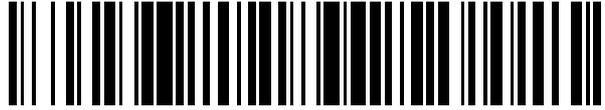


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 944**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**C12Q 1/02** (2006.01)  
**G01N 33/15** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2009 PCT/JP2009/059453**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2009 WO09142303**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2009 E 09750665 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2280279**

54 Título: **Método para la evaluación de la función de fagocitos**

30 Prioridad:

**23.05.2008 JP 2008135966**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.08.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**NAITO, KATSUKI**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

ES 2 628 944 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para la evaluación de la función de fagocitos

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un método novedoso para evaluar la función de un fagocito y a un método para detectar enfermedades asociadas con fagocitosis por el fagocito.

**Técnica anterior**

10 Un fagocito es un concepto genérico para células que tienen actividad fagocítica. Los fagocitos se dividen de manera amplia en fagocitos profesionales tales como neutrófilos, macrófagos o células dendríticas cuya función principal es la fagocitosis en el organismo vivo, y fagocitos ocasionales que ocasionalmente muestran actividad fagocítica en un determinado conjunto de condiciones. Los fagocitos ocasionales a modo de ejemplo incluyen microglíocitos del cerebro, células de Kupffer del hígado y células de Sertoli de los testículos.

15 Un leucocito es un componente celular de la sangre, y los leucocitos están constituidos principalmente por granulocitos (aproximadamente el 60%), linfocitos (aproximadamente el 25%) y monocitos (aproximadamente el 5%). Los granulocitos pueden dividirse adicionalmente en neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los neutrófilos superan en número a los otros tipos de leucocitos, y constituyen aproximadamente la mitad de los leucocitos. Los monocitos migran a través de diversos tejidos para convertirse en macrófagos. Dado que los leucocitos incluyen muchos fagocitos y pueden aislarse a partir de los mismos con facilidad, son una fuente preferible de fagocitos.

20 La fagocitosis es uno de los mecanismos de defensa más importantes que comienzan en el momento más temprano frente a la invasión por microorganismos tales como bacterias u hongos. La fagocitosis progresa a través de etapas secuenciales de reconocimiento de una sustancia foránea por parte de un fagocito, la captación de la sustancia foránea, formando un fagosoma, la digestión de la sustancia foránea en el fagosoma, y la absorción o excreción de la sustancia digerida. La fagocitosis se produce no sólo para sustancias foráneas tales como bacterias u hongos, sino también con sustancias autólogas que ya no se necesitan en el organismo tales como residuos del tejido autólogo en el sitio de inflamación y células autólogas residuales. Un fagocito no sólo digiere las sustancias envueltas en la célula, sino que en algunos casos libera radicales de oxígeno y proteasas al exterior de la célula durante la fagocitosis. Aunque esto puede permitir una desinfección local y digestión tisular eficaces, la fagocitosis en exceso puede dar como resultado la destrucción del tejido autólogo. Por ejemplo, en la lesión de artritis reumatoide (RA), se encuentran células que han envuelto en exceso el complejo autoinmunitario (célula de RA), y en tal lesión, el tejido se ve dañado por la proteasa liberada a partir de la célula de RA, y esto contribuye a la progresión de la artritis.

25

30

35 Los métodos conocidos para someter a ensayo la función fagocítica de un fagocito incluyen el método en el que se pone el fagocito en contacto con partículas de látex y las partículas de látex envueltas en la célula se cuentan por medio de citometría u observación por microscopio, el método en el que se deja que el fagocito envuelva una sustancia marcada por fluorescencia (*E. coli*, zimosano, y similares), y se detecta la cantidad de la sustancia envuelta por el fagocito, el método en el que se confirma el número de bacterias viables mediante cultivo tras la fagocitosis de las bacterias vivas, y el método en el que se detecta la luminiscencia a partir de radicales de oxígeno durante la fagocitosis.

40 La molécula CD14 es una glicoproteína que se ha identificado como marcador de diferenciación en la membrana de monocitos y se sabe que tiene la función de un receptor para LPS (lipopolisacáridos) (bibliografía no de patentes 1). Las especies moleculares conocidas de la molécula CD14 incluyen dos tipos, concretamente, CD14 unida a membrana (mCD14) que se expresa sobre la superficie celular y CD14 soluble (sCD14). Las especies moleculares de sCD14 conocidas incluyen la que tiene un peso molecular de aproximadamente 55 kDa y la que tiene un peso molecular de aproximadamente 49 kDa y se cree que éstas se producen mediante secreción a partir del hígado así como escisión mediante enzima de mCD14 asociada por la activación de un monocito (bibliografías no de patentes 2 a 4).

45

50 Se notifica que la sCD14 que tiene un peso molecular de aproximadamente 55 kDa y la que tiene un peso molecular de aproximadamente 49 kDa (denominada a continuación en el presente documento "sCD14 de alto peso molecular") están aumentadas en la sangre de pacientes que padecen septicemia, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), lupus eritematoso sistémico (LES) y muchas otras enfermedades. Por consiguiente, no se considera que estas sCD14 sean marcadores específicos de enfermedad (bibliografías no de patentes 5 a 6). Mientras tanto, se ha notificado sCD14-ST (subtipo de antígeno CD14 soluble) como una nueva especie molecular de sCD14 que muestra un aumento característico en la concentración en sangre en pacientes con septicemia.

55 sCD14-ST es una sCD14 que tiene un peso molecular de  $13 \pm 2$  kDa cuando se somete a electroforesis en condiciones no reductoras en SDS-PAGE, y que conserva la región N-terminal de la CD14. En comparación con la sCD14 de alto peso molecular, sCD14-ST carece de la extensa región en el lado C-terminal de la secuencia de aminoácidos, y no tiene la capacidad de unión a LPS que tiene la sCD14 de alto peso molecular. sCD14-ST

tampoco muestra una inmunogenicidad diferente de la sCD14 de alto peso molecular, y puede diferenciarse de la sCD14 de alto peso molecular usando anticuerpos. La concentración en sangre de la sCD14-ST es específicamente alta en pacientes con septicemia (bibliografía de patentes 1). También se ha notificado que la concentración en sangre de la sCD14-ST es alta en los pacientes con septicemia en comparación con pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), que es una enfermedad cuya distinción de la septicemia ha resultado difícil. Por consiguiente, se ha considerado que sCD14-ST es un marcador de diagnóstico específico de septicemia (bibliografía no de patentes 7).

#### Lista de referencias

##### Bibliografía de patentes

10 [Bibliografía de patentes 1] Documento WO 2005/108429

##### Bibliografía no de patentes

[Bibliografía no de patentes 1] Wright *et al.*, Science, 249: 1431-1433, 1990.

[Bibliografía no de patentes 2] Bazil y Strominger, Journal of Immunology, 147: 1567-1574, 1991.

[Bibliografía no de patentes 3] Bufler *et al.*, European Journal of Immunology, 25: 604-610, 1995.

15 [Bibliografía no de patentes 4] Su *et al.*, Journal of Hepatology, 31: 435-442, 1999.

[Bibliografía no de patentes 5] Hayashi *et al.*, Infection and Immunity, 67: 417-420, 1999.

[Bibliografía no de patentes 6] Lawn *et al.*, Clinical & Experimental Immunology, 120: 483-487, 2000.

[Bibliografía no de patentes 7] Yaegashi *et al.*, Journal of Infection and Chemotherapy 11: 234-238, 2005.

#### Sumario de invención

##### 20 Problemas técnicos

Los métodos convencionales usados para someter a ensayo una función de fagocitosis de un fagocito requerían operaciones que precisaban mucho tiempo y eran problemáticas tales como marcaje preliminar de la sustancia que va a involucrarse, cultivo para la confirmación de las bacterias vivas que quedan tras la fagocitosis y observación con microscopio, así como aparatos especializados tales como citómetro y microscopio, y por consiguiente, se esperaba el desarrollo de un nuevo método de ensayo más conveniente. Aunque podría desarrollarse un método de ensayo cuantitativo conveniente si pudiera medirse el factor humoral liberado del fagocito durante la fagocitosis, la citocina no es adecuada para su uso como marcador específico de fagocitosis ya que se produce mediante diversos tipos de estímulos inmunoestimulantes distintos del estímulo de la fagocitosis. Los radicales de oxígeno tampoco podían usarse como marcador específico de fagocitosis ya que se produce por diversos estímulos, y los radicales de oxígeno también tienen el inconveniente de que desaparecen en poco tiempo dando como resultado la limitación de que se necesita llevar a cabo el ensayo inmediatamente tras la fagocitosis.

En el caso de enfermedades (tales como artritis reumatoide) relacionadas con la fagocitosis local, el diagnóstico de la enfermedad se vería enormemente facilitado si pudiera desarrollarse un ensayo que permitiera someter a ensayo una molécula de marcador en el analito tal como líquido corporal para determinar el grado de la fagocitosis, y en tal caso, podría diseñarse un ensayo conveniente si pudiera usarse un factor humoral en el analito para el ensayo. Sin embargo, en la técnica no se ha conocido ningún factor humoral específico de fagocitosis que sea lo suficientemente estable para un ensayo.

##### Solución a los problemas

sCD14-ST es un marcador de enfermedad que se ha sabido que aumenta en el plasma de pacientes con septicemia. Sin embargo, el mecanismo de su producción no quedaba claro. En tal situación, los inventores de la presente invención encontraron que, aunque sCD14-ST en la sangre no aumenta en el animal de modelo de septicemia de conejo inducida por endotoxina, aumenta en el animal de modelo de septicemia de conejo (modelo CLP (punción y ligadura cecal)) que se ha infectado con bacterias vivas. Basándose en estos hallazgos experimentales, los inventores entendieron que la activación de los leucocitos mediante endotoxina no es suficiente para la producción de sCD14-ST, y la fagocitosis de las bacterias mediante los leucocitos es importante. Entonces los inventores realizaron un estudio intensivo sobre la relación entre diversos estimulantes de leucocitos y la cantidad de la sCD14-ST producida *in vitro*, y encontraron que sCD14-ST se produce únicamente tras añadir una sustancia que puede inducir la fagocitosis de leucocitos, y la producción de sCD14-ST disminuye mediante la adición una sustancia que inhibe la fagocitosis. Los inventores también encontraron que, en el caso del animal de modelo de artritis de conejo, sCD14-ST en líquido sinovial aumenta con la aparición de la artritis.

Tal como se indica mediante estos hallazgos, sCD14-ST es un factor humoral específico de fagocitosis que es lo

suficientemente estable como para su uso en un ensayo.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método novedoso para evaluar la función de un fagocito tal como se define en la reivindicación 1. La divulgación comprende:

(1-1) Un método para evaluar la función de un fagocito sometiendo a ensayo sCD14-ST producida por el fagocito.

5 (1-2) El método según el punto anterior (1-1) en el que la función del fagocito es fagocitosis.

(1-3) El método según los puntos anteriores (1-1) o (1-2) en el que el método comprende una etapa de poner en contacto una sustancia que va a envolverse con el fagocito.

(1-4) Un método para evaluar la función de un fagocito que comprende las etapas de

1) poner un fagocito en contacto con una sustancia que va a envolverse por el fagocito,

10 2) medir sCD14-ST producida por el fagocito, y

3) comparar el valor medido con un valor de patrón para determinar la presencia y/o el grado de la fagocitosis por el fagocito.

(1-5) El método según uno cualquiera de los puntos anteriores (1-1) a (1-4) en el que el fagocito es un neutrófilo, un granulocito y/o un leucocito.

15 (1-6) El método según uno cualquiera de los puntos anteriores (1-1) a (1-4) en el que el fagocito es un granulocito, y la función fagocítica es fagocitosis.

La presente invención también proporciona el uso de un marcador que contiene sCD14-ST para evaluar la función de un fagocito.

20 La presente invención también proporciona diversos métodos de detección y evaluación tal como se definen en las reivindicaciones 2 a 4, que se posibilitan mediante la evaluación de la función de un fagocito del sujeto. La divulgación comprende:

(2-1) Un método para detectar una enfermedad asociada con un disfunción fagocítica mediante la evaluación de la función de un fagocito, que comprende las etapas de

25 1) evaluar la función de un fagocito extraído de un sujeto mediante el método según uno cualquiera de los puntos anteriores (1-1) a (1-6),

2) comparar el resultado de la evaluación con un valor normal, y

3) determinar la presencia y/o intensidad de la enfermedad basándose en si la función del fagocito del sujeto es superior o inferior al valor normal.

30 (2-2) Un método para evaluar la función inmunitaria mediante la evaluación de la función de un fagocito, que comprende las etapas de

1) evaluar la función de un fagocito extraído de un sujeto mediante el método según uno cualquiera de los puntos anteriores (1-1) a (1-6),

2) comparar el resultado de la evaluación con un valor normal, y

35 3) determinar el grado de la función inmunitaria basándose en si la función del fagocito del sujeto es superior o inferior al valor normal.

(2-3) Un método para evaluar los efectos de un fármaco mediante la evaluación de la función de un fagocito, que comprende las etapas de

1) evaluar la función de un fagocito extraído de un sujeto durante y/o tras la administración de fármaco mediante el método según uno cualquiera de los puntos anteriores (1-1) a (1-6),

40 2) comparar el resultado de la evaluación con un valor normal y/o el resultado de la evaluación antes de la administración de fármaco, y

3) determinar la presencia y/o el grado del cambio en la función del fagocito del sujeto mediante la administración de fármaco.

(2-4) Un método para evaluar la calidad de un fagocito para trasplante, que comprende las etapas de

45 1) evaluar la función de un fagocito para trasplante mediante el método según uno cualquiera de los puntos

anteriores (1-1) a (1-6),

2) comparar el resultado de la evaluación con un valor de patrón, y

3) determinar si la función del fagocito para trasplante satisface el valor de patrón.

5 (2-5) El método según uno cualquiera de los puntos anteriores (2-1) a (2-4) en el que el fagocito es un neutrófilo, un granulocito y/o un leucocito.

(2-6) El método según uno cualquiera de los puntos anteriores (2-1) a (2-5) en el que la función del fagocito es la fagocitosis.

(2-7) El método según uno cualquiera de los puntos anteriores (2-1) a (2-4) en el que el fagocito es un granulocito y la función del fagocito es fagocitosis.

10 La presente invención también proporciona un método para seleccionar una sustancia que regula una función de fagocitosis tal como se define en la reivindicación 5. La divulgación comprende:

(3-1) Un método para seleccionar una sustancia que regula una función de fagocitosis que comprende las etapas de

1) poner un fagocito en contacto con un analito,

2) medir sCD14-ST producida por el fagocito, y

15 3) evaluar el efecto del analito sobre la función de fagocitosis del fagocito.

(3-2) El método según el punto anterior (3-1) en el que el fagocito y el analito se ponen en contacto en presencia de una sustancia que va a envolverse por el fagocito.

(3-3) El método según uno cualquiera de los puntos anteriores (3-1) a (3-2) en el que el fagocito es un neutrófilo, un granulocito y/o un leucocito.

20 La presente invención también proporciona un método para detectar una enfermedad asociada con fagocitosis mediante un fagocito tal como se define en la reivindicación 7. La divulgación comprende:

(4-1) Un método para detectar enfermedad asociada con fagocitosis mediante un fagocito que comprende las etapas de

1) medir la cantidad de sCD14-ST en una muestra (que no es sangre) del donante,

25 2) comparar el resultado de la evaluación con un valor normal, y

3) determinar si la cantidad de la sCD14-ST en la muestra es superior al valor normal.

(4-2) El método según el punto anterior (4-1) en el que sCD14-ST se mide tras añadir la sustancia que va a envolverse a la muestra.

30 (4-3) El método según los puntos anteriores (4-1) o (4-2) en el que la enfermedad asociada con fagocitosis por el fagocito es artritis reumatoide, y la muestra es líquido sinovial.

(4-4) El método según los puntos anteriores (4-1) o (4-2) en el que la enfermedad asociada con fagocitosis por el fagocito es mastitis y la muestra es leche.

(4-5) El método según uno cualquiera de los puntos anteriores (4-1) a (4-4) en el que el fagocito es un neutrófilo, un granulocito y/o un leucocito.

### 35 **Efectos ventajosos de la invención**

La presente invención permite el ensayo específico y conveniente de la función fagocítica mediante la medición de la sCD14-ST que es un factor humoral liberado del fagocito durante la fagocitosis. La presente invención también permite el examen para seleccionar la sustancia reguladora de la función fagocítica usando el sistema de ensayo. Además, la presente invención también permite la detección específica y conveniente de la enfermedad asociada con fagocitosis por el fagocito.

40

### **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra la reactividad dependiente de la dosis de sCD14-ST de conejo recombinante en el sistema de ensayo de sCD14-ST descrito en el ejemplo 3. El eje horizontal es la concentración (pg/ml) de la sCD14-ST recombinante, y el eje longitudinal es la absorbancia.

45 La figura 2 muestra medidas de la sCD14-ST en sangre antes y después de administrar LPS a un modelo de

septicemia de conejo inducida por LPS descrito en el ejemplo 4. El eje longitudinal es la concentración de sCD14-ST en sangre (pg/ml).

5 La figura 3 muestra medidas de la sCD14-ST en sangre antes y después de la cirugía en el modelo de septicemia de conejo preparado mediante infección por bacterias vivas descrito en el ejemplo 4. El eje longitudinal es la concentración de sCD14-ST en sangre (pg/ml).

La figura 4 muestra la producción de la sCD14-ST cuando se estimula el granulocito de conejo descrito en el ejemplo 5 con diversos estimulantes de leucocitos.

La figura 5 muestra la producción de la sCD14 de alto peso molecular cuando se estimula el granulocito de conejo descrito en el ejemplo 5 con diversos estimulantes de leucocitos.

10 La figura 6 muestra los efectos de inhibidores de fagocitosis sobre la producción de sCD14-ST cuando se estimula el granulocito de conejo descrito en el ejemplo 5 con la sustancia que va a envolverse.

La figura 7 muestra medidas de sCD14-ST para el líquido de lavado articular del modelo de artritis de conejo descrito en el ejemplo 6.

15 La figura 8 muestra la producción de la sCD14-ST cuando se estimula el granulocito humano descrito en el ejemplo 7 mediante diversos estimulantes de leucocitos.

La figura 9 muestra los efectos de inhibidores de fagocitosis sobre la producción de sCD14-ST cuando se estimula el granulocito humano descrito en el ejemplo 7 con la sustancia que va a envolverse.

### Descripción de realizaciones

#### 1. sCD14-ST (subtipo de antígeno CD14 soluble)

20 La presente invención se basa en el hallazgo de que sCD14-ST se produce en el proceso de envuelta y digestión del microorganismo foráneo o la sustancia foránea por el fagocito. Del sCD14, sCD14-ST tiene la característica de que se somete a electroforesis en SDS-PAGE para dar un peso molecular de  $13 \pm 2$  kDa en las condiciones no reductoras, y ha conservado la secuencia de aminoácidos de CD14 en el lado N-terminal. sCD14-ST también muestra inmunogenicidad que es diferente de la sCD14 de alto peso molecular. Por ejemplo, mientras que la sCD14 de alto peso molecular humana se reconoce por el anticuerpo 3C10 (ATCC TIB-228), la sCD14-ST humana no se une al anticuerpo 3C10.

Mientras tanto, algunos anticuerpos reconocen específicamente la sCD14-ST mientras que no logran reconocer la sCD14 de alto peso molecular. Tales anticuerpos son el anticuerpo peptídico cuyo epítipo es el péptido en el dominio particular de la sCD14-ST, y el dominio particular es la región entre  $\beta 3$  y  $\beta 4$  en la estructura secundaria de la CD14 (Kim *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 280: 11347-11351, 2005). Más específicamente, el dominio particular corresponde a la secuencia de los aminoácidos  $36^\circ$  a  $79^\circ$  en CD14 humana (SEQ ID NO: 1), la secuencia de los aminoácidos  $38^\circ$  a  $81^\circ$  en CD14 de conejo (SEQ ID NO: 2), la secuencia de los aminoácidos  $36^\circ$  a  $79^\circ$  en CD14 de ratón (SEQ ID NO: 3), y la secuencia de los aminoácidos  $36^\circ$  a  $77^\circ$  en CD14 bovina (SEQ ID NO: 4). El anticuerpo se produce usando un péptido que consiste en 8 o más aminoácidos consecutivos en la región para el antígeno. Los preferidos son el péptido que comprende 16 aminoácidos del 53 al 68 de CD14 humana y el péptido que consiste en 20 aminoácidos desde el 40 hasta el 59 de CD14 de conejo. Mientras la región de  $\beta 3$  a  $\beta 4$  (que incluye  $\beta 3\text{-}\alpha 2\text{-}\alpha 3\text{-}\beta 4$ ) de la sCD14 de alto peso molecular tiene una estructura en lámina  $\beta$  o una estructura en hélice  $\alpha$ , la región de  $\beta 3$  a  $\beta 4$  en la sCD14-ST no puede conservar su estructura terciaria inherente ya que su secuencia carece de una parte sustancial en su lado C-terminal en comparación con la sCD14 de alto peso molecular. Se cree que tal diferencia en la estructura terciaria da como resultado la diferencia de la capacidad de reconocimiento por el anticuerpo.

Por consiguiente, la sCD14-ST puede caracterizarse por la inmunogenicidad única además de su electroforesis para dar el peso molecular de  $13 \pm 2$  kDa en condiciones no reductoras en SDS-PAGE y su retención de la región N-terminal de la CD14. La "inmunogenicidad única" significa que se reconoce por el anticuerpo producido usando un antígeno que comprende 8 o más aminoácidos consecutivos en la región  $\beta 3$  a  $\beta 4$  de la CD14 para el antígeno. sCD14-ST también es un factor que muestra un aumento específico de la concentración en sangre en el caso de septicemia o en el animal de modelo de septicemia inducido por infección por bacterias vivas. Por ejemplo, la sCD14-ST humana se somete a electroforesis en SDS-PAGE para dar un peso molecular de  $13 \pm 2$  kDa en condiciones no reductoras, y tiene en su lado N-terminal la secuencia que comprende los residuos de aminoácido  $1^\circ$  a  $8^\circ$  de la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 1, y se une específicamente a un anticuerpo que se une al péptido que consiste en 16 residuos de aminoácido de  $53^\circ$  a  $68^\circ$  de la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 1. Además, puede tener adicionalmente al menos un rasgo característico seleccionado de su unión específica a un anticuerpo que se une al péptido que consiste en los residuos de aminoácido  $17^\circ$  a  $26^\circ$  de la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 1; no unirse al anticuerpo 3C10; no unirse al anticuerpo MEM-18; no tener capacidad de unión a LPS; poder obtenerse a partir de suero humano; y ser un factor que muestra un aumento de concentración en sangre específico en los pacientes con septicemia.

Dado que la sCD14-ST conserva la secuencia de aminoácidos en el extremo N-terminal de la CD14, cuando se aísla la sCD14-ST y se analiza su secuencia de aminoácidos N-terminal, incluye la misma secuencia de aminoácidos que el extremo N-terminal de la CD14. El requisito es que la secuencia de aminoácidos de al menos el 1° al 8° en el aminoácido N-terminal sea la misma que la CD14. Por ejemplo, en el caso del ser humano, puede confirmarse que la sCD14-ST tiene la secuencia del 1° al 8° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y en el caso del conejo, se confirmará que tiene la secuencia del 1° al 8° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; en el caso del ratón, se confirmará que tiene la secuencia del 1° al 8° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y en el caso bovino, se confirmará que tiene la secuencia del 1° al 8° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

## 2. Método para evaluar la función de un fagocito

El fagocito usado en la presente invención no está particularmente limitado siempre que tenga actividad fagocítica y sea de un mamífero. Sin embargo, el preferido es un neutrófilo. En vista de la facilidad de preparación, pueden usarse leucocitos o granulocitos como muestra que contiene el neutrófilo. También puede usarse una línea celular aislada que tiene la función de diferenciarse para dar un granulocito, y líneas celulares de este tipo a modo de ejemplo incluyen HL-60. Los mamíferos a modo de ejemplo incluyen ser humano, conejo, ratón, rata, mono, animal bovino, cerdo, oveja, cabra, caballo, perro y gato.

El fagocito puede prepararse a partir de líquidos corporales tales como sangre, líquido intersticial, linfa, líquido sinovial, leche, líquido cefalorraquídeo, pus, saliva, líquido lagrimal, mucosa, rinitis, esputo, orina, ascitis, líquido amniótico y líquido seminal. El fagocito también puede prepararse a partir de líquido de lavado de la cavidad nasal, bronquio, pulmón, piel, cavidad peritoneal, diversos órganos, articulación, hueso, y similares, o a partir de un tejido tal como piel, pulmón, riñón y mucosa.

Cuando el fagocito se prepara a partir de un organismo vivo, puede aislarse estrictamente sólo el fagocito o, alternativamente, puede prepararse una fracción que contiene fagocitos. Por ejemplo, pueden usarse leucocitos de la sangre, granulocitos de la sangre y granulocitos del líquido de lavado peritoneal para el fagocito usado en el método de la presente invención.

La función del fagocito es la función fisiológica que presenta el fagocito. En la presente invención, la función de un fagocito se evalúa usando la fagocitosis como índice de la actividad de fagocito. El fagocito también puede tener diversas funciones tales como la función de producir citocinas y la función de migración dependiendo del tipo del fagocito. Sin embargo, la función común a todos los fagocitos es la fagocitosis. Por consiguiente, se usa preferiblemente la fagocitosis como índice en la determinación de si el fagocito tiene función normal como fagocito. Además, dado que la mayor parte de los tipos de fagocitos tienen función inmunitaria como célula inmunitaria en el organismo vivo, la evaluación de la fagocitosis del fagocito puede significar la evaluación de la función inmunitaria del fagocito.

Por consiguiente, una realización preferida de la presente invención es un método para someter a ensayo la capacidad de fagocitosis de los neutrófilos, granulocitos y/o leucocitos. Otra realización preferida de la presente invención es un método para evaluar la función inmunitaria sometiendo a ensayo la capacidad de fagocitosis de los neutrófilos, granulocitos y/o leucocitos.

El método para evaluar la función de un fagocito de la presente invención se caracteriza por su medición de la sCD14-ST producida por el fagocito. sCD14-ST es útil como marcador para evaluar la función de un fagocito ya que se produce durante la fagocitosis por el fagocito. La fagocitosis por el fagocito comienza tras el contacto del fagocito con una sustancia que va a envolverse. La sustancia que va a envolverse es una sustancia que induce la fagocitosis del fagocito, y el término "fagocitosis" usado en el presente documento significa el proceso que incluye al menos la envuelta de la sustancia que va a envolverse por el fagocito y la digestión en la célula de la sustancia envuelta. Los ejemplos de la "sustancia que va a envolverse" que se envuelve y se digiere por el fagocito incluyen células tales como bacterias y hongos así como zimosano. Mientras tanto, una sustancia tal como microperlas o perlas de látex que no se digerirá tras envolverse no es la sustancia que va a envolverse de la presente invención.

La medición de la sCD14-ST se realiza usando una disolución que contiene un fagocito o su sobrenadante. El término "disolución" usado en el presente documento significa un medio de cultivo, una disolución de fraccionamiento celular, una disolución de ensayo celular, una solución salina fisiológica, un líquido corporal, y similares. Cuando el fagocito se prepara a partir de un organismo vivo, y el fagocito ya está en proceso de envolver la sustancia endógena que va a envolverse, la función del fagocito puede evaluarse sometiendo directamente a ensayo la disolución que contiene fagocito así preparada o su sobrenadante.

Cuando la sustancia que va a envolverse se pone en contacto con el fagocito, la sustancia que va a envolverse puede añadirse a la disolución que contiene el fagocito. Alternativamente, la disolución que contiene el fagocito puede añadirse a un recipiente que tiene la sustancia que va a envolverse inmovilizada en su superficie interior. La sustancia que va a envolverse es preferiblemente zimosano en vista de la facilidad de manipulación.

El sistema usado para la medición de la sCD14-ST no está particularmente limitado siempre que se detecte la sCD14-ST. Sin embargo, el preferido es el ensayo inmunológico usando un anticuerpo que se une específicamente

a la sCD14-ST. El sistema de ensayo inmunológico se selecciona preferiblemente de la adsorción directa, método de tipo sándwich, agregación, inmovilización en fase sólida y reacción en una disolución. El más preferido es el uso del método de tipo sándwich (inmunoensayo de tipo sándwich).

5 El inmunoensayo de tipo sándwich es un método en el que se usan al menos dos tipos de anticuerpos, que reconocen cada uno un sitio diferente de la proteína que va a someterse a ensayo, para formar un complejo de anticuerpo - antígeno - anticuerpo. El inmunoensayo de tipo sándwich puede llevarse a cabo mediante los métodos conocidos en la técnica, y el principio de ensayo, aplicaciones y mejoras se describen, por ejemplo, en Eiji Ishikawa "Ultrahigh sensitivity enzyme immunoassay method", Gakkai Shuppan Center (1993); Nao Matsushashi *et al.* ed. "New uses of immunoassay and use of immunoassay for the development of diagnostic and therapeutic drugs", Keiei-Kyouiku Shuppan (1985); y Eiji Ishikawa *et al.* ed. "Enzyme immunoassay" (3ª ed.), Igaku-Shoin (1987).

10 El anticuerpo que se une específicamente a la sCD14-ST es un anticuerpo que se une a un péptido que comprende la secuencia de 8 o más residuos de aminoácido consecutivos en la región entre  $\beta 3$  y  $\beta 4$  en la estructura secundaria de CD14. Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen el anticuerpo S68 descrito en el documento WO 2005/108429 y el anticuerpo F1301-9-1 descrito en el ejemplo 1 de la presente invención. Se requiere el uso de otro anticuerpo cuando se usa un inmunoensayo de tipo sándwich, y este anticuerpo no tiene que ser un anticuerpo que se une específicamente a la sCD14-ST, y tal anticuerpo también puede ser un anticuerpo que reconoce tanto la sCD14 de alto peso molecular como la sCD14-ST. Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen el anticuerpo F1106-13-3 y el anticuerpo F1031-8-3 descritos en el documento WO 2005/108429 y el anticuerpo F1258-7-2 descrito en el ejemplo 2 de la presente invención. Estos anticuerpos pueden ser o bien un anticuerpo policlonal o bien un anticuerpo monoclonal. En el caso del inmunoensayo de tipo sándwich, los anticuerpos usados son preferiblemente un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo también puede ser un fragmento de tal anticuerpo monoclonal. El término "fragmento de anticuerpo" usado en el presente documento significa uno cualquiera de Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub> de tal anticuerpo monoclonal.

15 En el sistema de ensayo inmunológico, la existencia de la sCD14-ST se confirma formando un complejo de la sCD14-ST con un anticuerpo, y detectando el complejo por medio del marcador unido al complejo. Los marcadores a modo de ejemplo incluyen una enzima tal como peroxidasa, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -D-galactosidasa, oxidasa o uricasa; una sustancia quimioluminiscente tal como acridinio o su derivado, o aequorina o su análogo; una sustancia fluorescente tal como FITC o un lantánido tal como europio (Eu) o samario (Sm); y un colorante, coloide de oro, látex con color o un isótopo. Cuando se usa una sustancia quimioluminiscente, una sustancia fluorescente o un marcador de colorante, o un isótopo, para el marcador, el ensayo puede completarse mediante detección óptica del marcador mediante un aparato de ensayo seleccionado de manera adecuada para el marcador. Cuando el ensayo se realiza mediante un kit basado en inmunocromatografía o método de flujo a través usando un colorante, coloide de oro o látex con color para el marcador, el ensayo puede completarse mediante inspección visual.

20 El sistema de ensayo inmunológico puede proporcionarse en forma de un kit. En tal caso, el kit debe incluir un anticuerpo que se une específicamente a la sCD14-ST como componente crítico, y también componentes requeridos para permitir la detección del complejo por medio del marcador tras la formación del complejo de la sCD14-ST y el anticuerpo. Por ejemplo, el kit puede incluir un transportador insoluble (placa de plástico, partículas de látex, etc.) que tiene el anticuerpo inmovilizado sobre el mismo, una enzima marcadora tal como peroxidasa, una sustancia marcadora tal como coloide de oro, un sustrato cromogénico tal como tetrametil-bencidina (TMB), una sustancia de unión específica para mejorar la sensibilidad de detección tal como biotina - estreptavidina, un agente de bloqueo, una disolución diluida, una disolución de lavado, una sustancia de referencia, y similares.

25 La sCD14-ST en la disolución que contiene un fagocito o su sobrenadante se mide de manera cualitativa y/o cuantitativa. El resultado de la medición se compara con el valor de patrón para determinar la presencia y/o cantidad de la sCD14-ST para así evaluar la presencia y/o el grado de la fagocitosis por el fagocito. El valor de patrón puede fijarse de manera adecuada dependiendo del objeto del ensayo. Por ejemplo, el resultado de la medición para la disolución que no contiene el fagocito, la disolución antes de ponerse en contacto con la sustancia que va a envolverse, o su sobrenadante, puede usarse como valor de patrón negativo. La fagocitosis por el fagocito se evalúa determinando si la medida de la muestra es superior al valor de patrón negativo. También puede representarse una curva de calibración a partir de las medidas de la sustancia de patrón de sCD14-ST para su uso como patrón. En este caso, la fagocitosis por el fagocito se evalúa mediante comparación de la medida para la muestra con la curva de calibración para determinar la cantidad de la sCD14-ST en la muestra. El grado de la función del fagocito en la muestra o el grado de la activación del fagocito puede evaluarse usando el valor de patrón del número del fagocito usado en el ensayo y/o la cantidad de la sCD14-ST producida por unidad de tiempo. La sustancia de patrón de la sCD14-ST puede ser la sCD14-ST purificada a partir de la sangre, sCD14-ST que se ha producido mediante estímulo fagocítico por el fagocito seguido por purificación, sCD14-ST recombinante, o sCD14-ST producida mediante síntesis peptídica. El método usado para la purificación de la sCD14-ST y el método de producción de la sCD14-ST recombinante se describen en el documento WO 2005/108429.

3. Diversos métodos de detección y evaluación mediante la evaluación de la función del fagocito extraído del sujeto

La siguiente detección y evaluación se permite si se evalúa la función del fagocito extraído del sujeto usando el método descrito en la sección de "2. Método para evaluar la función de un fagocito".

A) Detección y evaluación de si el sujeto padece una enfermedad asociada con disfunción del fagocito, el estadio de la enfermedad y/o intensidad de la enfermedad.

B) Detección y evaluación del cambio tal como disminución o potenciación, anomalía y/o grado de la función inmunitaria del sujeto.

5 C) Detección y evaluación del efecto del fármaco mediante la evaluación de la función del fagocito extraído del sujeto durante y/o tras la administración de fármaco.

D) Proporcionar un índice para la clasificación de la calidad del fagocito cuando el fagocito se usa en medicina regenerativa.

10 En la detección y evaluación de la enfermedad asociada con disfunción fagocítica, el procedimiento debe incluir al menos la etapa de evaluar la función del fagocito del sujeto usando el método descrito en la sección de "2. Método para evaluar la función de un fagocito", y el procedimiento puede comprender además las etapas de comparar el resultado de las evaluaciones con el valor normal, y determinar el padecimiento y/o el grado de la enfermedad basándose en si la función del fagocito extraído del sujeto es superior o inferior al valor normal.

15 El término "valor normal" usado en el presente documento significa el valor obtenido midiendo de manera preliminar la función del fagocito extraído de los sujetos que no padecen la enfermedad, concretamente, los sujetos sanos, y normalizar las medidas calculando el promedio de las medidas o seleccionando un determinado intervalo a partir de las medidas. Aunque la comparación de la medida de la muestra con el valor normal puede realizarse comparando simplemente los valores, puede usarse el (promedio  $\pm$  2 D.E.) o el (promedio  $\pm$  3 D.E.) en los sujetos normales como valores de corte, y puede determinarse que la muestra con la medida superior o inferior a los valores de corte tiene disfunción fagocítica. El valor de medición también puede usarse para evaluar el estadio de la enfermedad y/o la intensidad de la enfermedad.

20 Los ejemplos de la enfermedad asociada con la disfunción fagocítica incluyen uremia, disminución de la actividad de opsonina sérica, deficiencia de complemento, disfunción de fagocitosis congénita, enfermedad granulomatosa crónica, defecto de mieloperoxidasa, leucemia, linfoma maligno, endocarditis bacteriana, diabetes y cirrosis hepática. Por ejemplo, la enfermedad granulomatosa crónica es una disfunción fagocítica congénita provocada por el defecto en la producción de oxígeno activo mediante neutrófilos que da como resultado padecimiento repetido de infección grave por bacterias y hongos. El neutrófilo del paciente que padece la enfermedad granulomatosa crónica tiene la función de fagocitosis (envolver la sustancia foránea) pero no la función digestiva. Por consiguiente, la anomalía no puede detectarse mediante la evaluación de la envuelta de las perlas de látex mientras que la evaluación de la fagocitosis usando la producción de la sCD14-ST como índice puede detectar la disfunción fagocítica.

25 La evaluación de la función inmunitaria puede realizarse según la detección y evaluación de la enfermedad asociada con la disfunción fagocítica. La función de un fagocito, y en particular la fagocitosis, es un mecanismo de defensa importante en el estadio más temprano de la respuesta inmunitaria, y la disfunción fagocítica conduce a una función inmunitaria anómala. Por consiguiente, la evaluación de la función inmunitaria puede realizarse entendiendo la disfunción fagocítica como la función inmunitaria.

30 Al detectar y evaluar los efectos del fármaco, el procedimiento debe incluir al menos la etapa de evaluar la función del fagocito para el fagocito extraído del sujeto durante y/o tras la administración de fármaco usando el método descrito en la sección de "2. Método para evaluar la función de un fagocito", y el procedimiento puede comprender además las etapas de comparar el resultado de las evaluaciones con el valor normal y/o los resultados antes de la administración de fármaco, y determinar la presencia y/o el grado del cambio en la función del fagocito extraído del sujeto mediante la administración de fármaco. Tal como se describió anteriormente, el término "valor normal" es la medida obtenida sometiendo a ensayo la función del fagocito a partir de sujetos sanos.

35 Si un cambio en la función de un fagocito durante y/o tras la administración de fármaco puede detectarse tras administrar un inmunosupresor, un inmunoestimulante, un agente anticancerígeno, o similar, pueden confirmarse la eficacia del fármaco y el grado de los efectos secundarios, y esto servirá como directriz útil para la selección de fármaco y la determinación de su dosis. El grado del cambio de la función de un fagocito, concretamente, cambio en la cantidad de la sCD14-ST producida, puede usarse como índice del grado de la eficacia de fármaco. Por ejemplo, puede compararse la fagocitosis del neutrófilo en la sangre periférica antes y después de la administración de G-CSF para evaluar cómo aumentan los neutrófilos que tienen función normal mediante la administración de G-CSF.

40 Cuando se evalúan los fagocitos para determinar el uso de fagocitos en medicina regenerativa, los fagocitos usados pueden medirse para determinar su fagocitosis usando la producción de la sCD14-ST como índice para determinar así si el fagocito tiene la función normal de un fagocito y/o la actividad de fagocito. El término "medicina regenerativa" usado en el presente documento incluye trasplante de células autólogas en el que se cultivan leucocitos o similares extraídos del paciente y se tratan fuera del cuerpo del paciente y se trasplantan de vuelta al paciente así como trasplante de células cruzadas en el que los leucocitos o similares extraídos de un donante normal se trasplantan a un paciente. Tras la preparación del fagocito para trasplante, puede usarse el método descrito en la sección de "2. Método para evaluar la función de un fagocito" para someter a prueba si el fagocito tiene una determinada calidad. La función del fagocito preparado se compara con el valor de patrón, y si el valor

medido supera el valor de patrón, se determina que el fagocito tiene una calidad suficiente en la medicina regenerativa. Aunque el valor de patrón puede establecerse de manera adecuada dependiendo del objeto de la medicina regenerativa, la evaluación puede realizarse generalmente mediante comparación con la fagocitosis del fagocito normal. Cuando el valor medido es inferior al valor de patrón, debe determinarse que el fagocito tiene una calidad inadecuada para el trasplante debido a la pérdida de la función o actividad celular del fagocito en el procedimiento de su preparación.

#### 4. Examen para seleccionar una sustancia que regula la función fagocítica

El examen para seleccionar una sustancia que regula la función fagocítica también puede realizarse usando el método descrito en la sección de "2. Método para evaluar la función de un fagocito". Más específicamente, la presente invención proporciona un método para seleccionar una sustancia que regula la función fagocítica que comprende las etapas de:

- 1) poner en contacto un fagocito con un analito,
- 2) medir la sCD14-ST producida por el fagocito, y
- 3) evaluar los efectos del analito sobre la fagocitosis por el fagocito.

La etapa de 1) poner en contacto un fagocito con un analito puede llevarse a cabo de modo que el fagocito y el analito se ponen en contacto en presencia de la sustancia que va a involucrarse.

La "sustancia que regula la función fagocítica" es una sustancia que fomenta o suprime la fagocitosis del fagocito. Por ejemplo, cuando se usa una sustancia que se sabe que regula la función fagocítica tal como wortmanina o citocalasina D como analito, y este analito se pone en contacto con el fagocito para medir la sCD14-ST producida por el fagocito, la cantidad de la sCD14-ST producida disminuye con la adición del analito, y de ese modo se confirma el efecto supresor de la fagocitosis. De manera similar, puede usarse como analito una sustancia cuya actividad de regulación de la función fagocítica va a evaluarse, y este analito puede ponerse en contacto con el fagocito para medir la cantidad de la sCD14-ST producida, y esta cantidad de la sCD14-ST puede usarse como índice para determinar el efecto de la sCD14-ST sobre la fagocitosis.

#### 5. Método para detectar enfermedad asociada con fagocitosis

La presente invención también proporciona un método para detectar una enfermedad asociada con fagocitosis por el fagocito tal como se define en la reivindicación 7. En este método, se mide la sCD14-ST en la muestra extraída del sujeto, y se compara el resultado con el valor normal para determinar si la cantidad de la sCD14-ST en la muestra es superior al valor normal para así detectar si el sujeto padece una enfermedad asociada con fagocitosis por el fagocito, el estadio de la enfermedad y/o la intensidad de la enfermedad.

El sujeto de prueba no está particularmente limitado siempre que sea un mamífero. Los sujetos a modo de ejemplo incluyen mamíferos tales como ser humano, mono, rata, ratón, conejo, animal bovino, cerdo, oveja, cabra, caballo, perro y gato.

La enfermedad asociada con fagocitosis por el fagocito es una enfermedad en la que se produce fagocitosis por el fagocito en la lesión, y en particular, una enfermedad asociada con fagocitosis local mediante respuesta autoinmunitaria o infección. Tales enfermedades a modo de ejemplo incluyen enfermedades locales tales como enfermedades autoinmunitarias, artritis reumatoide, mastitis, gota, glomerulonefritis, colitis ulcerosa, fiebre mediterránea, otitis media, rinitis, neumonía, tuberculosis, cistitis, infección del líquido amniótico y piosemia. Sin embargo, en la presente invención no se incluyen enfermedades asociadas con infección sistémica y septicemia.

Las muestras a modo de ejemplo incluyen líquidos corporales tales como líquido intersticial, linfa, líquido sinovial, leche, líquido cefalorraquídeo, pus, saliva, líquido lagrimal, mucosa, rinorrea, esputo, orina, ascitis, líquido amniótico, y líquido seminal así como líquido de lavado obtenido tras el lavado de cavidad nasal, bronquio, pulmón, piel, cavidad peritoneal, diversos órganos, articulación, hueso, y similares. Sin embargo, no va a usarse sangre en la presente invención.

La medición de la sCD14-ST puede realizarse según el método descrito en la sección de "2. Método para evaluar la función de un fagocito". El valor normal usado puede ser el valor obtenido midiendo de manera preliminar los sujetos que no padecen la enfermedad, concretamente, los sujetos sanos, y normalizando las medidas mediante el cálculo del promedio de las medidas o seleccionando un determinado intervalo a partir de las medidas. Cuando el valor medido para la muestra extraída de un sujeto sano es sustancialmente equivalente al fondo del sistema de ensayo, puede usarse como valor normal un valor normalizado mediante el cálculo del promedio del valor de fondo o seleccionando un intervalo. El valor de fondo del sistema de ensayo es el valor medido para el sistema de ensayo al que no se le ha añadido la muestra sino el tampón y la disolución de ensayo. Aunque la comparación de la medida de la muestra con el valor normal puede realizarse comparando simplemente los valores, puede usarse el (promedio + 2 D.E.) o el (promedio + 3 D.E.) de los sujetos normales como valores de corte, y puede determinarse que la muestra con la medida superior al valor de corte es positiva. También puede usarse el valor de medición para la

determinación del estadio de la enfermedad y/o la intensidad de la enfermedad, y más específicamente, un valor de medición superior puede significar un estadio superior e intensidad superior de la enfermedad.

La muestra puede contener el fagocito o no. La sCD14-ST en la muestra puede medirse directamente para evaluar la fagocitosis en el organismo vivo, concretamente, para determinar el padecimiento y/o la intensidad de la enfermedad, en parte porque la sCD14-ST producida como resultado de la fagocitosis por el fagocito en el organismo vivo está presente en la muestra. Por ejemplo, en el caso de animal de modelo de artritis, puede medirse la sCD14-ST en líquido sinovial o líquido de lavado articular para diagnosticar la enfermedad asociada con inflamación en la articulación, y en particular, artritis reumatoide, osteoartritis, periartrosis escapulohumeral, y similares, en parte porque puede detectarse el aumento de la concentración de la sCD14-ST en el líquido sinovial o líquido de lavado articular.

Por otro lado, puede detectarse la presencia y/o cantidad del fagocito en el líquido corporal o líquido de lavado tisular para así determinar el padecimiento y/o la intensidad de la enfermedad. En este caso, puede añadirse una sustancia que va a envolverse a la muestra para medir la sCD14-ST producida. Por ejemplo, puede añadirse una sustancia que va a envolverse a leche, y puede medirse la sCD14-ST producida para el diagnóstico de mastitis. Esto es particularmente útil para detectar mastitis bovina.

La presente invención se ha descrito haciendo referencia a realizaciones preferidas que no limitan de ningún modo el alcance de la invención.

### Ejemplos

(Ejemplo 1) Producción de anticuerpo F1301-9-1 usando un péptido sintético para el antígeno.

#### 1-(1) Preparación del péptido usado para el antígeno

Se sintetizó un péptido que tenía la secuencia definida en SEQ ID NO: 5 (correspondiente a la secuencia de los residuos de aminoácido 40° a 59° de la secuencia de aminoácidos de CD14 de conejo) que tenía cisteína insertada en su extremo N-terminal para la ligación en su extremo con la proteína transportadora a través de un grupo SH usando un sintetizador peptídico ABI433A (Applied Biosystems). Se purificó el péptido mediante el método comúnmente usado en la técnica para obtener de 2 a 3 mg del péptido.

#### 1-(2) Preparación de proteína transportadora de péptidos usando el péptido sintético

Se disolvió el péptido preparado en 1-(1) en agua destilada hasta 10 mg/ml, y se mezclaron una cantidad igual de esta disolución y hemocianina de lapa californiana (KLH) activada por maleimida Imject 10 mg/ml (PIERCE). Se dejó reaccionar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas para la unión del péptido con la proteína transportadora (este producto se denomina a continuación en el presente documento "péptido de SEQ ID NO: 5 - KLH"). Mientras tanto, se disolvió el péptido preparado en 1-(1) en agua destilada hasta 10 mg/ml, se mezclaron una cantidad igual de esta disolución y albúmina sérica bovina (BSA) activada por maleimida Imject 10 mg/ml (PIERCE). Se dejó reaccionar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas para la unión del péptido con la proteína transportadora (este producto se denomina a continuación en el presente documento "péptido de SEQ ID NO: 5 - BSA").

#### 1-(3) Producción de clon de hibridoma usando el péptido sintético para el antígeno

Con el fin de preparar un anticuerpo monoclonal para el péptido preparado en 1(1), se inmunizaron ratas con péptido de SEQ ID NO: 5 - KLH. Más específicamente, se diluyeron 100 µg de péptido de SEQ ID NO: 5 - KLH con 100 µl de solución salina fisiológica, y se mezclaron cantidad igual de esta disolución y 100 µl de adyuvante completo de Freund (DIFCO). Se administraron 100 µl de esta mezcla a la almohadilla plantaria de una rata Wistar hembra de 8 semanas de edad (Japan SLC, Inc.). Tras 11 días, se administraron de nuevo 100 µg de péptido de SEQ ID NO: 5 - KLH que se habían diluido con 200 µl de solución salina fisiológica a la almohadilla plantaria. 3 días después de la administración, se separaron los linfocitos del ganglio linfático ilíaco, y se mezclaron los linfocitos así obtenidos con Sp2/0-Ag14 (ATCC CRL-1581), y se realizó la fusión celular según el procedimiento descrito en "Introduction to experimental methods of monoclonal antibody" editado por Tamie Ando y Takeshi Chiba (Kodan-sha) usando polietilenglicol. Se seleccionó el hibridoma mediante medio HAT y, tras 1 semana, se seleccionó mediante ELISA el hibridoma que producía el anticuerpo deseado. Más específicamente, se diluyó péptido de SEQ ID NO: 5 - BSA con tampón fosfato 0,076 M (pH 7,4) (denominado a continuación en el presente documento D-PBS) hasta 10 µg/ml, y se añadió a una inmunoplaaca (Maxisorb, Nunc) a 50 µl/pocillo. Tras dejar avanzar la reacción durante la noche a 4°C, se lavó el pocillo 5 veces con agua sometida a intercambio iónico. Se bloqueó el pocillo añadiendo 100 µl de D-PBS (pH 7,4) que contenía Stabilguard al 2% a cada pocillo. A continuación, se añadió el sobrenadante del cultivo de hibridoma a cada pocillo, y tras reaccionar a 37°C durante 1 hora, se lavó el pocillo 3 veces mediante solución salina fisiológica que contenía Tween 20 al 0,05%. Se diluyó anticuerpo anti-inmunoglobulina de rata marcado con peroxidasa (DAKO) 1000 veces con D-PBS (pH 7,4) que contenía suero de conejo al 10%, y se añadieron 50 µl a cada pocillo. Tras reaccionar a 37°C durante 1 hora, se lavó el pocillo 3 veces mediante el mismo procedimiento. Se añadió disolución de TMB (BioFX) a cada pocillo, y tras reaccionar a temperatura ambiente durante 10 minutos, se

detuvo la reacción añadiendo disolución de ácido sulfúrico 0,5 M. Se midió la absorbancia a 450 nm mediante espectrofotómetro de placas (NJ-2100, Intermed Japan), y se recogieron las células en el pocillo con la absorbancia aumentada y se clonaron mediante análisis de dilución limitante. Tras 11 días, se realizó el examen mediante el mismo método, y se obtuvo el clon F1301-9-1 que produce el anticuerpo que reacciona con el péptido de SEQ ID NO: 5.

1-(4) Purificación de anticuerpo a partir del sobrenadante del hibridoma

Se cultivó el F1301-9-1 obtenido en 1-(3) a una escala de 3 l en medio SFM (GIBCO). Se filtró el sobrenadante de este medio a través de un filtro de 0,45 µm para retirar las células, y se aplicó el filtrado a una columna de proteína G. A continuación, se eluyó la fracción adsorbida con un ácido y se neutralizó inmediatamente el eluato añadiendo un volumen de 1/10 de Tris-HCl 1 M (pH 8,0). Se sometió el eluato a intercambio de tampón con solución salina fisiológica usando una membrana de ultrafiltración para obtener el anticuerpo purificado.

(Ejemplo 2) Preparación de anticuerpo F1258-7-2 usando el péptido sintético para el antígeno

2-(1) Preparación del péptido usado para el antígeno

Se sintetizó un péptido que tenía la secuencia definida en SEQ ID NO: 6 (correspondiente a la secuencia de los aminoácidos 1º a 30º de la secuencia de aminoácidos de CD14 de conejo) que tenía cisteína insertada en su extremo N-terminal para la ligación en su extremo con la proteína transportadora a través de un grupo SH usando sintetizador peptídico ABI433A (Applied Biosystems). Se purificó el péptido mediante el método comúnmente usado en la técnica para obtener de 2 a 3 mg del péptido.

2-(2) Preparación de proteína transportadora de péptidos usando el péptido sintético

Se prepararon péptido de SEQ ID NO: 6 - KLH y péptido de SEQ ID NO: 6 - BSA mediante el método similar al de 1-(2).

2-(3) Producción de clon de hibridoma usando el péptido sintético para el antígeno

Se produjo el clon F1258-7-2 que producía el anticuerpo monoclonal para el péptido de SEQ ID NO: 6 preparado en 2-(2) mediante el método similar al de 1-(3).

2-(4) Purificación de anticuerpo a partir del sobrenadante del hibridoma

Se purificó un anticuerpo monoclonal a partir del sobrenadante del cultivo del clon de hibridoma del péptido de SEQ ID NO: 6 preparado en 2-(3) mediante el método similar al de 1-(4).

(Ejemplo 3) Preparación del sistema de ensayo para detectar sCD14-ST de conejo

Con el fin de preparar un sistema que pueda detectar específicamente la sCD14-ST de conejo, se preparó un sistema de ELISA de tipo sándwich usando los anticuerpos preparados en el ejemplo 1-(4) y el ejemplo 2-(4).

3-(1) Preparación de Fab' de F1258-7-2 - HRP

Para preparar F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo F1258-7-2, se trató el anticuerpo F1258-7-2 purificado preparado en el ejemplo 2-(4) con pepsina. Más específicamente, se sometió el anticuerpo F1258-7-2 purificado a intercambio de tampón con tampón acetato 100 mM (pH 4,4) que contenía urea 2 M, y se añadió pepsina (Boehringer) de modo que la razón de anticuerpo:enzima era de 30:1 (razón en peso). Tras la adición, se fomentó la reacción a 37°C durante 6 horas. Al completarse la reacción, se añadió tampón Tris-ácido clorhídrico 1 M (pH 8,0) para llevar el pH de vuelta a aproximadamente neutro. A continuación, se purificó F(ab')<sub>2</sub>. Más específicamente, se aplicó el anticuerpo tratado con pepsina a Prosep G (Millipore) para retirar el resto Fc y la pepsina, y se eluyó la fracción adsorbida con un ácido. Se aplicó adicionalmente la fracción adsorbida a Superdex 200 (Amersham) para retirar el anticuerpo no escindido para así obtener el F(ab')<sub>2</sub> de F1258-7-2. Se confirmó el F(ab')<sub>2</sub> purificado para determinar su pureza mediante SDS-PAGE, y se cuantificó la proteína usando reactivo de colorante de ensayo de proteínas (Bio-Rad) usando IgG de suero bovino como patrón. Se redujo parcialmente el anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> de F1258-7-2 así preparado mediante kit de marcaje con peroxidasa SH (Dojindo Laboratories), y se marcó el residuo de cisteína en la bisagra con peroxidasa para producir Fab' de F1258-7-2 - HRP.

3-(2) Preparación de sistema de ELISA de tipo sándwich de sCD14-ST de conejo

Se construyó un sistema de ELISA de tipo sándwich de dos etapas usando el anticuerpo F1301-9-1 producido en el ejemplo 1-(4) para el anticuerpo de fase sólida, y el anticuerpo Fab' de F1258-7-2 - HRP preparado en el ejemplo 3-(1) para el anticuerpo de marcaje. Más específicamente, se diluyó el anticuerpo F1301-9-1 con D-PBS (pH 7,4) hasta 10 µg/ml, y se añadió a los pocillos de una inmunoplaaca (Maxisorb, Nunc) a 50 µl/pocillo. Tras dejar avanzar la reacción durante la noche a 4°C, se lavó el pocillo 5 veces con agua sometida a intercambio iónico. Se añadió D-PBS (pH 7,4) que contenía StabilGuard al 5% (SurModics) y Tween 20 al 0,1% a los pocillos a 200 µl/pocillo para el bloqueo. A continuación, se diluyó la muestra usando tampón fosfato 150 mM (pH 6,0) que contenía suero de conejo

normal al 5% (suero del cual se había eliminado antígeno CD14 soluble usando la columna de anticuerpo de afinidad para CD14 de conejo), BSA al 1% y Tween 20 al 0,1% para la dilución, y se añadió la muestra diluida a los pocillos a 50 µl/pocillo y se dejó reaccionar a 25°C durante 3 horas. Tras completarse la reacción, se lavó el pocillo 5 veces con solución salina fisiológica que contenía Tween 20 al 0,05%. Se diluyó el Fab' de F1258-7-2 - HRP con tampón fosfato 75 mM (pH 6,4) que contenía suero de rata al 4% y Tween 20 al 0,05%, y se añadió a los pocillos a 50 µl/pocillo. Tras dejar reaccionar a 25°C durante 2 horas, se lavó el pocillo 5 veces de una manera similar. Se añadió disolución de tetrametilbencidina (TMB, BioFX) a los pocillos y se dejó avanzar la reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se detuvo la reacción con disolución de ácido sulfúrico 0,5 M y se midió la absorbancia a 450 nm usando un espectrofotómetro de placas (NJ-2100, Intermed Japan). La sustancia de patrón usada fue sCD14-ST de conejo recombinante. La sCD14-ST de conejo recombinante se preparó según el método descrito en el documento WO 2005/108429. Más específicamente, se produjo un plásmido que tenía un sitio de escisión de trombina insertado tras el 66º residuo de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la CD14 de conejo y se expresó de manera transitoria este plásmido en el sobrenadante de cultivo de células COS. Tras purificar la sCD14 en el sobrenadante de cultivo, se escindió la sCD14 con trombina y se sometió a cromatografía de filtración en gel para purificar la sCD14-ST de conejo recombinante. El ELISA de tipo sándwich así preparado podía detectar la sCD14-ST recombinante de una manera dependiente de la dosis tal como se muestra en la figura 1.

(Ejemplo 4) Examen de la producción de sCD14-ST en modelo de sujetos de conejo

4-(1) Producción de modelo de septicemia de conejo inducida por LPS

Se preparó un modelo de septicemia de conejo inducida por LPS administrando LPS (Salmoella Minnesota Re595, Sigma) a la vena auricular de un conejo blanco de Nueva Zelanda (de 1,8 a 2,6 kg, Kitayama Labes Co., Ltd.) a una dosis de 10 µg/kg. Se extrajo sangre de la arteria auricular antes y 1,5 horas después de la administración de LPS. Se añadió ácido cítrico a la sangre.

4-(2) Producción de modelo infectado por bacterias vivas de conejo (modelo de CLP)

Se preparó un modelo de CLP (punción y ligadura cecal) de conejo mediante cirugía de un conejo blanco de Nueva Zelanda (de 1,8 a 2,6 kg, Kitayama Labes Co., Ltd.). Más específicamente, se sometió el animal, que había estado en ayunas durante la noche, a anestesia general mediante la administración de 0,35 mg/kg de Domitor (clorhidrato de medetomidina, Meiji Seika Kaisha, Ltd.) y 5 mg/kg de Ketalar para animales (ketamina, Sankyo) a su vena auricular. Tras disecar el abdomen y extraer el ciego de la cavidad peritoneal, se ligó el ciego en la parte aguas abajo de la unión ileocecal y se realizaron 2 incisiones que tenían, cada una, una anchura de aproximadamente 2 cm con tijeras oftálmicas. Se apretó el ciego con pinzas para confirmar que el contenido del ciego salía de la incisión. y después volvió a colocarse el ciego en la cavidad peritoneal, y se cerraron el peritoneo y la piel con sutura quirúrgica. Tras cerrar el abdomen, se administraron por vía subcutánea 50 ml/kg de solución salina fisiológica y se administraron 0,35 mg/kg de Antisedan (clorhidrato de atipamezol, Meiji Seika Kaisha, Ltd.) a la vena auricular para completar la cirugía. Se extrajo sangre de la arteria auricular antes y 2 horas después de la cirugía para la producción del modelo de CLP. Se añadió ácido cítrico a la sangre.

4-(3) Medición de la sCD14-ST en sangre en el modelo de septicemia de conejo

Se preparó plasma a partir de la sangre extraída en los ejemplos 4-(1) y 4-(2) mediante centrifugación, y se midió la sCD14-ST según el método descrito en el ejemplo 3-(2). Los resultados se muestran en las figuras 2 y 3. No se reconoció un aumento de la sCD14-ST en sangre en el modelo de septicemia inducida por LPS (figura 2) mientras que se reconoció un aumento de la sCD14-ST en sangre en el caso del modelo de septicemia mediante infección por bacterias vivas (figura 3). El aumento de la sCD14-ST en sangre en el modelo de septicemia mediante infección por bacterias vivas pudo detectarse a las 2 horas tras la cirugía (infección), confirmando que la sCD14-ST es un marcador que puede detectarse en un estadio más temprano de la infección en comparación con otros marcadores tales como IL-6 y dímero D. Estos resultados indicaron que la producción de sCD14-ST no se produce únicamente mediante la activación de los leucocitos mediante endotoxina, y la necesidad de la fagocitosis de las bacterias mediante leucocitos que es la reacción inmunitaria en el estadio más temprano de la infección.

(Ejemplo 5) Experimento de fagocitosis usando granulocitos a partir de cavidad peritoneal de conejo

5-(1) Extracción de granulocitos a partir de cavidad peritoneal de conejo

Se disolvió glicógeno con solución salina fisiológica hasta el 0,1% y se administraron 150 ml de esta disolución a la cavidad peritoneal de un conejo macho blanco de Nueva Zelanda (Kitayama Labes Co., Ltd., de 1,64 a 1,92 kg). A las 16 horas tras la administración, se sacrificó el conejo mediante anestesia excesiva y se lavó la cavidad peritoneal con solución salina fisiológica para extraer los granulocitos.

5-(2) Producción de sCD14-ST mediante diversos estimulantes

Se añadieron diversos estimulantes de leucocitos a los granulocitos para evaluar la cantidad de sCD14-ST producida. Más específicamente, se suspendieron granulocitos de la cavidad peritoneal de conejo extraídos en el ejemplo 5-(1) en tampón HBSS (GIBCO 14025) que contenía suero de conejo normal al 2%, glutamina 2 mM y

HEPES 10 mM (denominado a continuación en el presente documento “tampón de ensayo celular”) hasta una concentración celular de  $1 \times 10^7$  células/ml, y se añadió a los pocillos de una placa de cultivo de 96 pocillos (Nunc Surface, Nunc) a 100  $\mu$ l/pocillo. A continuación, se ajustaron diversos estimulantes hasta 3 veces la concentración objetivo con el tampón de ensayo celular y se añadieron a los pocillos a 50  $\mu$ l/pocillo. Tras incubar a 37°C durante 2 horas, se recogió el sobrenadante mediante centrifugación y se midió la sCD14-ST mediante el sistema de ensayo del ejemplo 3-(2). Los resultados se muestran en la figura 4. Se reconoció un aumento de la sCD14-ST en el caso de los estimulantes que inducen fagocitosis y digestión mediante leucocitos (células *E. coli* o zimosano). Por otro lado, no se reconoció un aumento de la sCD14-ST en el caso de los estimulantes que no inducían la fagocitosis tales como LPS, PMA (miristato-acetato de forbol) y fMLP (formil-metionil-leucil-fenilalanina). Además, no se reconoció un aumento de la sCD14-ST en el caso de microperlas que inducen la fagocitosis pero no la digestión. A continuación, se midió la producción de sCD14 de alto peso molecular usando un kit para medir sCD14 de alto peso molecular (R&D) y se reconoció un aumento de la producción de la sCD14 de alto peso molecular tras estimular con LPS o PMA tal como se muestra en la figura 5. Estos resultados indican que los mecanismos de producción son diferentes para la sCD14-ST y la sCD14 de alto peso molecular.

#### 5-(3) Acción de diversos inhibidores sobre la producción de sCD14-ST

El ejemplo 5-(2) indicó que la fagocitosis mediante los granulocitos está relacionada con la producción de la sCD14-ST de conejo. Por consiguiente, se examinó la relación entre la producción de la sCD14-ST y la fagocitosis usando diversos inhibidores de fagocitosis. Más específicamente, se suspendieron los granulocitos de cavidad peritoneal de conejo extraídos en el ejemplo 5-(1) en el tampón de ensayo celular hasta una concentración celular de  $1 \times 10^7$  células/ml y se añadió la suspensión a los pocillos de una placa de cultivo de 48 pocillos (agrupación de cultivo celular de 48 pocillos, Corning) a 200  $\mu$ l/pocillo. A continuación, se ajustaron diversos inhibidores hasta 3 veces la concentración objetivo con el tampón de ensayo celular y se añadieron a los pocillos a 100  $\mu$ l/pocillo. Tras incubar a 37°C durante 30 minutos, se añadieron 20 veces por recuento celular de *E. coli* a los granulocitos (se añadió *E. coli* contando 1 unidad formadora de colonias como 1 célula). Tras incubar a 37°C durante 2 horas, se recogió el sobrenadante mediante centrifugación y se sometió la sCD14-ST a ensayo usando el sistema de ensayo del ejemplo 3-(2). Los resultados se muestran en la figura 6. La producción de la sCD14-ST de conejo se inhibió mediante inhibidor de PI3 cinasa, wortmanina, que inhibe el tráfico de membrana en la fagocitosis y mediante agente de despolimerización de actina, citocalasina D, que inhibe la fagocitosis mediante desnaturalización del esqueleto celular.

#### (Ejemplo 6) Medición de sCD14-ST en líquido sinovial en modelo de artritis de conejo

##### 6-(1) Preparación de BSA metilada

Se disolvió 1 g de BSA (SIGMA) en 100 ml de D-PBS (pH 7,4) que contenía paraformaldehído al 4% y, tras ajustar el pH a 8,5 usando un álcali, se dejó avanzar la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, se añadieron 80 mg de borohidruro de sodio y, tras dejar avanzar la reacción de reducción a 4°C durante 2 horas, se intercambió el tampón con D-PBS (pH 7,4) usando un ultrafiltro.

##### 6-(2) Confirmación de la reacción inmunitaria mediante ELISA

Se confirmó la reacción inmunitaria para el antígeno mediante ELISA. Más específicamente, se diluyó BSA metilada con D-PBS (pH 7,4) hasta 10  $\mu$ g/ml y se añadió a una palca inmunológica (Maxisorp, Nunc) a 50  $\mu$ l/pocillo. Tras dejar avanzar la reacción a 37°C durante 1 hora y lavar 5 veces con agua sometida a intercambio iónico, se bloquearon los pocillos mediante adición de 100  $\mu$ l/pocillo de D-PBS (pH 7,4) que contenía StabliGuard al 5% (SurModics). A continuación, se diluyeron las muestras de sangre (suero) de los conejos usados en la evaluación del ejemplo 6-(3) con D-PBS (pH 7,4) que contenía StabliGuard al 1% (SurModics) y se añadieron a los pocillos a 100  $\mu$ l/pocillo. Tras la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora, se lavó el pocillo 5 veces con solución salina fisiológica que contenía Tween 20 al 0,05%. A continuación, se diluyó anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo marcado con peroxidasa (DAKO, P448) 1000 veces con D-PBS que contenía suero de cabra al 5% y se añadió a los pocillos a 50  $\mu$ l/pocillo. Tras dejar reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora, se lavó el pocillo 5 veces de una manera similar. Se añadió una disolución de TMB (BioFX) a los pocillos y se dejó avanzar la reacción a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se detuvo la reacción con disolución de ácido sulfúrico 0,5 M y se midió la absorbancia a 450 nm usando un espectrofotómetro de placas (Multiscan JX, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.).

##### 6-(3) Medición de sCD14-ST en modelo de artritis de conejo

Se mezclaron 500  $\mu$ l (5 mg) de la BSA metilada preparada en el ejemplo 6-(1) y 500  $\mu$ l de adyuvante completo de Freund (DIFCO) y se administró esta mezcla por vía subcutánea en el lomo, en la base de la pata trasera y por vía intramuscular en el muslo de conejos machos blancos de Nueva Zelanda (de 10 a 11 semanas de edad, Kitayama Labes Co., Ltd.) (denominado a continuación en el presente documento “grupo sensibilizado con antígeno”). Simultáneamente, se administró el disolvente que no tenía BSA metilada añadida al mismo al mismo número de conejos (denominado a continuación en el presente documento “grupo de control de disolvente”). Tras 2 semanas, se mezclaron 500  $\mu$ l (5 mg) de BSA metilada y 500  $\mu$ l de adyuvante incompleto de Freund (DIFCO) y se usó esta

mezcla para sensibilizar de nuevo el grupo sensibilizado con antígeno. Para el grupo de control de disolvente, se añadió el disolvente que no tenía BSA metilada añadida al mismo de la misma manera. Tras 1 semana, se extrajo sangre de la arteria articular de los conejos y se midió el título de anticuerpos de la sangre usando el procedimiento de ELISA descrito en el ejemplo 6-(2) para confirmar que se había establecido la sensibilización en el grupo sensibilizado con antígeno. A continuación, se ajustó la BSA metilada mediante D-PBS (pH 7,4) hasta 5 mg/ml y se administró 1 ml a la cavidad de la articulación de la rodilla del grupo sensibilizado con antígeno para inducir artritis. Simultáneamente, se administró 1 ml de D-PBS (pH 7,4) a la cavidad de la articulación de la rodilla del grupo de control de disolvente. A los 4 días y 10 días tras la inducción, se recogió líquido de lavado de la cavidad de la articulación de la rodilla de ambos grupos y se realizaron la medición de la sCD14-ST y el análisis de la fracción de células de la sangre mediante frotis. Simultáneamente, se extrajo sangre de la arteria auricular (mediante adición de ácido cítrico a la sangre) para medir la sCD14-ST en sangre. En la muestra de frotis, se reconoció una acumulación de un gran número de granulocitos en el grupo sensibilizado con antígeno. Además, cuando se analizó el líquido de lavado de la cavidad de la articulación de la rodilla mediante el sistema de ensayo de sCD14-ST descrito en el ejemplo 3-(2), se reconoció un aumento de la sCD14-ST en el grupo sensibilizado con antígeno 4 días y 10 días tras la sensibilización con antígeno tal como se muestra en la figura 7. El valor todavía era alto tras 10 días, y esto indica que la sCD14-ST se producía mediante la fagocitosis provocada por la reacción inmunitaria excesiva contra el tejido propio asociada con artritis. Por otro lado, no se reconoció un aumento de la sCD14-ST en sangre en ninguno de los grupos.

(Ejemplo 7) Producción de sCD14-ST asociada con la fagocitosis de los fagocitos de seres humanos.

#### 7-(1) Preparación de granulocitos de sangre periférica humanos

Se preparó una fracción de granulocitos a partir de sangre periférica extraída de un donante humano sano mediante centrifugación por gradiente de densidad usando dos fases que tenían, cada una, una densidad relativa de  $d=1,077$  y  $d=1,119$ .

#### 7-(2) Producción de sCD14-ST mediante la fagocitosis de granulocitos

Se añadieron diversos estimulantes de leucocitos a los granulocitos para evaluar la cantidad de la sCD14-ST producida. Más específicamente, se suspendieron granulocitos de sangre periférica humanos extraídos en el ejemplo 7-(1) en cultivo con RPMI1640 que contenía suero humano sano al 10%, glutamina 2 mM, HEPES 10 mM y G-CSF 10 ng/ml (SIGMA R8758) hasta una concentración celular de  $0,5 \times 10^7$  células/ml, y se añadieron a los pocillos de una placa de cultivo de 96 pocillos (Nunc) a 100  $\mu$ l/pocillo. Se incubaron los granulocitos durante la noche a 37°C en presencia de dióxido de carbono al 5%. A continuación, se ajustaron diversos estimulantes hasta una concentración de 1,5 veces con tampón HBSS que contenía suero humano sano al 10%, glutamina 2 mM y HEPES 10 mM, y se añadieron a los pocillos a 200  $\mu$ l/pocillo. Tras incubar a 37°C durante 2 horas, se recogió el sobrenadante mediante centrifugación y se midió la sCD14-ST humana usando el kit de ensayo descrito en el ejemplo 7-(3) del documento WO 2005/108429. Más específicamente, el kit de ensayo de tipo sándwich usado fue el que contenía el anticuerpo que se une al péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácido 53° a 68° de la CD14 humana (anticuerpo S68), que reconoce específicamente la sCD14-ST humana. Para constituir el kit de ensayo de tipo sándwich, se usó otro anticuerpo que se une al péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácido 17° a 26° de la CD14 humana (F1106-13-3), que se había marcado con peroxidasa. Tal como se muestra en la figura 8, y como en el caso del ejemplo 5, se reconoció un aumento de la sCD14-ST con los estimulantes de fagocitosis (células *E. coli* y zimosano) mientras que no se reconoció un aumento de la sCD14-ST con LPS o las micropérlas.

#### 7-(3) Acción de inhibidor de fagocitosis para la producción de sCD14-ST

Se examinó la acción del inhibidor de fagocitosis sobre la producción de sCD14-ST mediante granulocitos humanos. Más específicamente, se cultivaron granulocitos de sangre periférica humanos durante la noche en una placa de cultivo de 96 pocillos como en el caso del ejemplo 7-(2). A continuación, se ajustaron diversos inhibidores de fagocitosis hasta una concentración de 3 veces con tampón HBSS que contenía suero humano sano al 10%, glutamina 2 mM y HEPES 10 mM, y se añadieron a los pocillos a 100  $\mu$ l/pocillo. Tras incubar a 37°C durante 1 hora, se añadieron 30 veces mediante recuento celular de *E. coli* a los granulocitos (se añadió *E. coli* contando 1 unidad formadora de colonias como 1 célula). Tras incubar a 37°C durante 2 horas, se recogió el sobrenadante mediante centrifugación y se sometió la sCD14-ST humana a ensayo usando el kit de ensayo descrito en el ejemplo 7-(3) del documento WO 2005/108429. Los resultados se muestran en la figura 9. Como en el caso del ejemplo 5-(3), wortmanina y citocalasina D inhibieron la producción de sCD14-ST.

#### 7-(4) Experimento de la fagocitosis usando células HL-60

Se cultivaron células HL-60 en presencia de DMSO para la diferenciación en granulocitos, y después se usaron para el experimento de manera similar al ejemplo 7-(2). Se reconoció la producción de la sCD14-ST mediante la adición de zimosano o *E. coli* como en el caso del ejemplo 7-(2).

Los ejemplos tal como se describieron anteriormente son algunas de las realizaciones preferidas de la presente

invención, y la presente invención no se limita a estos ejemplos.

**Lista de secuencias**

<110> Mochida Pharmaceutical Co., LTD.

<120> Métodos para la evaluación de la función de fagocitos

5 <130> MD0845

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 356

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 628 944 T3

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

ES 2 628 944 T3

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 Met 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> 2

<211> 355

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

ES 2 628 944 T3

<400> 2

Ser Thr Asp Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Asp Asp Ile Arg  
 1 5 10 15

Cys Val Cys Asn Phe Ser Asp Pro Gln Pro Asp Trp Ser Ser Ala Leu  
 20 25 30

Gln Cys Met Pro Ala Val Gln Val Glu Met Trp Gly Gly Gly His Ser  
 35 40 45

Leu Glu Gln Phe Leu Arg Gln Ala Asp Leu Tyr Thr Asp Gln Arg Arg  
 50 55 60

Tyr Ala Asp Val Val Lys Ala Leu Arg Val Arg Arg Leu Thr Val Gly  
 65 70 75 80

Ala Val Gln Val Pro Ala Pro Leu Leu Leu Gly Val Leu Arg Val Leu  
 85 90 95

Gly Tyr Ser Arg Leu Lys Glu Leu Ala Leu Glu Asp Ile Glu Val Thr  
 100 105 110

Gly Thr Ala Pro Pro Pro Pro Pro Leu Glu Ala Thr Gly Pro Ala Leu  
 115 120 125

Ser Thr Leu Ser Leu Arg Asn Val Ser Trp Pro Lys Gly Gly Ala Trp  
 130 135 140

Leu Ser Glu Leu Gln Gln Trp Leu Lys Pro Gly Leu Gln Val Leu Asn  
 145 150 155 160

Ile Ala Gln Ala His Thr Leu Ala Phe Ser Cys Glu Gln Val Arg Thr  
 165 170 175

Phe Ser Ala Leu Thr Thr Leu Asp Leu Ser Glu Asn Pro Gly Leu Gly  
 180 185 190

Glu Arg Gly Leu Val Ala Ala Leu Cys Pro His Lys Phe Pro Ala Leu  
 195 200 205

Gln Asp Leu Ala Leu Arg Asn Ala Gly Met Lys Thr Leu Gln Gly Val  
 210 215 220

Cys Ala Ala Leu Ala Glu Ala Gly Val Gln Pro His His Leu Asp Leu  
 225 230 235 240

Ser His Asn Ser Leu Arg Ala Asp Thr Gln Arg Cys Ile Trp Pro Ser  
 245 250 255

Ala Leu Asn Ser Leu Asn Leu Ser Phe Thr Gly Leu Gln Gln Val Pro

ES 2 628 944 T3

260 265 270

Lys Gly Leu Pro Ala Lys Leu Asn Val Leu Asp Leu Ser Cys Asn Lys  
 275 280 285

Leu Asn Arg Ala Pro Gln Pro Gly Glu Leu Pro Lys Val Val Asn Leu  
 290 295 300

Ser Leu Asp Gly Asn Pro Phe Leu Val Pro Gly Ala Ser Lys Leu Gln  
 305 310 315 320

Glu Asp Leu Thr Asn Ser Gly Val Phe Pro Ala Cys Pro Pro Ser Pro  
 325 330 335

Leu Ala Met Gly Met Ser Gly Thr Leu Ala Leu Leu Gln Gly Ala Arg  
 340 345 350

Gly Phe Ile  
 355

<210> 3

<211> 351

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 3

Ser Pro Ala Pro Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Glu Glu Ser Cys Ser  
 1 5 10 15

Cys Asn Phe Ser Asp Pro Lys Pro Asp Trp Ser Ser Ala Phe Asn Cys  
 20 25 30

Leu Gly Ala Ala Asp Val Glu Leu Tyr Gly Gly Gly Arg Ser Leu Glu  
 35 40 45

Tyr Leu Leu Lys Arg Val Asp Thr Glu Ala Asp Leu Gly Gln Phe Thr  
 50 55 60

Asp Ile Ile Lys Ser Leu Ser Leu Lys Arg Leu Thr Val Arg Ala Ala  
 65 70 75 80

Arg Ile Pro Ser Arg Ile Leu Phe Gly Ala Leu Arg Val Leu Gly Ile  
 85 90 95

Ser Gly Leu Gln Glu Leu Thr Leu Glu Asn Leu Glu Val Thr Gly Thr  
 100 105 110

ES 2 628 944 T3

Ala Pro Pro Pro Leu Leu Glu Ala Thr Gly Pro Asp Leu Asn Ile Leu  
 115 120 125

Asn Leu Arg Asn Val Ser Trp Ala Thr Arg Asp Ala 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 Leu Asn Phe Ser Cys Glu Gln Val Arg Val Phe Pro Ala  
 165 170 175

Leu Ser Thr Leu Asp Leu Ser Asp Asn Pro Glu Leu Gly Glu Arg Gly  
 180 185 190

Leu Ile Ser Ala Leu Cys Pro Leu Lys Phe Pro Thr Leu Gln Val Leu  
 195 200 205

Ala Leu Arg Asn Ala Gly Met Glu Thr Pro Ser Gly Val Cys Ser Ala  
 210 215 220

Leu Ala Ala Ala Arg Val Gln Leu Gln Gly Leu Asp Leu Ser His Asn  
 225 230 235 240

Ser Leu Arg Asp Ala Ala Gly Ala Pro Ser Cys Asp Trp Pro Ser Gln  
 245 250 255

Leu Asn Ser Leu Asn Leu Ser Phe Thr Gly Leu Lys Gln Val Pro Lys  
 260 265 270

Gly Leu Pro Ala Lys Leu Ser Val Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Arg Leu  
 275 280 285

Asp Arg Asn Pro Ser Pro Asp Glu Leu Pro Gln Val Gly Asn Leu Ser  
 290 295 300

Leu Lys Gly Asn Pro Phe Leu Asp Ser Glu Ser His Ser Glu Lys Phe  
 305 310 315 320

Asn Ser Gly Val Val Thr Ala Gly Ala Pro Ser Ser Gln Ala Val Ala  
 325 330 335

Leu Ser Gly Thr Leu Ala Leu Leu Leu Gly Asp Arg Leu Phe Val  
 340 345 350

<210> 4

<211> 353

<212> PRT

ES 2 628 944 T3

<213> *Bos taurus*

<400> 4

Asp Thr Thr Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Asp Asp Phe Arg Cys Val  
 1 5 10 15

Cys Asn Phe Thr Asp Pro Lys Pro Asp Trp Ser Ser Ala Val Gln Cys  
 20 25 30

Met Val Ala Val Glu Val Glu Ile Ser Ala Gly Gly Arg Ser Leu Glu  
 35 40 45

Gln Phe Leu Lys Gly Ala Asp Thr Asn Pro Lys Gln Tyr Ala Asp Thr  
 50 55 60

Ile Lys Ala Leu Arg Val Arg Arg Leu Lys Leu Gly Ala Ala Gln Val  
 65 70 75 80

Pro Ala Gln Leu Leu Val Ala Val Leu Arg Ala Leu Gly Tyr Ser Arg  
 85 90 95

Leu Lys Glu Leu Thr Leu Glu Asp Leu Glu Val Thr Gly Pro Thr Pro  
 100 105 110

Pro Thr Pro Leu Glu Ala Ala Gly Pro Ala Leu Thr Thr Leu Ser Leu  
 115 120 125

Arg Asn Val Ser Trp Thr Thr Gly Gly Ala Trp Leu Gly Glu Leu Gln  
 130 135 140

Gln Trp Leu Lys Pro Gly Leu Arg Val Leu Asn Ile Ala Gln Ala His  
 145 150 155 160

Ser Leu Ala Phe Pro Cys Ala Gly Leu Ser Thr Phe Glu Ala Leu Thr  
 165 170 175

Thr Leu Asp Leu Ser Asp Asn Pro Ser Leu Gly Asp Ser Gly Leu Met  
 180 185 190

Ala Ala Leu Cys Pro Asn Lys Phe Pro Ala Leu Gln Tyr Leu Ala Leu  
 195 200 205

Arg Asn Ala Gly Met Glu Thr Pro Ser Gly Val Cys Ala Ala Leu Ala  
 210 215 220

ES 2 628 944 T3

Ala Ala Arg Val Gln Pro Gln Ser Leu Asp Leu Ser His Asn Ser Leu  
225 230 235 240

Arg Val Thr Ala Pro Gly Ala Thr Arg Cys Val Trp Pro Ser Ala Leu  
245 250 255

Arg Ser Leu Asn Leu Ser Phe Ala Gly Leu Glu Gln Val Pro Lys Gly  
260 265 270

Leu Pro Pro Lys Leu Ser Val Leu Asp Leu Ser Cys Asn Lys Leu Ser  
275 280 285

Arg Glu Pro Arg Arg Asp Glu Leu Pro Glu Val Asn Asp Leu Thr Leu  
290 295 300

Asp Gly Asn Pro Phe Leu Asp Pro Gly Ala Leu Gln His Gln Asn Asp  
305 310 315 320

Pro Met Ile Ser Gly Val Val Pro Ala Cys Ala Arg Ser Ala Leu Thr  
325 330 335

Met Gly Val Ser Gly Ala Leu Ala Leu Leu Gln Gly Ala Arg Gly Phe  
340 345 350

Ala

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sitios 40-59 de CD14 de conejo

<400> 5

Val Glu Met Trp Gly Gly Gly His Ser Leu Glu Gln Phe Leu Arg Gln  
1 5 10 15

Ala Asp Leu Tyr  
20

10 <210> 6

<211> 30

<212> PRT

ES 2 628 944 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sitios 1-30 de CD14 de conejo

<400> 6

Ser Thr Asp Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Asp Asp Ile Arg  
1 5 10 15

Cys Val Cys Asn Phe Ser Asp Pro Gln Pro Asp Trp Ser Ser  
20 25 30

5

**REIVINDICACIONES**

1. Método para evaluar la función de un fagocito que comprende las etapas de
  - (i) poner un fagocito en contacto con una sustancia que va a envolverse por el fagocito,
  - (ii) medir sCD14-ST producida por el fagocito, y
  - 5 (iii) comparar el valor medido con un valor de patrón para determinar la presencia y/o el grado de la actividad fagocítica del fagocito.
  
2. Método *in vitro* para detectar una enfermedad asociada con la disfunción fagocítica mediante la evaluación de la función de un fagocito, en el que la enfermedad es uremia, disminución de la actividad de opsonina sérica, deficiencia de complemento, disfunción de fagocitosis congénita, enfermedad granulomatosa crónica, defecto de mieloperoxidasa, leucemia, linfoma maligno, endocarditis bacteriana, diabetes o cirrosis hepática, y en el que el método comprende las etapas de
  - (i) evaluar la función de un fagocito extraído de un sujeto mediante el método según la reivindicación 1,
  - (ii) comparar el resultado de la evaluación con un valor normal, y
  - 15 (iii) determinar la presencia y/o intensidad de la enfermedad basándose en si la función del fagocito del sujeto es superior o inferior al valor normal.
  
3. Método *in vitro* para evaluar la disfunción de la respuesta inmunitaria mediante la evaluación de la función de un fagocito, que comprende las etapas de
  - (i) evaluar la función de un fagocito extraído de un sujeto mediante el método según la reivindicación 1,
  - (ii) comparar el resultado de la evaluación con un valor normal, y
  - 20 (iii) determinar el grado de la disfunción de la respuesta inmunitaria basándose en si la función del fagocito del sujeto es superior o inferior al valor normal.
  
4. Método *in vitro* para evaluar el efecto de un fármaco mediante la evaluación de la función de un fagocito, que comprende las etapas de
  - (i) evaluar la función de un fagocito extraído de un sujeto durante y/o tras la administración de fármaco mediante el método según la reivindicación 1,
  - 25 (ii) comparar el resultado de la evaluación con un valor normal y/o el resultado de la evaluación antes de la administración de fármaco evaluado mediante el método según la reivindicación 1, y
  - (iii) determinar la presencia y/o el grado del cambio en la función del fagocito del sujeto mediante la administración de fármaco.
  
- 30 5. Método para seleccionar una sustancia que puede regular la función de fagocitosis, que comprende las etapas de
  - (i) poner un fagocito en contacto con un analito,
  - (ii) medir sCD14-ST producida por el fagocito, y
  - (iii) evaluar el efecto del analito sobre la actividad fagocítica del fagocito.
  
- 35 6. Método según la reivindicación 5, en el que dicho fagocito y dicho analito se ponen en contacto en presencia de una sustancia que va a envolverse por el fagocito.
  
7. Método *in vitro* para detectar una enfermedad asociada con fagocitosis mediante un fagocito, en el que la enfermedad es
  - 40 (1) una enfermedad autoinmunitaria, artritis reumatoide, mastitis, gota, glomerulonefritis, colitis ulcerosa, fiebre mediterránea, otitis media, rinitis, neumonía, tuberculosis, cistitis, infección del líquido amniótico o piosemia; o
  - (2) inflamación de las articulaciones, osteoartritis o periartitis escapulohumeral;
 y en el que el método comprende las etapas de
  - (i) medir la cantidad de sCD14-ST en una muestra (que no es sangre) extraída del donante,

(ii) comparar el resultado de la evaluación con un valor normal, y

(iii) determinar si la cantidad de la sCD14-ST en la muestra es superior al valor normal.

8. Método según la reivindicación 7, en el que dicha sCD14-ST se mide tras añadir una sustancia que va a envolverse a la muestra.

5 9. Método según la reivindicación 7 u 8, en el que dicha enfermedad asociada con fagocitosis por el fagocito es artritis reumatoide, y dicha muestra es un líquido sinovial.

10. Método según la reivindicación 7 u 8, en el que dicha enfermedad asociada con fagocitosis por el fagocito es mastitis, y dicha muestra es leche.

11. Uso de un marcador que contiene sCD14-ST para evaluar la función de un fagocito.

10

FIG. 1

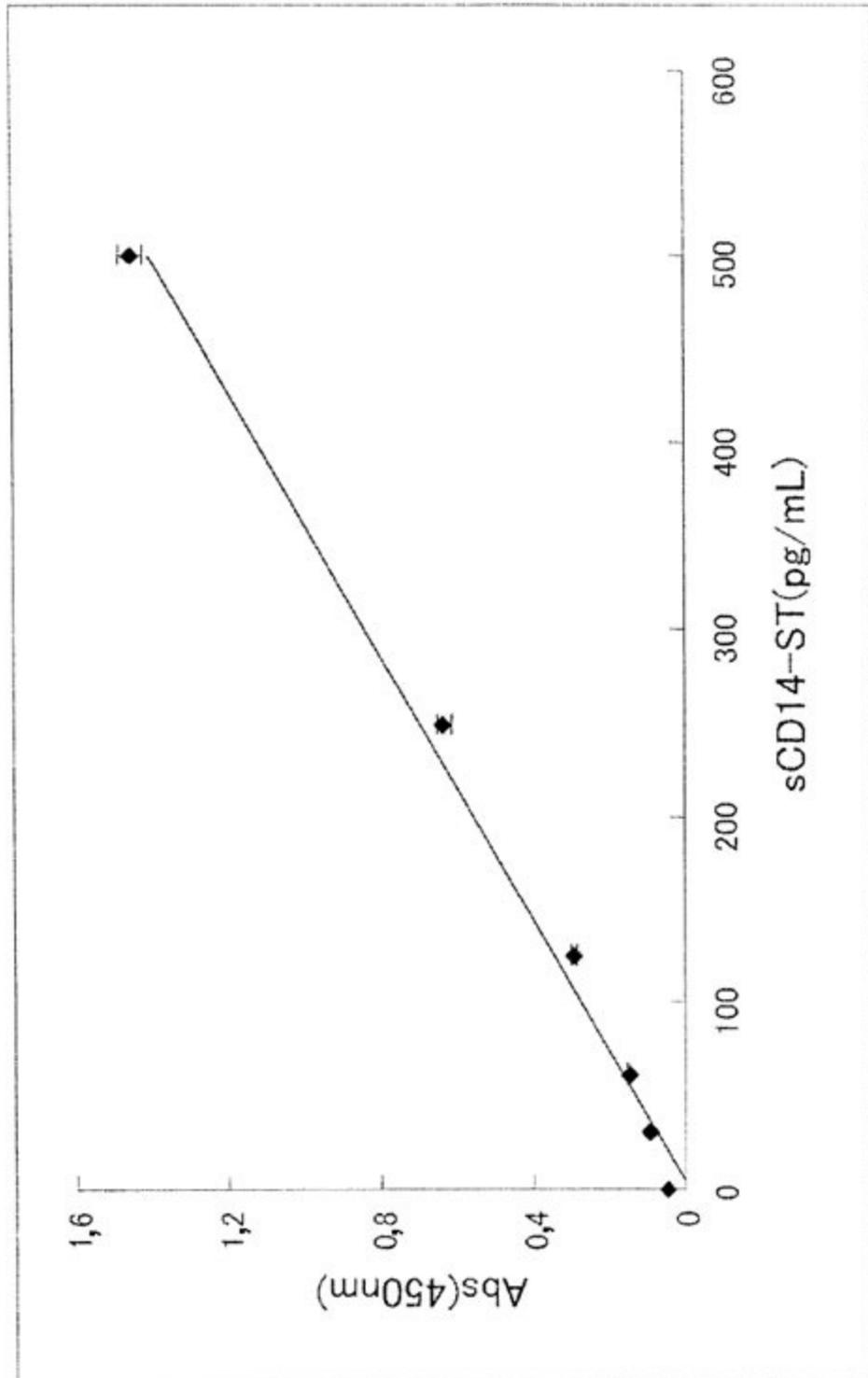


FIG. 2

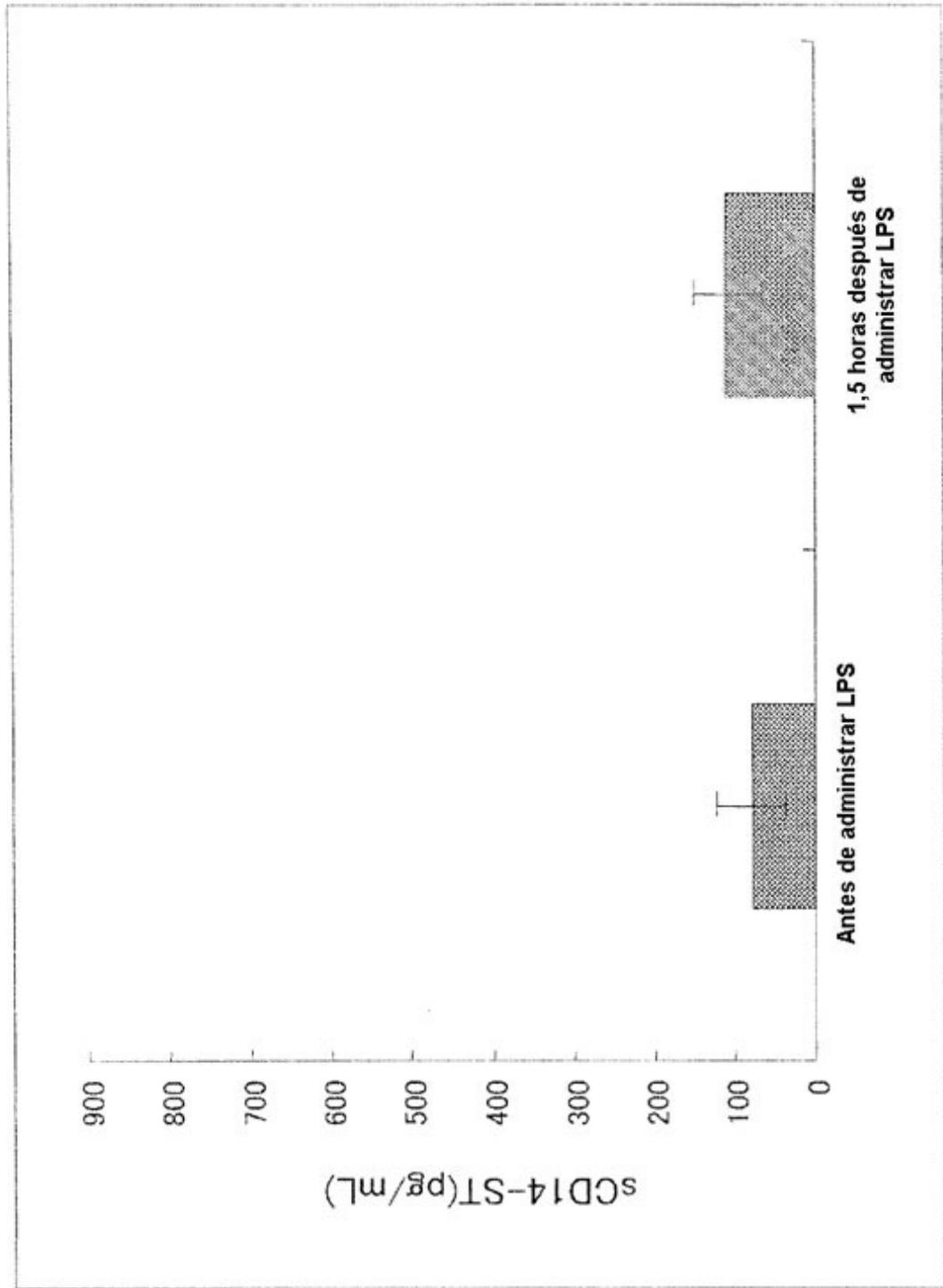


FIG. 3

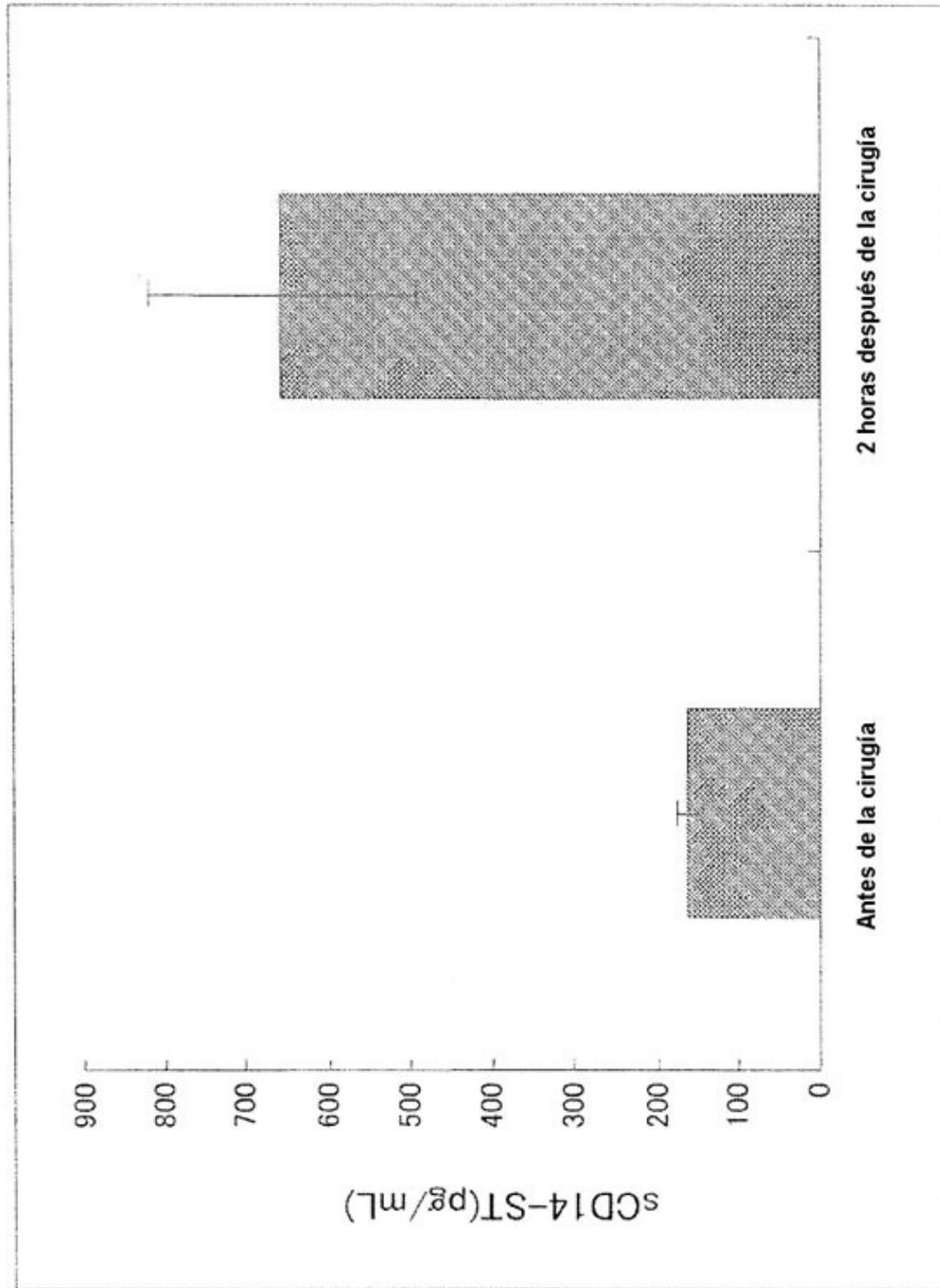


FIG. 4

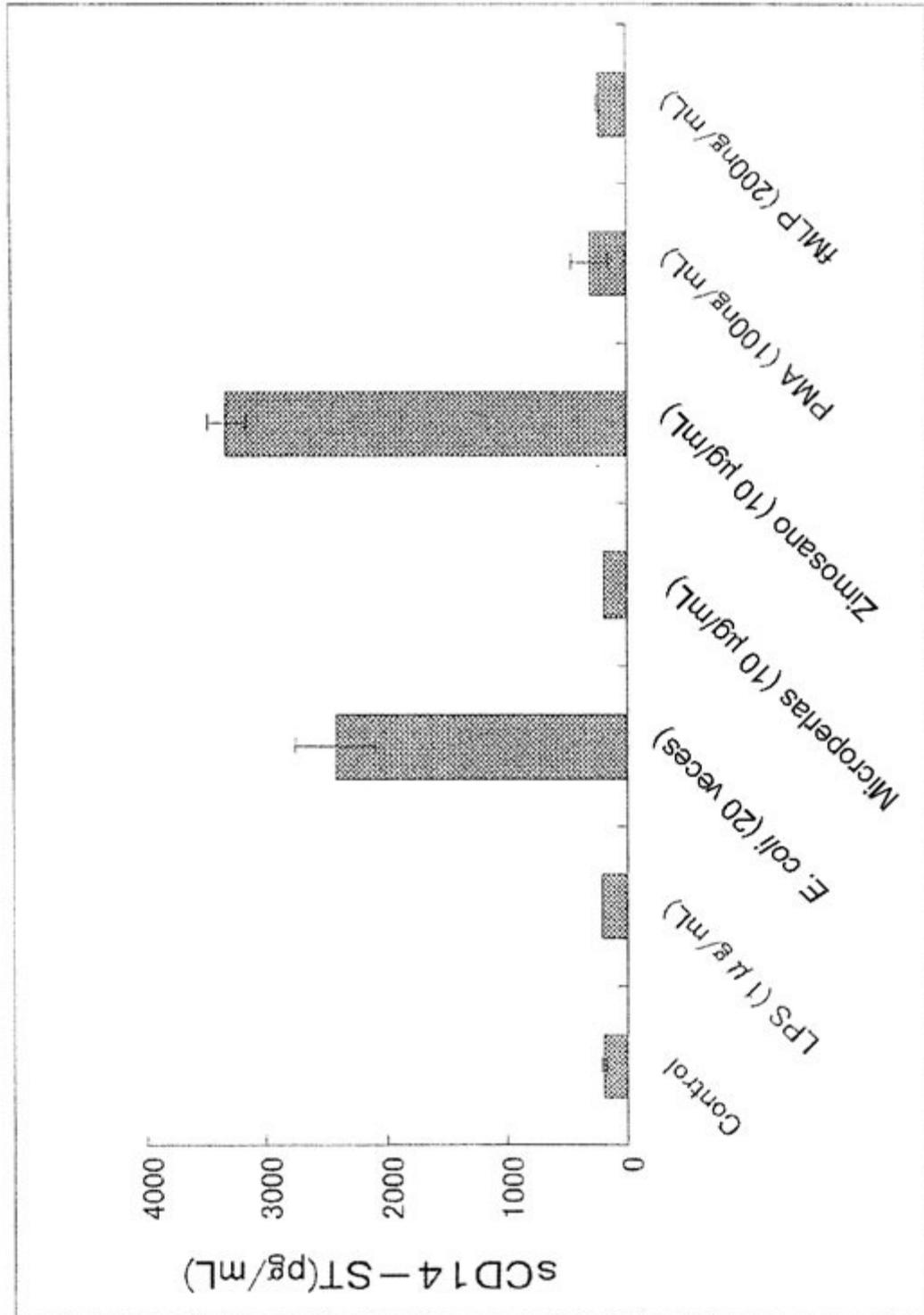


FIG. 5

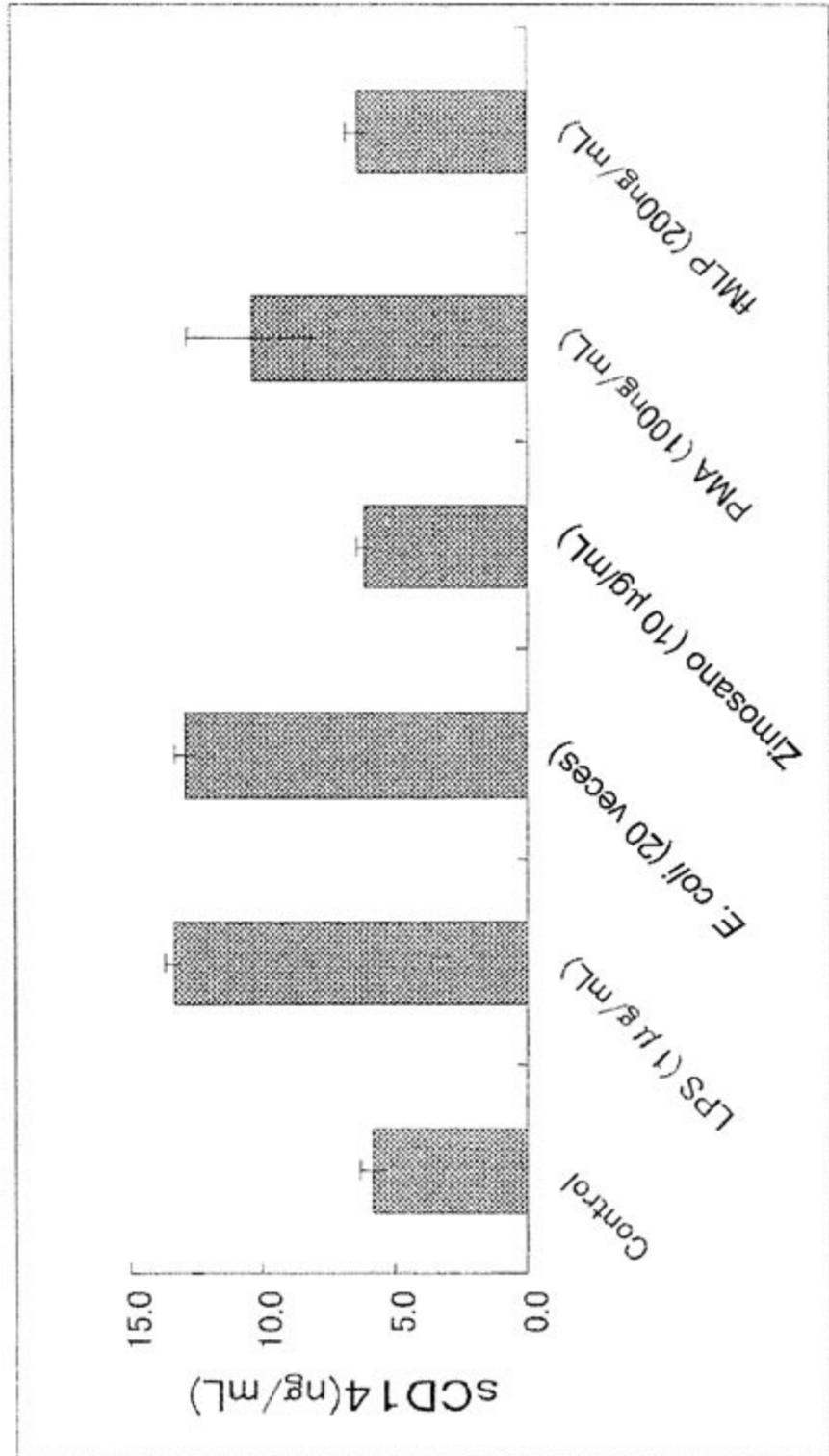


FIG. 6

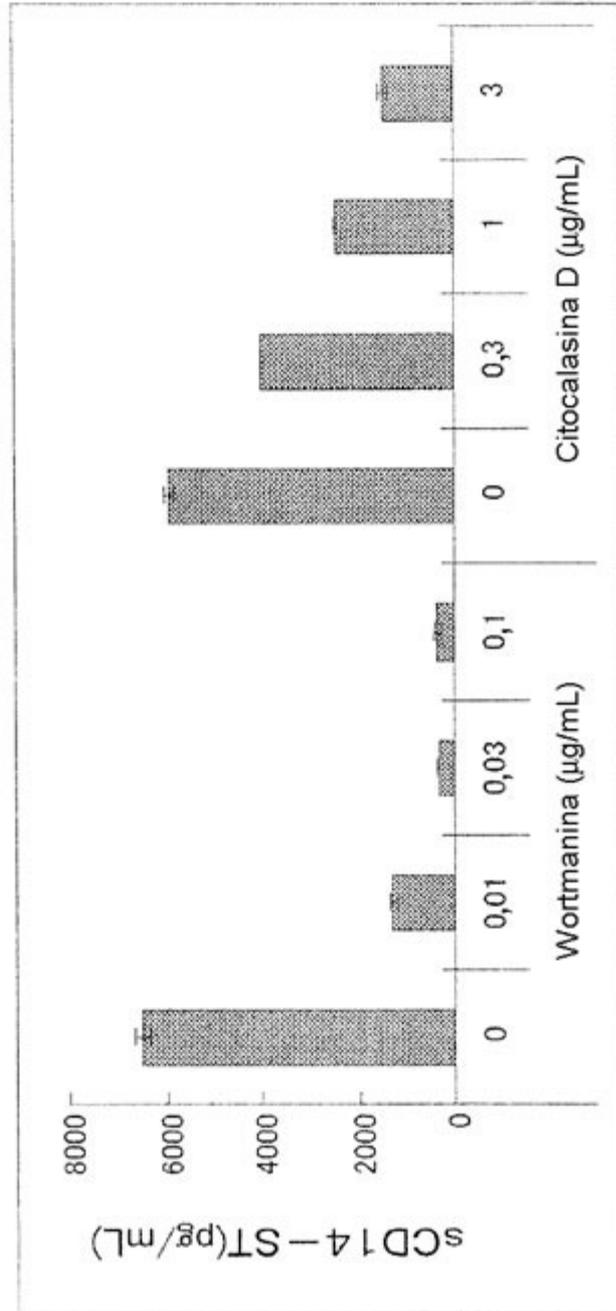


FIG. 7

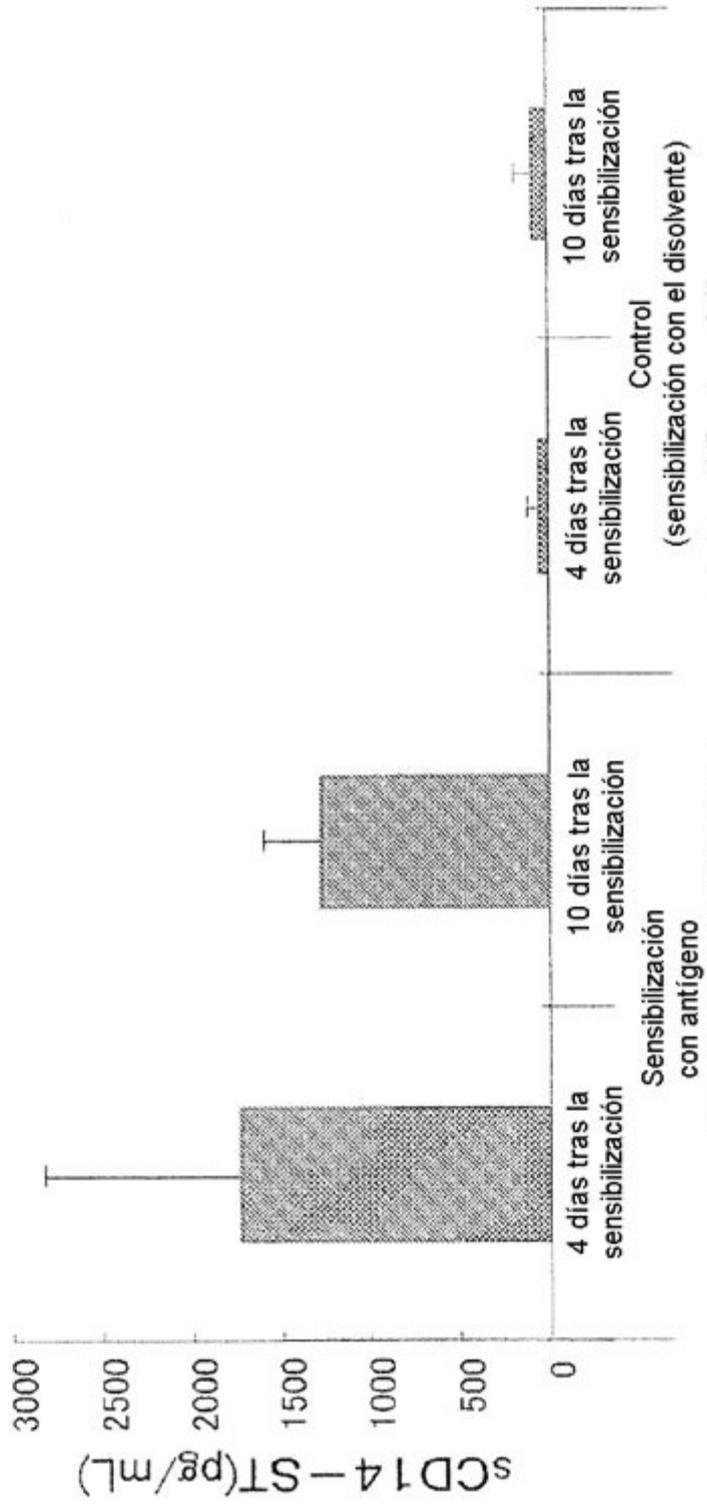


FIG. 8

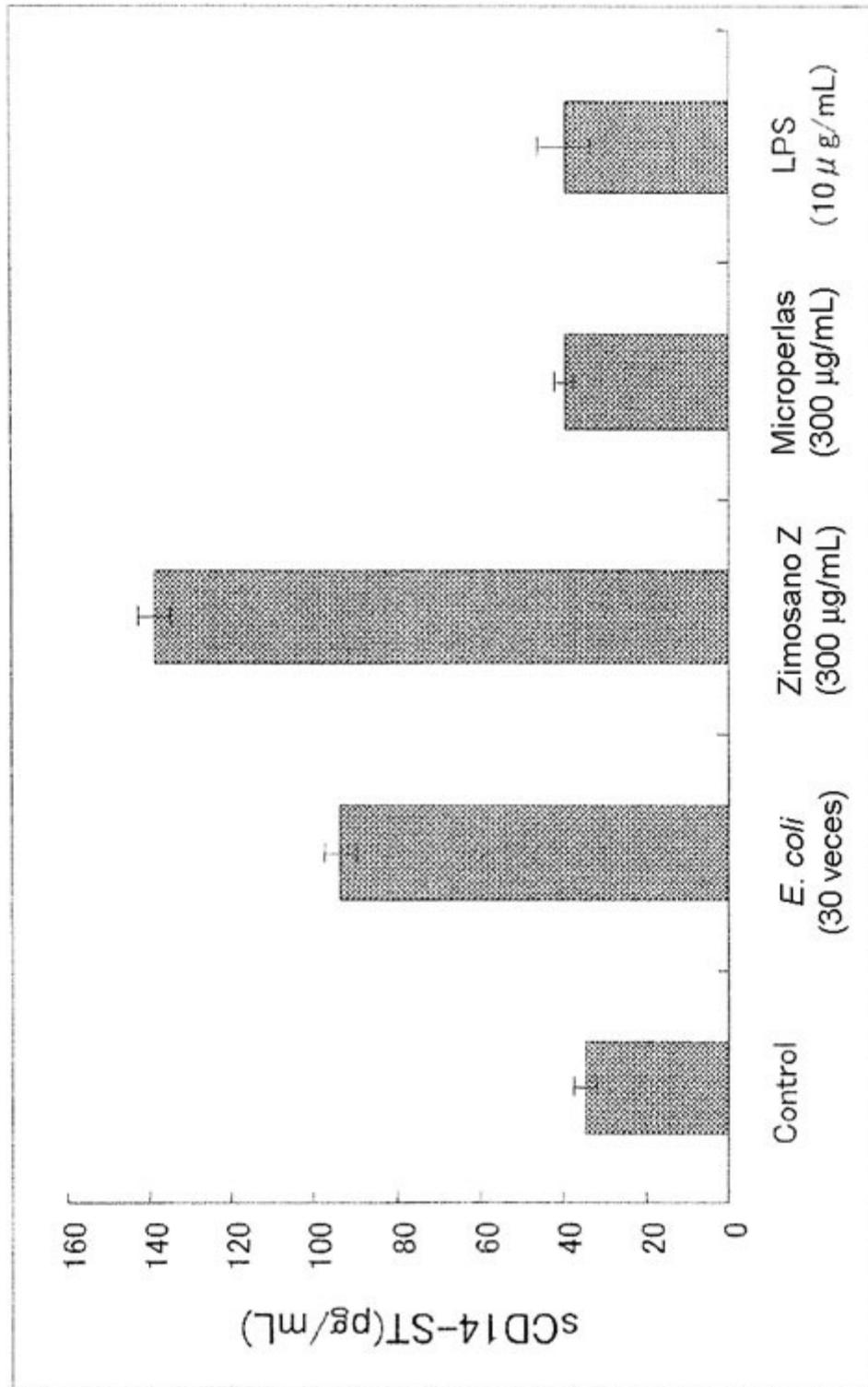


FIG. 9

