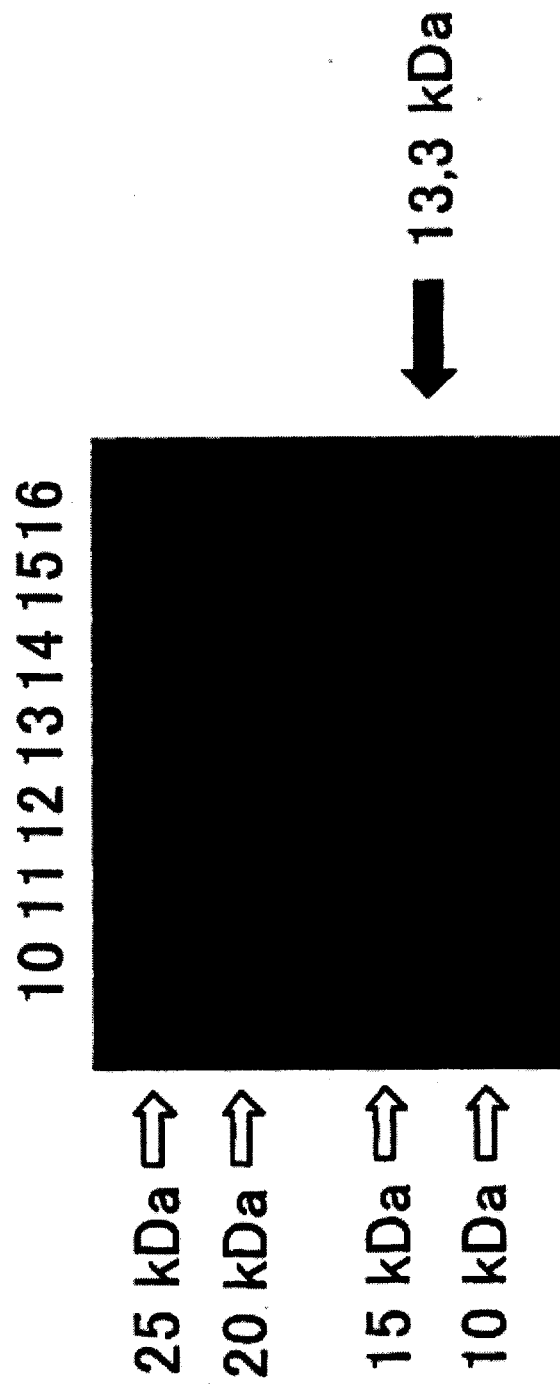


FIG. 9

1 2

1 : MUESTRA PURIFICADA DE PSP64

2 : MUESTRA PURIFICADA DE 2ST64

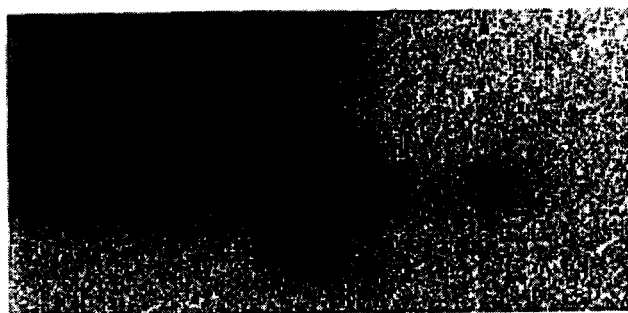


FIG. 10

sCD14-ST

2ST64

PSP64



←12,9 k D a

←12,6 k D a

FIG. 11

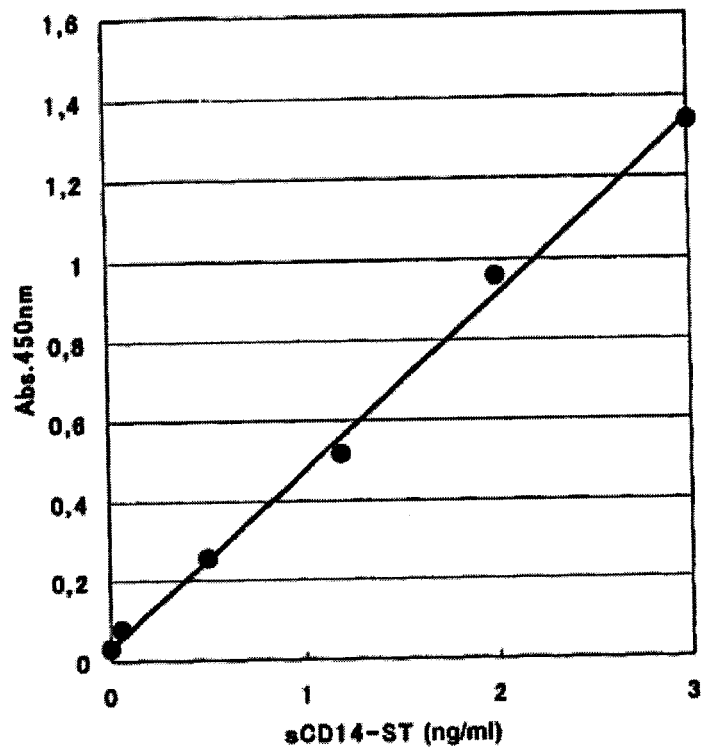


FIG. 12

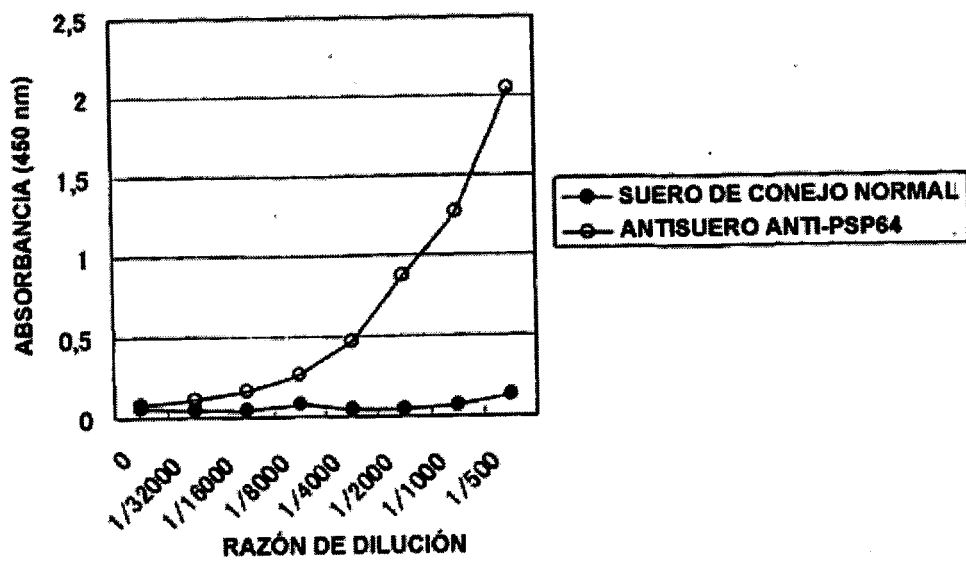


FIG. 13

