

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 880 225**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2015** **E 19188513 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.04.2021** **EP 3628731**

54 Título: **Novedoso anticuerpo anti-presepsina**

30 Prioridad:

26.02.2014 US 201461944674 P

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

24.11.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SHIRAKAWA, KAMON

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 880 225 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

Novedoso anticuerpo anti-presepsina

Campo de invención

- 5 La presente invención se refiere a anticuerpos anti-presepsina o fragmentos de un anticuerpo de unión a antígeno de los mismos, que son útiles para medir la presepsina en una muestra.

Antecedentes de la invención

- 10 La CD14 es una glicoproteína conocida expresada en la superficie de la membrana de las células monocíticas y funciona como un receptor de LPS (lipopolisacárido). Hay 2 formas de moléculas CD14. Una es la forma unida a la membrana de CD14 (mCD14) expresada en la superficie celular. Otra forma es CD14 soluble (sCD14). Las sCD14 que tienen un peso molecular de aproximadamente 55 kDa y aproximadamente 49 kDa (en adelante, denominadas "sCD14 de alto peso molecular") son conocidas en la técnica y se reporta que estas sCD14 muestran un alto nivel en la sangre de un paciente con muchas enfermedades como sepsis, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) y lupus eritematoso sistémico (LES). Por esa razón, estos sCD14 de alto peso molecular no se consideran marcadores específicos de la enfermedad. Véanse los documentos no Patente 1 y 2.

Por otro lado, se ha reportado de que existe una nueva especie molecular de sCD14, sCD14-ST (subtipo de antígeno CD14 soluble, también denominado presepsina), cuya concentración en sangre se incrementa de forma característica en pacientes con sepsis.

- 20 La sCD14-ST (presepsina) se caracteriza por migrar a 13 ± 2 kDa del peso molecular en SDS-PAGE en condiciones no reductoras de todas las sCD14, y comprende la región N-terminal de CD14. sCD14-ST (presepsina) tiene una secuencia de aminoácidos en la que la región C-terminal se elimina en gran medida en comparación con las secuencias de aminoácidos de sCD14 de alto peso molecular y, a diferencia de la sCD14 de alto peso molecular, la sCD14-ST (presepsina) no tiene capacidad de unión a LPS. Además, la presepsina muestra una inmunogenicidad diferente a la del sCD14 de alto peso molecular y, por tanto, las moléculas pueden distinguirse utilizando el anticuerpo. La concentración sanguínea de presepsina aumenta específicamente en pacientes con sepsis (véase el Documento de Patente 1). Además, se informa que la concentración sanguínea de presepsina muestra un nivel más alto en la sangre de los pacientes con sepsis en comparación con los pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), que es difícil de diferenciar de la sepsis. Por tanto, la presepsina se considera un marcador de diagnóstico específico de sepsis (véase el Documento no Patente 3).

Se han divulgado un anticuerpo policlonal derivado de conejo (anticuerpo S68) y un anticuerpo monoclonal derivado de rata (F1146-17-2), que reconocían específicamente la presepsina (véanse los Documentos de Patente 1 y 2).

- 35 En la actualidad, un sistema de medición que utiliza un anticuerpo policlonal derivado de conejo como anticuerpo específico de presepsina se utiliza prácticamente en la medición de presepsina, y los kits de medición para llevar a cabo el sistema de medición se encuentran en el mercado en Europa y Japón (PATHFAST™ Presepsin, Mitsubishi Chemical Medience Corporation).

Se ha intentado la adquisición de un anticuerpo monoclonal anti-presepsina humana que se pueda usar en la práctica, pero no se ha obtenido un anticuerpo que tenga un rendimiento satisfactorio.

Documentos de técnica antecedente

- 40 Documentos de Patente

Documento de Patente 1: WO 2005/108429

Documento de Patente 2: WO 2004/044005

- 45 Documento no Patente 1: Hayashi, et al., Infection and Immunity, 67: 417-420, 1999
Documento no Patente 2: Lawn, et al., Clinical & Experimental Immunology, 120: 483-487, 2000
Documento no Patente 3: Yaegashi, et al., Journal of Infection and Chemotherapy, 11: 234-238, 2005

Sumario de la invención**Problema para resolver por la invención**

- 50 El objeto de la invención es proporcionar un nuevo anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo, que sea excelente en reactividad con presepsina y adecuado para medir presepsina en una muestra.

Además, otro objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo, que proporciona un valor de medición de presepsina que se correlaciona favorablemente con el valor de medición del anticuerpo S68 (anticuerpo policlonal obtenido por la inmunización de un conejo usando el péptido S68 descrito en el Ejemplo 1 del Documento WO 2004/044005).

Además, otro objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo, que proporciona un valor de medición de presepsina y que no se ve afectado por la influencia de una sustancia interferente (por ejemplo, triglicéridos) en una muestra, y puede hacer posible medir la presepsina con alta precisión incluso en el caso de una muestra que tenga una variedad de factores de fondo.

Medios para resolver el problema

Como se proporciona en el presente documento, se obtuvieron una pluralidad de anticuerpos monoclonales a partir de una pluralidad de hibridomas obtenidos inmunizando un conejo con el péptido S68 mediante una pluralidad de etapas de selección, tales como actividad de unión con el péptido S68 y actividad de unión con presepsina. Se construyó un sistema ELISA para medir la presepsina. Como resultado de investigar la reactividad con presepsina, se obtuvieron anticuerpos, donde la reactividad del anticuerpo con presepsina mejoró en aproximadamente 10000 veces en comparación con un sistema ELISA usando F1146-17-2 (anticuerpo monoclonal obtenido por la inmunización de una rata con el péptido S68 descrito en el Ejemplo 2 del documento WO 2004/044005 A1). La secuencia de aminoácidos de la parte CDR de la región variable F1146-17-2 se describe en SEQ ID NO: 42 a SEQ ID NO: 47.

Se midieron los niveles de presepsina en la sangre de varios pacientes con sepsis en el sistema ELISA usando cada uno de estos anticuerpos monoclonales de conejo, y se realizó el análisis de correlación con los valores de medición mediante el sistema ELISA usando el anticuerpo S68. Como resultado, se determinó que algunos anticuerpos mostraban una alta correlación y algunos anticuerpos mostraban una baja correlación. Además, se determinó que la interferencia de los triglicéridos (TG) en una muestra puede estar involucrada en la diferencia en los valores de correlación. Con el fin de obtener un anticuerpo que se correlacione favorablemente con el valor de medición de presepsina del anticuerpo S68, que resista la interferencia de TG en una muestra, y que sea adecuado para la medición de presepsina en una muestra, se continuó la investigación y se determinó que se genera una diferencia en el rendimiento de un anticuerpo dependiendo del epítipo que es reconocido por el anticuerpo. En otras palabras, se determinó que la diferencia se produce por la interferencia de los triglicéridos (también denominados TG) en una muestra y/o el epítipo.

Se determinó que un anticuerpo que muestra un rendimiento preferible en la medición de presepsina reconoce una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 (krvdadpr; o la región correspondiente a la Posición 52 a la Posición 61 en la Secuencia No. 3 (longitud completa humana CD14 soluble)). Este es un novedoso epítipo que fue descubierto por primera vez por la presente invención.

Un anticuerpo que reconoce esta secuencia de P03 como un epítipo se inhibió competitivamente en una reacción entre el anticuerpo y la presepsina en un 50 % o más mediante una secuencia de residuos de aminoácidos que constaba de la secuencia de P03. Por otro lado, la inhibición de la competencia para una reacción entre el anticuerpo y la presepsina por cada secuencia de residuos de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 35 a SEQ ID NO: 41 fue inferior al 20 %, lo que significa que la inhibición de la competición por un residuo de la secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 36 (correspondiente a la Posición 49 a la Posición 58 de CD14 soluble de longitud completa humana: también denominada secuencia P02), una secuencia de residuos de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 37 (correspondiente a la Posición 55 a la Posición 64 de CD14 soluble humana de longitud completa: también denominada secuencia P04), o una secuencia de residuos de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 38 (correspondiente a la Posición 58 a la Posición 67 de CD14 soluble humana de longitud completa: también denominada secuencia P05) fue inferior al 20 %. Por tanto, se determinó que un anticuerpo que reconoce la secuencia P03 como un epítipo tiene una alta especificidad por la secuencia P03.

Al mismo tiempo, también se observó que, entre los anticuerpos obtenidos de hibridomas, los anticuerpos que reconocen la secuencia P04 y la secuencia P05 en presepsina no son adecuados para la medición de presepsina, ya que estos anticuerpos son susceptibles a la interferencia de TG en una muestra en el momento de la medición de presepsina, y así sucesivamente. De esta manera, fue inesperado que una ligera diferencia en la posición del epítipo reconocido por un anticuerpo influyera en el rendimiento del anticuerpo.

Además, en una secuencia de residuos de aminoácidos en la que el ácido aspártico de la posición 8 de la secuencia P03 (SEQ ID NO: 1) está sustituido con alanina, la inhibición de la competencia para una reacción entre el anticuerpo y la presepsina fue inferior al 20 %. Por otro lado, se descubrió que una secuencia de residuos de aminoácidos en la que cualquiera de los aminoácidos de la posición 2 a la posición 7, la posición 9 y la posición 10 de la secuencia P03 (SEQ ID NO: 1) están sustituidos con alanina (o glicina) inhibe competitivamente una reacción entre el anticuerpo y la presepsina en un 50 % o más.

Además, con el fin de preparar un anticuerpo que tenga un rendimiento preferible para la medición de presepsina, se realizaron alteraciones de las secuencias de CDR basándose en secuencias de anticuerpos que reconocen la secuencia de P03 como un epítipo. Además, los anticuerpos se prepararon utilizando un procedimiento de

presentación en fagos. Los anticuerpos resultantes se seleccionaron con base en un estándar para obtener anticuerpos que son iguales o tienen mejor desempeño que los anticuerpos obtenidos de hibridomas.

5 Se obtuvieron anticuerpos que reconocen la secuencia P03 como un epítipo, que se obtuvieron a partir de hibridomas, y se obtuvieron anticuerpos alterados seleccionados y se confirmó que tienen una afinidad extremadamente alta por la presepsina y resisten la influencia de una sustancia interferente (particularmente, triglicéridos) en una muestra. Estos anticuerpos se correlacionan favorablemente con un sistema de medición que utiliza el anticuerpo S68. Estos anticuerpos son adecuados para la medición de presepsina en una muestra, por ejemplo, en un ensayo ELISA sándwich para la medición de presepsina.

10 La presente invención se describe a continuación.

1. Un anticuerpo anti-presepsina o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o el fragmento reconoce específicamente un epítipo que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo puede comprender:

- 15 (i) la región de determinación de complementariedad (CDR)1 de la región variable de la cadena pesada (VH) que consiste en la secuencia $X_1X_2X_3MX_4$;
- (ii) VH CDR2 que consiste en la secuencia $IX_5X_6X_7X_8YAX_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}$; y
- (iii) VH CDR3 que consiste en la secuencia $X_{14}X_{15}X_{16}$; y
- (iv) CDR1 de la región variable de la Cadena liviana (VL) que consiste en la secuencia $X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$;
- 20 (v) VH CDR2 que consiste en la secuencia $KX_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}S$; y
- (vi) VH CDR3 que consiste en la secuencia $X_{30}X_{31}X_{32}Y X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}$,

en la que X_1 a X_{37} son una o más secuencias de aminoácidos definidas en la Tabla 1 a la Tabla 6 a continuación.

Tabla 1

VH CDR1					
Secuencia básica	X1			X2	X3
Opción	R,S,A,M,P,V,I,D,E,H,T, Q,Y,G,K,N,W,L,F o C			Y o F	T, A o W

Tabla 2

VH CDR2												
Secuencia básica	I	X5	X6			X7	X8	Y	A	X9	X10	X11
Opción		I o V	NSGA, YRNIK, ANSGA, SSDGG, SDIDQ, o SDIDD			T, I o L	Y, V o F			S o T	W o A	A o G

Tabla 3

VH CDR3			
Secuencia básica	X14	X15	X16
Opción	G, A, L o S	D,F,S,P,H,I,N,R,V,G o L	F,A,S,P,H,D,I,N,R,L,E o H

Tabla 4

VL CDR1								
Secuencia básica	X17	X18	X19	X20	X21	X22	X23	X24
Opción	Q o A	A o G	S o A	QS, ED, o QN	I o A	GSN, ISN, GSD o SNY,	L o A	A o S

30

Tabla 5

VL CDR2							
Secuencia básica	K	X25	X26	X27	X28	X29	S
Opción		A o T	S o A	K o T	L o A	A o E	

Tabla 6

VL CDR3									
Secuencia básica	X30	X31	X32	Y	X33	X34	X35	X36	X37
Opción	Q o A	C o S	S o T		T o Y	AIGNY, ESTTF, AIGNAY o RSTTTY	G o A	H o N	V, A o T

- 5 En tal anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo, X₁ puede ser R, S, A, M, P, V, I, D, E, H, T, Q, Y, G, K, N o W.

En dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo, el anticuerpo o su fragmento de anticuerpo de unión a antígeno puede comprender VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3, y VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3, en el que VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 se seleccionan de las secuencias de aminoácidos descritas en la Tabla 7, y VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 se seleccionan de las secuencias de aminoácidos descritas en la Tabla 8.

10

Tabla 7

V _H		
CDR1	CDR2	CDR3
RYAMG	IANSYGATYYASWAKG	GDF
RYTMG	IINSYGATYYASAAKG	GGL
SFWMS	IINSYGATYYASWAAG	ADF
SYTMG	IINSYGATYYASWAKA	GDA
AYTMG	IINSYGATYYASWGKG	LDF
MYTMG	IYRNIGKTYATWAKG	SDF
PYTMG	IINSYGATYYASWAKG	GFF
VYTMG	IVSSDGGIYYASWAKG	GSF
IYTMG	IISDIDQIVYATWAKG	GPF
DYTMG	IISDIDDLFYASWAKG	GHF
EYTMG		GIF
HYTMG		GNF
TYTMG		GRF
QYTMG		GDS
YYTMG		GDP
GYTMG		GDH
KYTMG		GDD
NYTMG		GDI
WYTMG		GDN
		GDR
		GVL

(continuación)

CDR1	CDR2	CDR3
		GGE
		GLH

Tabla 8

V _L		
CDR1	CDR2	CDR3
QASEDIISNLA	KASTLAS	QSSYTESTTFGHV
QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
QASQSAGSNLA	KTSTLES	QCSYTAIGNAYGHV
QASQISNYLA	KASKAAS	QCSYTAIGNYGHV
QAAQSIGSNLA	KAASLAS	QCSYTAIGNYAHV
QGSQSIGSNLA		ACSYTAIGNYGHV
QASQSIGSNAA		QSTYYRSTTTYGNT
AASQSIGSNLA		
QASQNIIGSDLS		

5

5. En tal anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo, el anticuerpo o su fragmento de anticuerpo de unión a antígeno puede comprender VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3, y VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3, en el que VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 y VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 se seleccionan de las secuencias de aminoácidos descritas en la Tabla 9-1, Tabla 9-2 y Tabla 9-3.

10

Tabla 9-1

Anticuerpo	V _H			V _L		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
5810	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYT AIGNYGHV
5844	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNAYGHV
5858	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSAGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5875	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KTSTLES	QCSYTAIGNYGHV
5878	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQISNYLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5807	RYTMG	IINSGATYYASAAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5808	RYTMG	IINSGATYYASWAAG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5809	RYTMG	IINSGATYYASWAKA	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5812	RYTMG	IINSGATYYASWGKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5842	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5843	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYAHV
5859	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QAAQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5860	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QGSQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV

(continuación)

Anticuerpo	V _H			V _L		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
5861	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5862	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKAAS	QCSYTAIGNYGHV
5863	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KAASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5864	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNAA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5865	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	AASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5784	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	ADF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5793	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDA	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5795	RYAMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV

Tabla 9-2

5803	SYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5826	RYTMG	IIRNIKTYYATWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5811	AYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5874	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QSSYTESTTFGHV
5684	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASEDIISNLA	KASTLAS	QSSYTESTTFGHV
5877	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASTLAS	QCSYTAIGNYGHV
5884	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASEDIISNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5920	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	LDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5926	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	SDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5932	MYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5933	PYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5934	VYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5935	IYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5937	DYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5938	EYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5939	HYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5940	TYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5941	QYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5942	YYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5943	GYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5944	KYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5945	NYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5946	WYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5976	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GFF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV

Tabla 9-3

5977	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GSF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5978	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GPF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5979	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GHF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5980	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GIF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5981	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GNF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5982	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GRF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5983	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDS	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5984	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDP	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5985	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDH	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5986	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDD	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5987	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDI	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5988	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDN	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5989	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDR	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
6026	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GVL	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
6028	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GGE	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
6029	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GLH	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5824	RYTMG	IVSSDGGIYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5827	RYTMG	IISDIDQIVYATWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5841	RYTMG	IISDIDDLFYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
5910	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQNIIGSDLS	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
F1466-5	RYAMG	IIRYNIKTYATWAKG	GDF	QASEDIISNLA	KASTLAS	QSSYTESTTTFGHV
F1466-26	RYTMG	IINSGATYYASWAKG	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAIGNYGHV
F1466-16	SFWMS	IISDIDDLFYASWAKG	GGL	QASQSISNYLA	KTSTLES	QSTYYRSTTTYGNT

En tal anticuerpo anti-presepsina o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo, el anticuerpo o el fragmento puede comprender:

(a) VH que comprende VH CDR1 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 7, VH CDR2 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 97 y VH CDR3 que consiste en la secuencia GDF, y VL que comprende VL CDR1 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 22, VL CDR2 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 23 y VL CDR3 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 24; o

(b) VH que comprende VH CDR1 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 7, VH CDR2 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 8 y VH CDR3 que consiste en la secuencia GDA, y VL que comprende VL CDR1 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 22, VL CDR2 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 23 y VL CDR3 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 24.

En tal anticuerpo anti-presepsina o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo, el anticuerpo o el fragmento puede comprender:

(a) VH que comprende VH CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, VH CDR2 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y VH CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos GDF, y VL que comprende VL CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19, VL CDR2 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y VL CDR3 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21;

(b) VH que comprende VH CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, VH CDR2 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 y VH CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos GDF, y VL que comprende VL CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, VL CDR2 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23 y VL CDR3 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24; o

(c) VH que comprende VH CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, VH CDR2 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 y VH CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos GGL, y VL que comprende VL CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25, VL CDR2 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 y VL CDR3 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27.

2. El anticuerpo o su fragmento de anticuerpo de unión a antígeno según 1 anterior, en el que el anticuerpo o el fragmento se une a la presepsina en menos de 10^{-8} M de afinidad (KD).

3. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo de acuerdo con 1 o 2 anteriores, que se produce usando un péptido de acuerdo con SEQ ID NO: 2 como antígeno de administración.

4. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de 1 a 3 anteriores, en el que el fragmento de anticuerpo de unión a antígeno es un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno seleccionado del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂, anticuerpo monocatenario (scFv), región V dimerizada (diacuerpo), región V estabilizada con disulfuro (dsFv), sc(Fv)₂, un polipéptido que comprende CDR, un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada y un polipéptido que comprende una región variable de cadena liviana.

Efecto de la invención

Según la presente invención, se proporcionan un anticuerpo y un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo que es excelente en reactividad con presepsina y adecuado para medir presepsina en una muestra, por lo que se puede lograr una mejora de la calidad y precisión de la medición de presepsina. La presente invención proporciona la capacidad de proporcionar anticuerpos que tienen una alta afinidad por la presepsina que también son adaptables para la cuantificación de una cantidad menor de presepsina al nivel de una persona normal y permite una mejora de la sensibilidad. Además, la presente invención proporciona la capacidad de proporcionar un anticuerpo que resiste la influencia de una sustancia interferente en una muestra, lo que permite la medición en un sistema ELISA sándwich para evitar la influencia de la diferencia individual (factor de fondo del sujeto) de una muestra de suero y producir mediciones con alta precisión. Tales mediciones, que tienen una alta especificidad, solo son posibles con un anticuerpo que se une específicamente solo a la presepsina, y no se une específicamente a la sCD14 de alto peso molecular, en el sistema ELISA tipo sándwich.

Los problemas relacionados con la medición de presepsina usando anticuerpos policlonales (incluido el aseguramiento de la homogeneidad entre lotes, la dificultad de producción y el coste) pueden resolverse, por lo que se puede proporcionar un anticuerpo que sea excelente en practicidad. En otras palabras, un anticuerpo monoclonal tiene la ventaja de que se puede producir a bajo coste, de forma estable y eficaz, y se puede mantener la calidad uniforme de dicho anticuerpo.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra los resultados de una serie de pruebas de interferencia de TG en suero sanguíneo de un ser humano normal, usando anticuerpo de F1466-26 (A), F1466-5 (B) y F1466-19 (C).

La **Figura 2** es la lista de variantes obtenida en el ejemplo 8 y el ejemplo 12.

La **Figura 2-1** es la lista de variantes obtenida en el ejemplo 8 y el ejemplo 12 y es la continuación de la Figura 2.

La **Figura 2-2** es la lista de variantes obtenida en el ejemplo 8 y el ejemplo 12 y continúa de la Figura 2-1.

Realización para llevar a cabo la invención

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

1. Un anticuerpo anti-presepsina o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o el fragmento reconoce específicamente un epítipo que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-presepsina o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o el fragmento reconoce específicamente una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 como un novedoso epítipo de presepsina.

La expresión "reconoce específicamente un epítipo que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1" indica que el anticuerpo reconoce específicamente, como un epítipo, una secuencia correspondiente a una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 entre las secuencias de presepsina.

- 5 Como se usa en este documento, la expresión "fragmento de anticuerpo de unión a antígeno" indica, entre los fragmentos parciales de un anticuerpo que reconoce específicamente un epítipo que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, un fragmento que tiene la misma propiedad de unión a antígeno como el anticuerpo original.

10 Como se usa en este documento, "identidad de secuencia" u "homología de secuencia" se refiere a una relación entre dos o más secuencias de polinucleótidos o secuencias de aminoácidos, es decir, una secuencia de referencia y una secuencia dada para comparar con la secuencia de referencia. La identidad u homología de secuencia se determina comparando la secuencia dada con la secuencia de referencia después de que las secuencias se hayan alineado de manera óptima para producir el grado más alto de similitud de secuencia, según lo determinado por la coincidencia entre cadenas de tales secuencias. Tras tal alineación, la identidad de secuencia se determina posición por posición, por ejemplo, las secuencias son "idénticas" en una posición particular si en esa posición, los nucleótidos o los residuos son idénticos. El número total de tales identidades de posición se divide luego por el número total de nucleótidos o residuos en la secuencia de referencia para dar el % de identidad de secuencia. La identidad de secuencia se puede calcular fácilmente mediante procedimientos conocidos, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk A. N., ed., Oxford University Press, Nueva York (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith D. W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I, GrifEn A. M., and GrifEn H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov M. and Devereux J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); y Carillo H., and Lipman D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988). Los procedimientos preferidos para determinar la identidad de secuencia están diseñados para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias probadas. Los procedimientos para determinar la identidad de secuencia se codifican en programas informáticos disponibles públicamente que determinan la identidad de secuencia entre secuencias dadas. Ejemplos de tales programas incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programas GCG (Devereux et al., Nuc. Ac. Res., 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul et al, J. Molec. Biol, 215: 403-410 (1990)). El programa BLASTX está disponible públicamente en NCBI y otras fuentes.

- 30 El procedimiento para determinar un epítipo no está particularmente limitado en la presente invención, por ejemplo, la determinación puede realizarse mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 6.

El anticuerpo de la presente invención puede caracterizarse por una inhibición competitiva del 50 % o más para la unión entre el anticuerpo y la presepsina según un sistema de reacción (preferiblemente usando absorbancia) en el que el péptido P03 (una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1) se usa para una reacción competitiva para inhibir la unión entre el anticuerpo y la presepsina. Preferiblemente, el sistema de reacción es ELISA sándwich. Más preferiblemente, el sistema de reacción es ELISA sándwich usando (a) el anticuerpo o el fragmento de la presente invención y (b) el anticuerpo F1106-13-3 o el anticuerpo F1031-8-3. La secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 corresponde a la posición 52 a la posición 61 de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) de la CD14 soluble humana de longitud completa. Preferiblemente, la inhibición competitiva para la unión entre el anticuerpo de la presente invención y la presepsina es menor del 20 % por el péptido P01 (la secuencia de aminoácidos representada por la posición 46 a la posición 55 de la SEQ ID NO: 3), péptido P02 (el secuencia de aminoácidos representada por la posición 49 a la posición 58 de la misma secuencia), péptido P05 (la secuencia de aminoácidos representada por la posición 58 a la posición 67 de la misma secuencia), péptido P06 (la secuencia de aminoácidos representada por la posición 61 a la posición 70 de la misma secuencia), péptido P07 (la secuencia de aminoácidos representada por la posición 64 a la posición 73 de la misma secuencia), o péptido P08 (la secuencia de aminoácidos representada por la posición 67 a la posición 76 de la misma secuencia). Preferiblemente, la inhibición competitiva para la unión entre el anticuerpo de la presente invención y la presepsina es menor del 20 % por el péptido P04 (la secuencia de aminoácidos representada por la posición 55 a la posición 64 de la SEQ ID NO: 3).

- 50 Alternativamente, como uno de los otros procedimientos para determinar un epítipo, también es posible ver la actividad de unión entre una secuencia parcial (por ejemplo, péptido P03) de un antígeno objetivo y un anticuerpo, como se describe, por ejemplo, en el Ejemplo 9-(4).

Una realización de la presente invención proporciona un anticuerpo anti-presepsina que se une a una secuencia en la que uno o más aminoácidos distintos del ácido aspártico de la posición 8 en la secuencia P03 (SEQ ID NO: 1) es/son sustituidos. El número de aminoácidos sustituidos es, preferiblemente, dos o menos de los aminoácidos, y más preferiblemente, un aminoácido.

- 60 Por ejemplo, en un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-presepsina que se unirá a P03 o una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia del 90 % o más. El epítipo diana puede compartir 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de identidad de secuencia con P03. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-prespsina específico para una secuencia que comparte una identidad de secuencia del 90 % o más con P03 puede ser un anticuerpo monoclonal.

Un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo que reconoce específicamente la presepsina. La presepsina (sCD14-ST) es un fragmento soluble de CD14 e indica una sustancia que tiene las siguientes propiedades 1) a 3).

- Peso molecular de 13 ± 2 kDa según SDS-PAGE en condiciones no reductoras,

5 - Tiene una secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 11 de la SEQ ID NO: 3 en la secuencia N-terminal, y

- Se une específicamente a un anticuerpo preparado mediante el uso de un péptido que consiste en 16 residuos de aminoácidos descritos en SEQ ID NO: 2 para el antígeno.

10 Como se usa en este documento, presepsina significa presepsina humana, a menos que se ilustre particularmente de otra manera.

Además, en la presente invención, la presepsina puede ser una sustancia que tiene la actividad de la presepsina, tal como no solo un estándar de presepsina (rsCD14-ST descrito en el Ejemplo 16 del documento WO 2005/108429) sino también rsCD14ST-Fc (como se describe en el Ejemplo 9-(2) a continuación) y similares.

15 Como se describe en el presente documento, el "anticuerpo que reconoce específicamente" significa un anticuerpo que reconoce inmunológicamente a un sujeto para reconocimiento específico y/o un anticuerpo que muestra una reacción típica antígeno-anticuerpo con un sujeto para reconocimiento específico. Cuando la unión entre el anticuerpo y el sujeto para el reconocimiento específico se expresa por afinidad, la constante de disociación de equilibrio (KD) es generalmente menor que 10^{-7} M. Un anticuerpo de la presente invención reconoce específicamente la presepsina solamente. La principal CD14 soluble presente en la sangre humana es la CD14 soluble de aproximadamente 55 kDa y aproximadamente 49 kDa (sCD14 de alto peso molecular). Un anticuerpo de la presente invención no se une específicamente a la sCD14 de alto peso molecular. En cuanto a la sCD14 de alto peso molecular, se puede usar la CD14 humana de longitud completa que consiste en una secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 3 o se puede preparar mediante adsorción en columna de afinidad usando anticuerpo 3C10 de fluido corporal de un humano normal, por ejemplo (véase, Ejemplo 23 de WO 2005/108429).

25 En un aspecto, un anticuerpo o su fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de la presente invención tiene una reactividad excelente para la presepsina y, por lo tanto, es útil para medir la presepsina en una muestra. Por ejemplo, la presepsina en una muestra puede medirse estableciendo un sistema ELISA sándwich usando un anticuerpo o su fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de la presente invención.

30 En comparación con F1146-17-2 (un anticuerpo monoclonal derivado de una rata, descrito en el Ejemplo 2 del documento WO 2004/044005), un anticuerpo o su fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de la presente invención es más adecuado para la detección de presepsina presente en una cantidad traza en una muestra, en vista del hecho de que la reactividad con presepsina se mejora aproximadamente 10000 veces en un sistema ELISA sándwich (Ejemplo 4). En otras palabras, en comparación con F1146-17-2, un anticuerpo o su fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de la presente invención puede caracterizarse por tener reactividad con presepsina que se incrementa 10000 veces o más en términos de proporción de concentración de presepsina.

40 En un paciente que tiene sepsis, se ha informado que la concentración sanguínea de presepsina aumenta de forma característica. Un anticuerpo o su fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de la presente invención se usa deseablemente para la detección de sepsis. Un anticuerpo de la presente invención o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo es preferiblemente un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo para el cual se observa una diferencia en el valor de medición de presepsina cuando se construye un ELISA sándwich usando el presente anticuerpo, y se miden una muestra del paciente con sepsis y la muestra de una persona normal, como se muestra en el Ejemplo 1.

45 Un anticuerpo o su fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de la presente invención es adecuadamente un anticuerpo que no tiene problema con la influencia de una sustancia interferente en una muestra cuando la medición de presepsina en una muestra se realiza estableciendo un sistema de medición.

50 En la presente invención, una sustancia interferente significa una sustancia cuya presencia tiene potencialmente una influencia sobre el valor de medición de presepsina (en lo sucesivo, también denominada "interferente"). Los ejemplos de los mismos incluyen triglicéridos (también denominados TG), bilirrubina, hemoglobina, factor reumatoide y colesterol. En la presente invención, la sustancia interferente preferida para la evaluación de un anticuerpo es el triglicérido (TG).

55 Como un indicador de evaluación de la prueba de interferencia, la desviación del valor de medición de presepsina en el momento de agregar una cierta cantidad de una sustancia interferente a una muestra del valor de medición de presepsina de la misma muestra sin agregar ninguna sustancia interferente puede ser expresado como grado de separación (%). Además, el grado de separación (%) se puede utilizar como indicador de evaluación de la prueba de interferencia. El grado de separación de un valor de medición según la adición de una sustancia interferente se expresa de la siguiente manera: Grado de separación (%) = {(valor de medición de presepsina después de agregar una

sustancia interferente) - (valor de medición de presepsina sin agregar una sustancia interferente))/(Valor de medición de presepsina sin añadir una sustancia interferente) × 100.

Como se usa en este documento, la expresión "no tiene un problema con la influencia de una sustancia interferente" se puede describir de la siguiente manera: en una prueba de interferencia que usa múltiples muestras, por ejemplo, una proporción de la muestra que exhibe el grado de separación de $\pm 20\%$ o menos, y más preferiblemente $\pm 10\%$ o menos es alto, en el que el grado de separación indica el valor obtenido de la medición de presepsina según la adición de una cierta cantidad de una sustancia interferente. La expresión "una proporción de la muestra es alta" en múltiples muestras generalmente indica 50% o más, preferiblemente 60% o más, más preferiblemente 70% o más, incluso más preferiblemente 80% o más, y particularmente preferiblemente 90% o más de múltiples muestras.

Con respecto a la prueba de interferencia de TG, por ejemplo, es posible que la prueba de interferencia se realice para múltiples muestras y aquellas que tienen una alta proporción de la muestra que exhibe un grado de separación del valor de medición de presepsina de $\pm 20\%$ o menos, y más preferiblemente $\pm 10\%$ o menos, cuando la concentración de TG es 20 mg/ml en una muestra mediante la adición de TG, se utilizan como un indicador. Una realización preferida de la presente invención es cuando la prueba de interferencia de TG se realiza usando un sistema de medición que usa un anticuerpo de la presente invención, en la que el anticuerpo exhibe una alta proporción de una muestra en la que el grado de separación del valor de medición de presepsina es $\pm 20\%$ o menos, y más preferiblemente $\pm 10\%$ o menos, cuando la concentración de TG es 20 mg/ml .

Alternativamente, por ejemplo, se puede obtener un grado de separación del valor de medición de presepsina cuando la concentración de TG en una muestra es 20 mg/ml en una pluralidad de muestras, y se puede usar como un índice que un promedio del grado de separación es $\pm 20\%$ o menos, y más preferiblemente $\pm 10\%$ o menos. Una de las realizaciones preferidas de un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo en el que un promedio de un grado de separación del valor de medición de presepsina a la concentración de TG en una muestra de 20 mg/ml presenta $\pm 20\%$ o menos, y más preferiblemente $\pm 10\%$ o menos, cuando se realiza una prueba de interferencia de TG con respecto a una pluralidad de muestras mediante un sistema de medición que usa el anticuerpo.

En NCEP-ATPIII, que es una guía para la dislipidemia en Estados Unidos, se describe que menos de 150 mg/dl es normal, 150 a 200 mg/dl es un límite, 200 a 499 mg/dl es un valor alto (alto), y 500 mg/dl o más es un valor notablemente alto (muy alto). Se puede decir que la concentración de TG de 20 mg/ml ($= 2000\text{ mg/dl}$) en una muestra está en el estado en el que la concentración de TG es extremadamente alta, a la luz del estándar mencionado anteriormente.

En una prueba de interferencia de TG del presente Ejemplo, se mide un grado de separación del valor de medición de presepsina en tres puntos de la concentración de TG de una muestra de $6,7\text{ mg/ml}$, $13,3\text{ mg/ml}$ y 20 mg/ml . Se observó una tendencia a que el grado de separación también sea pequeño a la concentración de TG de una muestra de $6,7\text{ mg/ml}$ y $13,3\text{ mg/ml}$ en un anticuerpo en el que el grado de separación es pequeño a la concentración de TG de una muestra de 20 mg/ml (sistema de medición) en comparación con un anticuerpo en el que el grado de separación es grande.

La prueba de interferencia de TG se puede realizar usando suero humano de una persona normal. Dado que una muestra de una persona normal (es decir, una persona no séptica) tiene una concentración de presepsina baja, cuando sufre una interferencia de TG, un grado de separación del valor de medición se vuelve grande fácilmente. Por la presente prueba, si se puede medir una pequeña cantidad de presepsina en una muestra, es indicativo de que la prueba tiene buena precisión. Por ejemplo, un grado de separación del valor de medición de presepsina a la concentración de TG en una muestra es preferiblemente $\pm 100\%$ o menos, más preferiblemente $\pm 70\%$ o menos, más preferiblemente $\pm 50\%$ o menos, y particularmente preferiblemente $\pm 20\%$ o menos. Es deseable realizar la prueba usando una pluralidad de muestras, como en la prueba mencionada anteriormente.

Además, un anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de la presente invención también puede evaluarse con base en la comparación entre el grado de separación del valor de medición de presepsina obtenido al agregar una sustancia de interferencia para el anticuerpo y el grado de separación del anticuerpo S68 bajo las mismas condiciones. De acuerdo con una realización preferida, un anticuerpo de la presente invención y un anticuerpo S68 exhiben grados de separación similares.

Con respecto a la prueba de interferencia de TG, la evaluación también se puede hacer teniendo una alta proporción de la muestra que presente 20% o menos y más preferiblemente 10% o menos de diferencia entre el grado de separación del valor de medición de presepsina. cuando la concentración de TG es de 20 mg/ml en una muestra de acuerdo con la adición de TG en un sistema de medición que usa el anticuerpo de la presente invención y el grado de separación del anticuerpo S68 en las mismas condiciones. Con respecto a la diferencia en el grado de separación, cuando el grado de separación del valor de medición obtenido del anticuerpo de la presente invención es $+5\%$ y el grado de separación del valor de medición obtenido del anticuerpo S68 es -10% , por ejemplo, la diferencia en el grado de separación se calculó como 15% .

Como muestra utilizada en la prueba de interferencia, se pueden utilizar las muestras descritas en la segunda realización de la presente invención. En el caso de una prueba de interferencia de TG, la muestra es preferiblemente suero o plasma.

- 5 En cuanto a un anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de la presente invención, es preferible un anticuerpo que presente una buena correlación con el valor de medición obtenido usando el anticuerpo S68 cuando se mide la presepsina en una muestra estableciendo un sistema de medición. "Buena correlación" significa que el coeficiente de correlación es preferiblemente 0,9 o más, y más preferiblemente 0,95 o más.

- 10 Un anticuerpo o su fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de la presente invención puede unirse específicamente a la presepsina, y la afinidad por la presepsina (constante de disociación de equilibrio, valor KD) es preferiblemente menor de 10^{-7} M, más preferiblemente menor de 10^{-8} M, incluso más preferiblemente menos de 10^{-9} M, particularmente preferiblemente menos de 10^{-10} M, y más preferiblemente menos de 10^{-11} M. La constante de disociación en equilibrio de un anticuerpo o su fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de la presente invención para presepsina está preferiblemente en el rango de 10^{-7} M a 10^{-14} M, más preferiblemente en el rango de 10^{-8} M a 10^{-13} M. rsCD14ST-Fc se puede utilizar como presepsina.

- 15 La afinidad (constante de disociación de equilibrio, valor KD) se puede medir usando, por ejemplo, BIACORE (GE Healthcare).

- 20 En una de las realizaciones preferidas de la presente invención, la afinidad (valor KD) por la presepsina del anticuerpo de la presente invención o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo es excelente en comparación con la afinidad por la presepsina del anticuerpo S68. Es deseable que la afinidad (valor KD) por rsCD14ST-Fc (descrito en Presepsin: Ejemplo 9-(2)) de un anticuerpo de la presente invención o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo exhiba un valor numérico al mismo nivel que, o menor que 1,08E-08 de afinidad (valor KD) por rsCD14ST-Fc por el anticuerpo S68, y es deseable que la afinidad exhiba preferiblemente 1/2 de un valor KD del anticuerpo S68 (5,40E-09) o menos, y más preferiblemente 1/10 de un valor KD del anticuerpo S68 (1,08E-09) o menos.

- 25 Una de las realizaciones preferidas de la presente invención es una excelente actividad de unión de un anticuerpo de la presente invención o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo con presepsina en comparación con el anticuerpo S68.

- 30 Por ejemplo, rsCD14ST-Fc (presepsina) se fija a una fase sólida y se hace reaccionar con un anticuerpo, y la actividad de unión de un anticuerpo con presepsina puede evaluarse por absorbancia o similar, como se describe en el Ejemplo 10-(2).

- 35 Cuando se realiza una prueba de acuerdo con el Ejemplo 10, y se determina que la absorbancia en una reacción del anticuerpo S68 y rsCD14ST-Fc es 1, una relación de absorbancia cuando reaccionan el anticuerpo de la presente invención y rsCD14ST-Fc es preferiblemente 1 o más, más preferiblemente 2 o más, más preferiblemente 4 o más, y particularmente preferiblemente 5,5 o más.

- 40 La presente invención proporciona un anticuerpo descrito de cualquiera de las siguientes formas. Estos anticuerpos son anticuerpos anti-presepsina. Debido a que el siguiente anticuerpo de (a), (b) o (c) y el fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo reconocen específicamente un epítipo que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 presente en la presepsina, son ejemplos preferidos de una primera realización. Es más preferible un anticuerpo de (a) o (b), o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo.

- 45 (a) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo que comprende VH que comprende VH CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, VH CDR2 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y VH CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos GDF y VL que comprende VL CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19, VL CDR2 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y VL CDR3 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21;

- 50 (b) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo que comprende VH que comprende VH CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, VH CDR2 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 y VH CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos GDF y VL que comprende VL CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, VL CDR2 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23 y VL CDR3 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24; o

- 55 (c) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo que comprende VH que comprende VH CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, VH CDR2 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 y VH CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos GGL y VL que comprende VL CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25, VL CDR2 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 y VL CDR3 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27.

La presente invención también proporciona un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región CDR descrita en la Figura 2 a la Figura 2-2. Estos anticuerpos también reconocen específicamente un epítipo que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 presente en la presepsina. Es más preferible un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR de 5793, 5810, 5864, 5979, 5983, 5988 o 6028, o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo.

La presente invención proporciona un polipéptido que comprende la CDR descrita en cualquiera de los siguientes. Es más preferible un polipéptido de (i), (ii), (iv) o (v).

(i) un polipéptido que comprende VH CDR1 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 4, VH CDR2 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 5 y VH CDR3 que consiste en la secuencia GDF

(ii) un polipéptido que comprende VH CDR1 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 7, VH CDR2 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 8 y VH CDR3 que consiste en la secuencia GDF

(iii) un polipéptido que comprende VH CDR1 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 10, VH CDR2 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 11 y VH CDR3 que consiste en la secuencia GGL

(iv) un polipéptido que comprende VL CDR1 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 19, VL CDR2 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 20 y VL CDR3 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 21

(v) un polipéptido que comprende VL CDR1 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 22, VL CDR2 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 23 y VL CDR3 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 24

(vi) un polipéptido que comprende VL CDR1 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 25, VL CDR2 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 26 y VL CDR3 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 27

La presente invención proporciona un polipéptido que comprende VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 que consiste en cada secuencia de aminoácidos descrita en la Figura 2 a la Figura 2-2. En la realización, la presente invención proporciona un polipéptido que comprende VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 que consiste en cada secuencia de aminoácidos descrita en la Figura 2 a la Figura 2-2. Es más preferible un polipéptido que comprende VH CDR1 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 7, VH CDR2 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 8 y VH CDR3 que consiste en la secuencia de GDA (5793), o un polipéptido que comprende VH CDR1 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 7, VH CDR2 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 97 y VH CDR3 que consiste en la secuencia de GDF (5810).

La presente invención proporciona un polipéptido que comprende la región variable descrita en cualquiera de los siguientes. Es más preferible un polipéptido de (i), (ii), (iv) o (v).

(i) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende CDR1 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 4, CDR2 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 5, CDR3 que consiste en la secuencia GDF

(ii) un VH que comprende CDR1 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 7, CDR2 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 8, CDR3 que consiste en la secuencia GDF

(iii) un VH que comprende CDR1 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 10, CDR2 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 11, CDR3 que consiste en una secuencia GGL

(iv) una región variable de Cadena liviana (VL) que comprende CDR1 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 19, CDR2 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 20, CDR3 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 21

(v) una VL que comprende CDR1 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 22, CDR2 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 23, CDR3 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 24

(vi) una VL que comprende CDR1 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 25, CDR2 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 26, CDR3 que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO: 27

La presente invención proporciona un polipéptido que comprende un VH que comprende VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 que consiste en cada secuencia de aminoácidos descrita en la Figura 2 a la Figura 2-2. La presente invención proporciona un polipéptido que comprende una VL que comprende VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 que consiste en cada secuencia de aminoácidos descrita en la Figura 2 a la Figura 2-2.

En la presente invención, el polipéptido es preferiblemente una sustancia de unión a antígeno que tiene actividad de unión para la presepsina.

El anticuerpo o polipéptido anterior puede tener una sustitución, una eliminación, una adición y/o una inserción (denominada sustitución o similar) de uno o más aminoácidos en la secuencia de CDR. El anticuerpo o polipéptido después de la sustitución o similar de uno o más aminoácidos tiene preferiblemente la misma actividad o rendimiento

que antes de realizar la sustitución o similar, en términos de actividad de unión para un antígeno, características en el momento de medir la presepina o similares. Como se describe en el presente documento, el anticuerpo o polipéptido después de la sustitución o similar, que tiene la misma actividad o rendimiento o mejor que antes de realizar la sustitución o similar, incluye tanto una variante obtenida por modificación artificial basada en un procedimiento de ingeniería genética conocido como una variante que se produce de forma natural (la denominada variante alélica). Un número múltiple de sustituciones de aminoácidos no está particularmente limitado y la sustitución puede incluir 1 o más. Sin embargo, son preferiblemente tres o menos aminoácidos, más preferiblemente dos o menos aminoácidos, e incluso más preferiblemente un aminoácido en una CDR. En una realización, un anticuerpo o un polipéptido de la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos de CDR con una identidad del 90 % o superior a la secuencia de aminoácidos de CDR designada por SEQ ID NO. como se describió anteriormente. La identidad de secuencia puede ser 92 % o más, 95 % o más, 97 % o más, o 99 % o más. Tal anticuerpo o polipéptido preferiblemente tiene el mismo nivel de actividad o rendimiento que el anticuerpo o polipéptido designado por SEQ ID NO.

La región marco (FR) del anticuerpo que se va a conjugar con la CDR se selecciona de manera que las CDR formen un buen sitio de unión al antígeno. La FR usada para la región variable de la presente invención no está particularmente limitada y se puede usar cualquier FR. Si es necesario, uno o más aminoácidos de FR pueden sustituirse, eliminarse, añadirse y/o insertarse de modo que las CDR puedan formar un sitio de unión al antígeno apropiado. Por ejemplo, de acuerdo con la medición y evaluación de la actividad de unión de un anticuerpo usando FR con aminoácido sustituido para un antígeno, también se puede seleccionar una secuencia de FR variante que tenga una propiedad deseada. En una realización, FR puede ser una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80 % o más con la secuencia designada por SEQ ID NO. La identidad de secuencia puede ser 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 97 % o más, o 99 % o más. Por ejemplo, de acuerdo con la medición y evaluación de la actividad de unión de un anticuerpo usando FR con aminoácido sustituido para un antígeno, también se puede seleccionar una secuencia de FR variante que tenga una propiedad deseada.

Por ejemplo, FR bien conocido que puede obtenerse de una base de datos (por ejemplo, GenBank), FR de un anticuerpo obtenido en la presente invención, o similar puede usarse como región marco. (Por ejemplo, AA006511,1, AAT02391,1, AAG13973,1 y AGT29816,1 se ejemplifican como secuencia de aminoácidos. AY596429,1, AY171772,1, KC020056,1 y AF294966,1 se ejemplifican como secuencia de polinucleótidos). SEQ ID NO: 48 a 84 son adecuadas para su uso en determinadas realizaciones de la presente invención. Estos son FR que se pueden obtener de una base de datos, o FR de un anticuerpo obtenido en la presente invención. Las regiones marco pueden derivarse de varios animales, aunque el conejo se usa preferiblemente en algunas realizaciones de la presente invención. Las regiones FR preferidas de los anticuerpos de la presente invención incluyen las que se muestran en las SEQ ID NO: 64-84, o más preferiblemente las SEQ ID NO: 65, 66, 68, 69, 71, 72, 73, 75, 76, 78, 79, 81, 82, 83 u 84.

En una realización, los ejemplos preferibles de las regiones variables del anticuerpo de la presente invención son los siguientes.

(1)

(i) un VH que comprende VH CDR de la variante descrita en la Figura 2 a la Figura 2-2 (por ejemplo, VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 del anticuerpo 5810) y FR de la secuencia de la SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 70 y SEQ ID NO: 73; y

(ii) una VL que comprende VL CDR de la variante descrita en la Figura 2 a la Figura 2-2 (por ejemplo, VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 del anticuerpo 5810) y FR de la secuencia de la SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 84.

(2)

(i) un VH que comprende VH CDR de F1466-5, F1466-26 o F1466-16 (por ejemplo, VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 de F1466-26) y FR de la secuencia de la SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 70 y SEQ ID NO: 73; y

(ii) un VL que comprende VL CDR de F1466-5, F1466-26 o F1466-16 (por ejemplo, VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 de F1466-26) y FR de la secuencia de la SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 84.

(3)

(i) un VH que comprende VH CDR de la variante descrita en la Figura 2 a la Figura 2-2 (por ejemplo, VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 del anticuerpo 5810) y FR de la secuencia de la SEQ ID NO: 65 (o 66), SEQ ID NO: 68 (o 69), SEQ ID NO: 71 (o 72) y SEQ ID NO: 73; y

(ii) una VL que comprende VL CDR de la variante descrita en la Figura 2 a la Figura 2-2 (por ejemplo, VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 del anticuerpo 5810) y FR de la secuencia de la SEQ ID NO: 75 (o 76), SEQ ID NO: 78 (o 79), SEQ ID NO: 81 (o 82 u 83) y SEQ ID NO: 84.

(4)

(i) un VH que comprende VH CDR de F1466-5, F1466-26 o F1466-16 (por ejemplo, VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 de F1466-26) y FR de la secuencia de la SEQ ID NO: 65 (o 66), SEQ ID NO: 68 (o 69), SEQ ID NO: 71 (o 72) y SEQ ID NO: 73; y

(ii) una VL que comprende VL CDR de F1466-5, F1466-26 o F1466-16 (por ejemplo, VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 del anticuerpo 5810) y FR de la secuencia de la SEQ ID NO: 75 (o 76), SEQ ID NO: 78 (o 79), SEQ ID NO: 81 (o 82 u 83) y SEQ ID NO: 84.

En la región variable, uno o más aminoácidos (por ejemplo, cinco o menos aminoácidos, y preferiblemente tres o menos aminoácidos) pueden sustituirse, eliminarse, añadirse y/o insertarse. El anticuerpo o polipéptido después de la sustitución de uno o más aminoácidos tiene preferiblemente la misma actividad o rendimiento que antes de realizar la sustitución, en términos de actividad de unión para un antígeno, características en el momento de medir la presepsina. En una realización, cuando se especifica una región variable mediante la secuencia descrita anteriormente, la región variable puede tener una secuencia de aminoácidos con 80 % de identidad o superior a la secuencia designada por la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO. La identidad de secuencia puede ser 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 97 % o más, o 99 % o más. Tal región variable tiene preferiblemente el mismo nivel de actividad o rendimiento que la región variable designada por la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO.

La región constante usada para un anticuerpo de la presente invención no está particularmente limitada y se puede usar cualquier región constante. Los ejemplos preferidos de la región constante que se usa para el anticuerpo de la presente invención incluyen una región constante de IgG derivada de un ratón, una rata, un conejo o un ser humano. La región constante puede tener uno o más aminoácidos que están sustituidos, eliminados, añadidos y/o insertados dentro de un intervalo en el que la actividad de unión de un antígeno, las características en el momento de medir la presepsina no se ven afectadas por ellos.

El anticuerpo de la presente invención es preferiblemente un anticuerpo monoclonal, es decir, un anticuerpo monoclonal anti-presepsina. El anticuerpo monoclonal es un anticuerpo secretado por una célula productora de anticuerpos de un monoclon. En comparación con un anticuerpo policlonal, el anticuerpo monoclonal tiene la característica de que puede obtenerse un anticuerpo con un título alto y una especificidad antigénica homogénea, o similar. Teóricamente, el anticuerpo monoclonal tiene la ventaja de que tiene un peso de anticuerpo menor requerido para una medición de antígeno en comparación con un anticuerpo policlonal. Como se describe en el presente documento, el término "anticuerpo" se puede usar con el significado de "anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo".

Un anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede producir preferiblemente usando el péptido S68, descrito por SEQ ID NO: 2, como un antígeno para la administración. Se puede obtener un anticuerpo monoclonal de la presente invención, por ejemplo, inmunizando un animal con péptido S68, produciendo un hibridoma usando células productoras de anticuerpos de un animal inmunizado y células de mieloma, seleccionando y cultivando el hibridoma preparado como una sola célula, y purificar un sobrenadante de cultivo.

La especie animal de la que se deriva el anticuerpo no está particularmente limitada, y los ejemplos de la misma incluyen un ratón, una rata, un hámster y un conejo. Preferiblemente es un conejo. En otras palabras, un anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo monoclonal anti-presepsina derivado de un conejo (también denominado anticuerpo monoclonal anti-presepsina de conejo).

Como células de mieloma, se pueden usar varias células conocidas. Ejemplos de los mismos incluyen SKO-007 derivado de un ser humano, SHM-D33 de heteromioma humano-ratón, P3, NS-1, P3U1 y SP2/0 derivado de un ratón, y YB2/0 e Y3-Ag1, 2, 3 derivado de una rata. También es posible utilizar linfocitos B inmortalizados o similares derivados de un conejo.

De acuerdo con la presente invención, también es preferible que se produzca un hibridoma de conejo-conejo por fusión entre células de bazo de conejo y linfocitos B inmortalizados derivados de un conejo o que se produzca un hibridoma de conejo-ratón mediante fusión con células derivadas de una línea celular de ratón inmortalizadas.

La fusión entre células productoras de anticuerpos y células de mieloma se puede realizar mediante un procedimiento conocido, y los ejemplos de un agente para promover la fusión que se puede usar incluyen polietilenglicol (PEG) y virus Sendai. Con respecto a una solución de cultivo utilizada para la fusión celular, se puede utilizar una solución de cultivo RPMI1640 o una solución de cultivo MEM.

El hibridoma formado por fusión se cultiva durante varios días a tres semanas aproximadamente. Además, utilizando un medio de selección tal como un medio que contiene hipoxantina, timidina y aminopterina (medio HAT), por ejemplo, los hibridomas fusionados pueden separarse de las células no fusionadas. El hibridoma obtenido se selecciona además basándose en un anticuerpo producido por él. Según la preparación del hibridoma seleccionado como un solo clon De acuerdo con una dilución limitante conocida, se establece como un hibridoma productor de anticuerpos.

La purificación de un anticuerpo se puede realizar mediante un procedimiento conocido como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad (columna de proteína A, columna de proteína G), un procedimiento de eliminación de sal, precipitación con alcohol, enfoque isoelectrico, electroforesis, centrifugación o gel filtración.

- 5 También se puede producir un anticuerpo o su fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de la presente invención mediante una técnica de recombinación genética que puede ser utilizada por una persona experta en la técnica. Por ejemplo, basándose en una secuencia del anticuerpo anti-presepsina obtenido, se prepara un polinucleótido que codifica el anticuerpo o una parte del anticuerpo y se expresa en un huésped adecuado después de la introducción en un vector de expresión.

- 10 La preparación del polinucleótido que codifica el anticuerpo o una parte del anticuerpo se puede realizar, por ejemplo, extrayendo ARNm de un hibridoma que produce el anticuerpo de la presente invención y sintetizando un ADNc. Puede realizarse utilizando un kit disponible comercialmente.

- 15 Alternativamente, también se puede preparar un anticuerpo en el que se altera una parte de una secuencia del mismo basándose en una secuencia de un anticuerpo anti-presepsina usando la técnica de recombinación génica que puede ser usada por una persona experta en la técnica. Puede prepararse un vector que comprende una secuencia objetivo y expresarse en un huésped adecuado.

El vector utilizado para la presente invención no está particularmente limitado. Sin embargo, es preferiblemente un vector y/o un vector de expresión adecuado para la expresión del gen del anticuerpo. Los ejemplos del mismo incluyen un vector que contiene el promotor EF-1 α y/o el potenciador de CMV.

- 20 Los ejemplos del vector que se pueden usar también incluyen plásmido derivado de *E. coli* (por ejemplo, pBR322, pBR325, pUC12 y pUC13), plásmido derivado de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, pUB110, pTP5 y pC194), plásmido derivado de levadura (por ejemplo, pSH19 y pSH15), bacteriófagos como el fago λ y virus como retrovirus, virus vaccinia y baculovirus.

- 25 El promotor utilizado en la presente invención puede ser cualquier promotor que sea adecuado para el hospedador utilizado para la expresión génica. Por ejemplo, cuando el huésped es una célula animal, se puede usar un promotor derivado de SV40, un promotor de retrovirus, un promotor de choque térmico, un promotor de citomegalovirus o un promotor EF1 α .

Si es necesario, el vector puede contener un potenciador, una señal de empalme, una señal para la adición de poli A, un marcador de selección y un origen para la replicación de SV40.

- 30 Los ejemplos del marcador de selección que pueden usarse incluyen deshidrofolato reductasa (dhfr), gen resistente al metotrexato (MTX) y gen resistente a ampicilina.

- 35 La célula huésped utilizada para la presente invención no está particularmente limitada. Por ejemplo, se utilizan células bacterianas (*E. coli*), levadura, células de anfibios (célula de ovocito de *Bacillus subtilis*), una célula de insecto o insecto (sf9) y una célula animal. Los ejemplos de la célula animal que se pueden usar incluyen célula COS-1, célula COS-7, célula CHO, célula CHO empobrecida en el gen DHFR (célula dhfr-CHO), célula 3T3 de ratón, célula HEK293 humana y célula de mieloma.

Se puede realizar un procedimiento para introducir un vector de expresión en una célula huésped mediante un procedimiento conocido, y los ejemplos del mismo incluyen un procedimiento de lipofección, un procedimiento de fosfato cálcico, un procedimiento de electroporación y un procedimiento de microinyección.

- 40 Después de la introducción de un vector de expresión en una célula huésped, las células se cultivan en un medio de cultivo adecuado para cada célula huésped. Por ejemplo, en el caso de células animales, se puede utilizar un medio para el cultivo de células animales como el medio RPMI1640 y el medio GIT o aquellos medios añadidos con varios aditivos como el FCS. Cultivando las células transformadas obtenidas en un medio, el anticuerpo puede expresarse y acumularse en el sobrenadante del cultivo. Para la purificación de un anticuerpo en el sobrenadante de cultivo, se puede utilizar el procedimiento descrito anteriormente. Además, la cantidad de expresión de un anticuerpo y la actividad del anticuerpo antígeno pueden medirse mediante ELISA.

- 50 Se puede preparar un anticuerpo de la presente invención o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo mediante un procedimiento de presentación en fagos. La obtención de un anticuerpo mediante el procedimiento de presentación en fagos puede llevarse a cabo mediante la técnica que puede utilizar un experto en la técnica. (véase CARLOS F. BARBAS et al., Phage Display: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press)). Por ejemplo, un gen se obtiene de un linfocito esplénico obtenido inmunizando un animal con el péptido S68 y se liga con un fagémido vector y, posteriormente, se realiza el procedimiento convencional para obtener un anticuerpo.

- 55 Además, para producir un anticuerpo alterado en el que sólo se cambia una secuencia particular de CDR (por ejemplo, VH CDR3), también es posible utilizar el procedimiento de presentación en fagos. Esto también se puede llevar a cabo utilizando la técnica que puede utilizar un experto en la técnica, empleando un plásmido que comprende una cadena pesada y una Cadena liviana de un anticuerpo como molde, y cebadores particulares.

- Los ejemplos del fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de la presente invención incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, un anticuerpo monocatenario (scFv), región V dimerizada (diacuerpo), región V estabilizada con disulfuro (dsFv), sc(Fv)₂, y un polipéptido que contiene CDR, un polipéptido que contiene una región variable de cadena pesada y un polipéptido que contiene una región variable de Cadena liviana. Cualquiera de esos fragmentos de anticuerpo tiene una propiedad de unión a antígeno que es la misma que la del anticuerpo de la presente invención para reconocer un epítipo que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. Esos fragmentos de anticuerpo pueden prepararse usando técnicas de recombinación genética conocidas por un experto en la materia.
- Fab indica, entre los fragmentos obtenidos mediante el tratamiento de IgG con proteasa papaína, un fragmento de anticuerpo que tiene una propiedad de unión a antígeno en el que aproximadamente la mitad del lado N-terminal de la cadena H y la cadena L completa están unidas mediante un enlace disulfuro.
- F(ab')₂ indica, entre los fragmentos obtenidos tratando IgG con proteasa pepsina, los obtenidos uniendo Fab con un enlace disulfuro de una región bisagra.
- Fab' indica un fragmento de anticuerpo que tiene una actividad de unión a antígeno, que se obtiene al digerir el enlace disulfuro de una región bisagra de F(ab')₂. El Fab' puede obtenerse mediante un tratamiento de F(ab')₂ con un reactivo reductor, ditioneitol.
- ScFv es un polipéptido en el que un VH y un VL están unidos entre sí mediante un enlazador peptídico adecuado, y es un fragmento de anticuerpo que tiene actividad de unión a antígeno.
- El diacuerpo indica un fragmento de anticuerpo que tiene una actividad de unión a antígeno divalente obtenida por dimerización de scFv.
- DsFv indica un polipéptido que tiene una sustitución de un residuo de aminoácido de cada uno de VH y VL con un residuo de cisteína, que está unido mediante un enlace disulfuro.
- Sc(Fv)₂ indica un fragmento de antígeno obtenido como una sola cadena basándose en la unión de dos VH y dos VL a través de un enlazador sc(Fv)₂ se puede producir uniendo scFv mediante un enlazador, por ejemplo.
- En las realizaciones preferidas, un polipéptido que comprende una CDR es el mismo que los descritos anteriormente, y es un fragmento que tiene una actividad de unión a antígeno. Un péptido que comprende múltiples CDR se puede unir directamente o mediante un enlazador adecuado.
- El polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada y el polipéptido que comprende una región variable de cadena liviana son como se describió anteriormente.
- En la presente invención, cualquier enlazador peptídico que se pueda introducir mediante ingeniería genética puede usarse como enlazador. El enlazador preferido en la presente invención es un enlazador peptídico. La longitud del enlazador peptídico no está particularmente limitada y puede seleccionarse adecuadamente dependiendo del propósito. Sin embargo, generalmente es de 1 a 100 aminoácidos, preferiblemente de 3 a 50 aminoácidos y más preferiblemente de 5 a 20 aminoácidos. Cuando se unen cuatro regiones variables de anticuerpo, generalmente se necesitan tres enlazadores. Los múltiples enlazadores pueden ser iguales o pueden usarse enlazadores diferentes.
- Un anticuerpo de la presente invención incluye un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo quimérico es una molécula de anticuerpo producida mediante la combinación de una parte de moléculas de anticuerpo de dos o más especies diferentes. El anticuerpo quimérico preferido en la presente invención es un anticuerpo que tiene una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal de conejo y una región constante de otras especies (por ejemplo, humana); sin embargo, aquí se contemplan otras combinaciones quiméricas conocidas en la técnica. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo obtenido mediante el trasplante de CDR de especies no humanas a un anticuerpo humano. Pueden producirse anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados mediante procedimientos generales que se conocen en la técnica.
- La presente invención comprende un anticuerpo en el que se añaden uno o más residuos de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de la presente invención. Un anticuerpo de la presente invención también puede comprender una proteína de fusión en la que el anticuerpo se fusiona con otro péptido o polipéptido. La producción de una proteína de fusión se puede realizar usando un procedimiento conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, después de unir un polinucleótido que codifica el anticuerpo de la presente invención a un polinucleótido que codifica otro péptido o polipéptido de manera que tengan un marco superpuesto e introducirlo en un vector de expresión, se puede realizar la expresión en una célula huésped. Otros péptidos o polipéptidos usados para unirse con el anticuerpo de la presente invención no están particularmente limitados. Ejemplos de los mismos incluyen FLAG, 6 × His que consiste en seis residuos de His (histidina), segmento de polihistidina, hemaglutinina (HA) de influenza, etiqueta T7, etiqueta HSV, GST (glutación-S-transferasa), región constante de inmunoglobulina (región Fc), β-galactosidasa y proteína de unión a maltosa.

2. Procedimiento para medir la presepsina

En el presente documento se describe un procedimiento para la medición inmunológica de presepsina utilizando al menos un anticuerpo o su fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de la presente invención, e incluye un paso de poner en contacto el anticuerpo o su fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de la presente invención con una muestra que contiene presepsina. El término "medir" se puede usar de manera intercambiable con términos como "detectar", "cuantificar" o "ensayar", y se usa como un significado que incluye determinación cuantitativa y cualitativa. La medición de presepsina se realiza preferiblemente in vitro.

Dado que la presepsina se conoce como un marcador utilizado para la detección de sepsis, se puede decir que el procedimiento anterior es un procedimiento para detectar sepsis que incluye un paso de poner en contacto el anticuerpo o su fragmento de anticuerpo de unión al antígeno de la presente invención con una muestra que contiene presepsina.

Se describe adicionalmente en el presente documento un procedimiento para detectar sepsis, o un procedimiento para ayudar a la detección de sepsis, que comprende al menos 1) un paso para medir la concentración de presepsina en una muestra de un sujeto usando un anticuerpo de la presente invención, y 2) un paso para determinar si la concentración de presepsina es un valor alto en comparación con un valor de corte o no. El valor de corte puede ser de 314 a 600 pg/ml, preferiblemente de 400 a 580 pg/ml, más preferiblemente de 450 a 550 pg/ml y más preferiblemente de 500 pg/ml.

Como se usa en este documento, "detección de enfermedad" puede usarse de manera intercambiable con "ayudar a la detección de la enfermedad" o "ayudar al diagnóstico de la enfermedad".

Además, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo que se une al antígeno se puede usar para la detección o evaluación de al menos una enfermedad que incluye discriminación entre sepsis y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), evaluación del riesgo de la gravedad de la sepsis, predicción pronóstica de sepsis (predicción de mortalidad), evaluación del grado de gravedad séptica, detección de infecciones del sitio quirúrgico, detección de coagulación intravascular diseminada (DIC), detección de DIC infecciosa, detección de enfermedad cardíaca, detección de infecciones respiratorias asociadas con infección bacteriana, detección de la enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), detección de neutropenia febril (FN), detección del síndrome hemofagocítico (HPS) y evaluación de la función del fagocito.

El término "infecciones del sitio quirúrgico", como se usa en este documento, significa enfermedades infecciosas que se producen después de la cirugía, e incluye todas las infecciones debidas a la cirugía y la terapia complementaria necesaria para ello. Las infecciones del sitio quirúrgico incluyen todas las enfermedades diagnosticadas como infecciones del sitio quirúrgico según la Guía para la prevención de la infección del sitio quirúrgico, 1999 (CDC).

La enfermedad cardíaca incluye síndrome coronario agudo (SCA), insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, enfermedad arterial coronaria, angina de pecho, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular isquémico, accidente cerebrovascular hemorrágico y ataque de isquemia cerebral transitoria.

Una infección respiratoria asociada con una infección bacteriana puede incluir infecciones del tracto respiratorio inferior o neumonía. Las infecciones del tracto respiratorio inferior incluyen infecciones agudas del tracto respiratorio inferior e infecciones crónicas del tracto respiratorio inferior. Las infecciones agudas del tracto respiratorio inferior incluyen traqueítis aguda, bronquitis aguda y bronquiolitis aguda. La mayoría de ellos se desarrollan por infecciones víricas del tracto respiratorio superior que se diseminan al tracto respiratorio inferior y, en algunas de estas enfermedades, se produce una infección secundaria por bacterias. La administración de antibióticos puede adaptarse si se observan signos de infección secundaria bacteriana. La infección crónica del tracto respiratorio inferior es una afección patológica en la que se ha encontrado una infección bacteriana persistente en el tracto respiratorio inferior con trastornos orgánicos causados por bronquiectasias o enfermedad pulmonar obstructiva crónica, e incluye infección persistente y exacerbación aguda. Las enfermedades que causan trastornos orgánicos en el tracto respiratorio inferior incluyen bronquiectasia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis crónica, panbronquiolitis difusa, tuberculosis pulmonar obsoleta, neumoconiosis, infección por micobacterias no tuberculosas, aspergilosis broncopulmonar alérgica, fibrosis pulmonar y asma bronquial crónica. En ambos casos de infección persistente y exacerbación aguda, se aplica la administración de antibióticos. La neumonía incluye la neumonía adquirida en la comunidad y la neumonía adquirida en el hospital. Preferiblemente, la neumonía es una neumonía adquirida en la comunidad.

Evaluar la función de las células fagocíticas significa (a) medición de la actividad fagocítica de neutrófilos, granulocitos y/o glóbulos blancos, (b) evaluación de la función inmune midiendo la actividad fagocítica de neutrófilos, granulocitos y/o glóbulos blancos, (c) evaluación de la calidad de las células implantables tras el trasplante de células autólogas o alotrasplante de células, y (d) detección de fagocitosis relacionada con enfermedades por parte de células fagocíticas. Las enfermedades relacionadas con la fagocitosis por células fagocíticas incluyen enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, mastitis, gota, glomerulonefritis, colitis ulcerosa, fiebre mediterránea, otitis media, rinitis, neumonía, tuberculosis, cistitis, enfermedad de infección por líquido amniótico y piosemia. La muestra utilizada para detectar las enfermedades relacionadas con la fagocitosis por las células fagocíticas es el líquido tisular, linfático, líquido sinovial, leche, líquido cefalorraquídeo, pus, saliva, lágrimas, moco, secreción nasal, esputo, orina, ascitis, líquido amniótico,

líquidos corporales tales como como semen, así como líquido de lavado obtenido después de lavar la cavidad nasal, los bronquios, los pulmones, la piel, la cavidad peritoneal, diversos órganos, las articulaciones y los huesos.

Ejemplos del procedimiento para la medición inmunológica de presepsina usando un anticuerpo o su fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de la presente invención incluyen inmunoensayo enzimático (a continuación, también descrito como ELISA o EIA), inmunoensayo enzimático de quimioluminiscencia (CLEIA), inmunoensayo de quimioluminiscencia CLIA), prueba de anticuerpos de fluorescencia (FAT), inmunoensayo enzimático de fluorescencia (FEIA), inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunocromatografía, un procedimiento de aglutinación y un procedimiento de competición. En la presente invención, se puede utilizar cualquiera de un procedimiento directo o un procedimiento indirecto. También se puede utilizar un procedimiento de sensibilización que implica la formación y detección de un complejo biotina-avidina (estreptavidina).

El EIA es un ejemplo de un inmunoensayo que usa un anticuerpo marcado con enzima, y los ejemplos del mismo incluyen un procedimiento directo y un procedimiento indirecto. Los ejemplos preferidos del mismo incluyen ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima).

El ELISA sándwich es un procedimiento en el que la medición se realiza usando dos o más anticuerpos con un sitio de reconocimiento de antígeno diferente. Un anticuerpo se inmoviliza de antemano en una fase sólida y formando un complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo con un antígeno, es posible la detección de dicho antígeno, que está posicionado entre dos tipos de anticuerpos.

El inmunoensayo enzimático de quimioluminiscencia (CLEIA) es un procedimiento en el que un anticuerpo inmovilizado sobre partículas magnéticas o perlas se hace reaccionar con un antígeno en una muestra seguido de una reacción con un anticuerpo marcado con enzima y lavado (separación B/F), se realiza una reacción enzimática añadiendo un sustrato quimioluminiscente y se mide la intensidad de la luminiscencia.

Por ejemplo, es posible que un anticuerpo conjugado con biotina reaccione con un antígeno en una muestra en fase líquida, el anticuerpo quede atrapado por partículas magnéticas unidas con estreptavidina, el anticuerpo marcado con enzima reaccione después del lavado (separación B/F), y se realiza el mismo tratamiento que el anterior.

Cuando se usa una fosfatasa alcalina (ALP) como enzima marcadora, es preferible usar CDP-Star™, AMPPD® o CSPD® como sustrato quimioluminiscente. Cuando la enzima marcadora es HRP, el luminol se usa preferiblemente como sustrato quimioluminiscente.

Generalmente se cree que la sensibilidad de detección es alta en el orden de quimioluminiscencia >fluorescencia> absorción (generación de color), y el procedimiento de medición puede seleccionarse dependiendo de la sensibilidad deseada.

El inmunoensayo de quimioluminiscencia (CLIA) es un procedimiento en el que un anticuerpo inmovilizado sobre partículas magnéticas se hace reaccionar con un antígeno en una muestra, el anticuerpo marcado con un sustrato quimioluminiscente se hace reaccionar con él seguido de lavado (separación B/F), y se mide la intensidad de la luminiscencia. Como sustancia marcadora, se usa acridinio o similar.

El inmunoensayo enzimático fluorescente (FEIA) es un procedimiento en el que se hace reaccionar un anticuerpo inmovilizado con un antígeno en una muestra seguido de una reacción con un anticuerpo marcado con enzima y lavado (separación B/F), se realiza una reacción enzimática añadiendo un sustrato fluorescente y se mide la intensidad de la fluorescencia. Como enzima marcadora, se usa HRP o ALP o similares. Cuando la enzima marcadora es HRP, Amplex®Red se utiliza como sustrato fluorescente. Cuando la enzima marcadora es ALP, se utilizan preferiblemente 4-MUP (fosfato de 4-metilumbelifenilo), AttoPhos®.

El inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) es un procedimiento en el que un anticuerpo inmovilizado en partículas magnéticas, un antígeno en una muestra y un anticuerpo marcado con una sustancia electroquimioluminiscente se hacen reaccionar entre sí seguido de lavado (separación B/F), y se mide la intensidad de luminiscencia que se origina a partir de la energía eléctrica. Como sustancia de etiquetado, se usa rutenio o similar. Como sustancia de etiquetado, se utiliza Ru(bpy)3. Según la oxidación basada en la carga sobre un electrodo y la reacción de reducción por tripropilamina (TPA), se repite la luminiscencia de excitación.

El radioinmunoensayo (RIA) es un procedimiento de medición en el que se usa un cuerpo de marcaje de un isótopo radiactivo. Por ejemplo, haciendo reaccionar un antígeno en una muestra y un anticuerpo inmovilizado en perlas y haciéndolo reaccionar con un anticuerpo marcado con un radioisótopo (125I o similar) seguido de lavado (separación B/F), se puede medir la radiactividad de 125I.

La inmunocromatografía es un procedimiento de medición inmunológica en el que se aplica un fenómeno capilar resultante de la migración de un material de prueba junto con la disolución de un reactivo en una tira de prueba. Específicamente, se forma un inmunocomplejo entre tres sustancias, es decir, el antígeno en una muestra, un anticuerpo marcado en una tira de prueba y un anticuerpo de captura, y se determina el color del producto marcado. Para marcar un anticuerpo, se utiliza oro coloide, una enzima o una sustancia fluorescente. Cuando se usa un

anticuerpo marcado con enzima, la generación de color se produce al aplicar un sustrato de enzima en una tira reactiva.

5 El procedimiento de flujo continuo es un procedimiento en el que un antígeno como sustancia de prueba forma, con una solución en una muestra, un complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo en una membrana como una membrana insoluble. En ese momento, una sustancia que no está inmovilizada en la membrana pasa generalmente en dirección perpendicular desde la superficie a la superficie posterior de la membrana y se elimina.

10 El procedimiento de aglutinación es un procedimiento en el que un antígeno en una muestra se hace reaccionar con un anticuerpo en un reactivo y se observa la aglutinación. Los ejemplos del mismo incluyen un procedimiento en el que no se usa fase sólida, un procedimiento de aglutinación de partículas (PA) en el que se usan partículas preparadas artificialmente como fase sólida, y un procedimiento de aglutinación de látex (LA) en el que se usan partículas de látex entre PA.

15 De acuerdo con el procedimiento de competición, por ejemplo, un anticuerpo se une a una fase sólida y una muestra para la prueba y una cierta cantidad de un antígeno marcado reaccionan simultáneamente y, por lo tanto, se puede medir una cantidad de antígeno en la muestra a partir de la cantidad de producto etiquetado unido.

Un anticuerpo de la presente invención puede usarse en cualquiera de los procedimientos de detección descritos anteriormente para usar en un procedimiento para detectar presepsina en una muestra o diagnosticar a un individuo sospechoso de tener sepsis.

20 La muestra utilizada para la medición de presepsina no está particularmente limitada. Sin embargo, preferiblemente es una muestra acuosa. Ejemplos de los mismos incluyen fluidos corporales tales como sangre (sangre total, plasma, suero), orina, fluidos tisulares, fluidos linfáticos, fluidos articulares, leche, líquido cefalorraquídeo, pus, saliva, líquido lagrimal, líquido mucoso, secreción nasal, esputo, líquido abdominal, líquido usado o semen, líquido de lavado después de lavar la cavidad nasal, los bronquios, el pulmón, la piel, la cavidad abdominal, varios órganos, articulaciones o huesos, sobrenadante de cultivo celular y eluyente de columna. Estas muestras se pueden utilizar para la medición directamente o después de la dilución o extracción con varios tampones seguidos de la concentración.

25 Además, en caso de utilizar sangre completa como muestra, la muestra de sangre completa se puede analizar dentro de las 72 h, dentro de las 48 h, dentro de las 24 h, dentro de las 12 h, dentro de las 6 h, o dentro de las 4 h posteriores a la recolección de la muestra de sangre completa. La recolección de la muestra de sangre completa se puede realizar usando un tubo de recolección de sangre con EDTA o tubos de recolección de sangre con heparina. Preferiblemente, la muestra de sangre completa se analiza dentro de las 6 horas posteriores a su recogida en tubos de recogida de sangre con EDTA, o dentro de las 4 horas posteriores a su recogida en un tubo de recogida de sangre con heparina.

3. Kit para medición de sCD14-ST

En el presente documento se describe un kit para medir la presepsina que tiene un anticuerpo o su fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de la primera realización como un elemento constitucional esencial.

35 El kit de medición puede incluir un reactivo auxiliar para la medición de presepsina. Los ejemplos del reactivo auxiliar incluyen un anticuerpo primario, un anticuerpo secundario, un anticuerpo marcado, una enzima marcadora, una sustancia marcadora como coloide de oro, un sustrato cromogénico, un sustrato fluorescente (Amplex® Red, AttoPhos®, 4-MUP), un sustrato quimioluminiscente (Luminol, CDP-Star™, AMPPD®, CSPD®), una sustancia aglutinante específica como biotina-estreptavidina, un portador insoluble, un agente bloqueante, una solución diluyente, un líquido de lavado y un material de referencia.

40 El reactivo auxiliar puede usarse en una combinación adecuada dependiendo del procedimiento para medir la presepsina. El anticuerpo primario es preferiblemente un anticuerpo que se une a la presepsina. Más preferiblemente, es un anticuerpo que reconoce un epítipo que es diferente del anticuerpo de la presente invención. Los ejemplos del mismo incluyen el anticuerpo F1106-13-3 y el anticuerpo F1031-8-3 que se describen en el Ejemplo 3 del documento WO 2004/044005.

Cualquiera de los anticuerpos de la presente invención y el anticuerpo primario pueden usarse como un anticuerpo marcado. Cuando ninguno de los anticuerpos de la presente invención y el anticuerpo primario está marcado, también se puede usar un anticuerpo secundario marcado.

50 Ejemplos de vehículos insolubles incluyen partículas magnéticas, perlas, vidrio, celulosa, nitrocelulosa, un polímero sintético poroso, fibra de vidrio, poliácridamida, nylon, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, placa de plástico, partículas de látex, tela no tejida, y papel de filtro.

Para el marcaje de un anticuerpo, se usa preferiblemente una enzima tal como peroxidasa (HRP), fosfatasa alcalina (ALP) y β-galactosidasa, y coloide de oro.

55 Cuando se usa HRP, por ejemplo, se pueden mencionar 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) u o-fenilendiamina (OPD) como sustrato cromogénico. Cuando se usa ALP, se puede mencionar el fosfato de p-nitrofenilo (pNPP) como sustrato

cromogénico. Cuando se usa β -galactosidasa, se ejemplifica el o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPD) como sustrato cromogénico.

5 Un kit de medición para ELISA sándwich, que puede incluir, por ejemplo, el anticuerpo de la presente invención y un anticuerpo primario (cualquier anticuerpo puede estar marcado con una enzima), un sustrato cromogénico, una solución diluyente o un material de referencia. Cuando ninguno de los anticuerpos de la presente invención y el anticuerpo primario está marcado, también se puede incluir un anticuerpo secundario marcado.

10 Un kit de medición para inmunoensayo enzimático de quimioluminiscencia (CLEIA) puede incluir, por ejemplo, un anticuerpo inmovilizado sobre partículas magnéticas, un anticuerpo marcado con enzima, un sustrato quimioluminiscente, una solución diluyente o un líquido de lavado.

Un kit de medición para inmunoensayo enzimático de fluorescencia (FEIA) puede incluir, por ejemplo, un anticuerpo inmovilizado sobre partículas magnéticas, un anticuerpo marcado con enzima, un sustrato fluorescente, una solución diluyente o un líquido de lavado.

15 Un kit de medición para inmunoensayo enzimático de electroquimioluminiscencia (ECLIA) puede incluir, por ejemplo, un anticuerpo biotilato, un anticuerpo marcado con Ru(bpy)₃, partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina o tripropilamina.

20 Un kit de medición basado en inmunocromatografía es una tira de prueba en la que se colocan una parte de adición de muestra, una parte de reactivo, una parte de detección y una parte de absorción de manera que una muestra líquida agregada a la parte de adición para la prueba se mueva en por encima de la orden. Por ejemplo, es posible proporcionar un vehículo insoluble que se una al anticuerpo primario en la parte de detección impregnando el anticuerpo secundario marcado en la parte de reactivo.

25 En cuanto a la tira reactiva, se ejemplifica el uso de un portador poroso. Ejemplos del vehículo poroso incluyen nitrocelulosa, celulosa, derivados de celulosa, nylon, fibra de nylon, fibra de vidrio y un polímero sintético poroso. Los ejemplos de la parte de absorción incluyen un polímero absorbente tal como una esponja compuesta de un material absorbente de agua, papel de filtro de celulosa y papel de filtro.

Dado que se ha informado de que la concentración sanguínea de presepsina aumenta de forma característica en un paciente con sepsis, se puede usar un kit para medir la presepsina como un kit para detectar sepsis, o un kit para ayudar a la detección o diagnóstico de sepsis.

30 Además, dicho kit para medir la presepsina se puede usar como un agente de diagnóstico para la sepsis o un agente adyuvante para el diagnóstico de la sepsis. Cuando se usa con el propósito de detectar sepsis o ayudar al diagnóstico, se determina que un sujeto tiene la posibilidad de sepsis cuando la concentración de presepsina en una muestra de un sujeto medida usando el anticuerpo de la presente invención es un valor mayor que un valor de corte, y esto puede ayudar a la detección o al diagnóstico. En un aspecto, el valor de corte puede ser de 314 a 600 pg/ml, preferiblemente de 400 a 580 pg/ml, más preferiblemente de 450 a 550 pg/ml y más preferiblemente de 500 pg/ml.

35 Además, se puede utilizar un kit para medir la presepsina para la detección o evaluación de al menos una enfermedad seleccionada entre tales como, discriminación entre sepsis y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), evaluación del riesgo de la gravedad de la sepsis, predicción pronóstica de sepsis (predicción de mortalidad), evaluación del grado de gravedad séptica, detección de infecciones del sitio quirúrgico, detección de coagulación intravascular diseminada (DIC), detección de DIC infecciosa, detección de enfermedad cardíaca, detección de infecciones respiratorias asociadas con infección bacteriana, detección de la enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), detección de neutropenia febril (FN), detección del síndrome hemofagocítico (HPS) y evaluación de la función del fagocito. El kit para medir la presepsina puede ser un kit para la detección o evaluación de al menos una enfermedad descrita anteriormente.

4. Polinucleótido que codifica el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de unión al antígeno del mismo de la invención

45 En el presente documento se describe un polinucleótido o un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o su fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de la invención. El polinucleótido incluye ADN (ADN genómico, ADNc, ADN sintético) y ARN (ARNm). El polinucleótido puede ser cualquiera de una sola cadena (codificante o antisentido) y una doble cadena. Por ejemplo, es posible que el ARNm se extraiga de un hibridoma que produzca el anticuerpo de la presente invención utilizando un kit disponible comercialmente y se sintetice el ADNc. Un gen diana puede amplificarse mediante el procedimiento de PCR.

50 El anticuerpo de la presente invención puede tener una identidad de al menos 80 % o más con la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o la Cadena liviana de la región variable. Con respecto a la secuencia de CDR, puede tener una identidad de al menos 80 % o más con la secuencia de nucleótidos que codifica la CDR completa de un anticuerpo (VH CDR1 a 3 y VL CDR1 a 3). Desde el punto de vista de la sensibilidad de detección, puede exhibir la identidad del 85 % o más, la identidad del 90 % o más, la identidad del 95 % o más, la identidad del 96 % o más, la identidad del 97 % o más, la identidad del 98 % o más, o la identidad del 99 % o más. Además, de acuerdo con una determinada realización, también se incluye en el anticuerpo de la presente invención un anticuerpo

codificado por una secuencia de nucleótidos que se hibrida, en condiciones restrictivas, con una secuencia complementaria de la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o la Cadena liviana.

5 La hibridación se puede realizar mediante un procedimiento conocido o un procedimiento basado en él, por ejemplo, un procedimiento descrito en Molecular Cloning 3rd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001).

10 Las condiciones restrictivas indican las condiciones en las que se forma un híbrido específico mientras que no se forma un híbrido no específico. Las condiciones restrictivas típicas incluyen, por ejemplo, realizar la hibridación a una concentración de potasio de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 50 mM y una concentración de magnesio de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 5,0 mM. Una persona experta en la técnica puede seleccionar fácilmente las condiciones modificando la reacción de hibridación o la concentración de sal de una solución de reacción para la hibridación.

5. Polinucleótido que contiene vector recombinante descrito en este documento

15 En el presente documento se describe un vector introducido con un polinucleótido que codifica el aminoácido de un anticuerpo o el fragmento de antígeno de unión al anticuerpo de la presente invención. El vector es preferiblemente un vector y/o un vector de expresión adecuado para la expresión del gen del anticuerpo que se describe en este documento. Puede producirse mediante una técnica que puede utilizar un experto en la materia.

6. Células que producen el anticuerpo o el fragmento de antígeno de unión al anticuerpo de la invención

20 En el presente documento se describen células que producen el anticuerpo o su fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de la presente invención. Los ejemplos de las células incluyen un hibridoma, un transformante y células genéticas recombinantes introducidas con el gen del anticuerpo de la presente invención.

Ejemplos específicos del hibridoma para producir un anticuerpo incluyen un clon descrito en el Ejemplo 1.

Se puede obtener un transformante introduciendo un vector introducido con el polinucleótido que codifica el aminoácido del anticuerpo anterior o su fragmento de antígeno de unión al anticuerpo de la presente invención a la célula huésped descrita en este documento (por ejemplo, células COS-1 y CHO células).

25 El procedimiento para producir un hibridoma o un transformante puede ser el mismo que los descritos anteriormente.

7. Procedimiento para producir el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo que se une al antígeno utilizando un transformante

30 En el presente documento se divulga un procedimiento para producir un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno que incluye una etapa de cultivo de un transformante que contiene un vector introducido con un nucleótido que codifica el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de la invención.

Se produce un anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de la invención en un cultivo del transformante y se recoge del cultivo un anticuerpo o su fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de la primera realización. Los procedimientos usados pueden ser los mismos que los descritos en este documento.

8. Procedimiento de cribado de anticuerpos anti-presepsina

35 En el presente documento se describe un procedimiento para cribar un anticuerpo para obtener un anticuerpo anti-presepsina útil para medir la presepsina en una muestra, en el que el procedimiento incluye al menos los siguientes pasos;

- paso de construcción de un sistema de medición de presepsina utilizando un anticuerpo de un candidato,

40 - paso para determinar la influencia de la concentración de TG en una muestra en un valor de medición de presepsina mediante el uso del sistema de medición.

En otras palabras, el procedimiento se caracteriza porque se realiza una prueba de interferencia de TG con un sistema de medición que usa un anticuerpo. El procedimiento para obtener un anticuerpo candidato (preferiblemente, anticuerpo anti-presepsina) puede ser el mismo que los descritos anteriormente. El sistema de medición de presepsina es un sistema de medición que permite medir el valor de presepsina en una muestra y no está particularmente limitado. Ejemplos del mismo incluyen, pero no se limitan a, el sistema de medición descrito en la segunda realización y, por ejemplo, se puede usar ELISA sándwich.

50 Con respecto al paso de determinar la influencia de la concentración de TG en una muestra sobre un valor de medición de presepsina, la influencia se puede determinar en vista de la separación entre los dos valores de medición, es decir, con base en la comparación entre la medición valor de presepsina en una muestra sin TG y el valor de medición de presepsina en la misma muestra con una cierta cantidad de TG añadido. Por ejemplo, cuando la prueba de interferencia de TG se realiza usando múltiples muestras, y la proporción de una muestra que exhibe el grado de separación del valor de medición de presepsina en el momento de tener una concentración de TG de 20 mg/ml en

una muestra en comparación con el valor de medición de presepsina en el momento de no agregar ningún TG es $\pm 20\%$ o menos y más preferiblemente $\pm 10\%$ o menos es alto, se puede determinar que la influencia de TG en una muestra sobre el valor de medición de presepsina es pequeña, y también se puede determinar, ya que es poco probable que se vea influenciado por la interferencia de TG, el anticuerpo es útil para la medición de presepsina.

Alternativamente, como otro procedimiento de evaluación, la evaluación se puede realizar comparando el grado de separación después de realizar la prueba de interferencia de TG usando un anticuerpo candidato y un anticuerpo S68. Como realización preferida, cuando la separación del valor de medición de la presepsina en el momento de realizar una prueba de interferencia de TG mediante el uso de un anticuerpo candidato es similar al grado de separación del anticuerpo S68 en las mismas condiciones, el anticuerpo se puede encontrar como un anticuerpo útil para medir presepsina en una muestra. Como ejemplo, para un sistema de medición en el que la prueba de interferencia de TG se realiza usando múltiples muestras y se usa un anticuerpo candidato, una diferencia entre el grado de separación al tener una concentración de TG de 20 mg/ml en una muestra después de agregar TG y se determina el grado de separación del sistema de medición usando el anticuerpo S68 en las mismas condiciones, y si la proporción de una muestra que presenta la diferencia en el grado de separación del 20 % o menos, y preferiblemente del 10 % o menos, es alta, se puede determinar que el anticuerpo es un anticuerpo útil para medir la presepsina en una muestra.

El procedimiento de cribado puede incluir opcionalmente una etapa de determinación de la actividad de unión entre un anticuerpo candidato y el péptido S68 o la presepsina. Además, el procedimiento de detección de la presente invención puede incluir opcionalmente un paso de medir una muestra de una persona normal (es decir, una persona que no es séptica) y un paciente que tiene sepsis mediante el uso del sistema de medición de presepsina usando un anticuerpo candidato y comparando una diferencia en los valores de medida. En una realización, el cribado se puede realizar de acuerdo con las descripciones del Ejemplo 1.

El procedimiento de cribado puede ser un procedimiento que comprenda al menos los siguientes pasos:

1) un paso para obtener un anticuerpo anti-presepsina candidato usando el proceso de producción y similares descritos en la primera realización de la presente invención, y

2) un paso de construcción de un sistema de medición de presepsina usando el anticuerpo candidato, y seleccionando el anticuerpo que tiene una relación de detección del 50 % o más, mostrando un grado de separación del valor de medición de presepsina de $\pm 20\%$ o menos, cuando la concentración de TG es ajustado a 20 mg/ml mediante la adición de TG.

En este procedimiento, la concentración de TG (en este documento, 20 mg/ml) en una muestra, un grado de separación del valor de medición de presepsina (en este documento, $\pm 20\%$) y la proporción de la muestra se pueden cambiar de forma apropiada. Alternativamente, la etapa (2) también se puede realizar reemplazándola con otras pruebas de interferencia de TG y/o procedimientos de evaluación, descritos en la primera realización de la presente invención.

Se describe adicionalmente en el presente documento un procedimiento de cribado del anticuerpo de la presente invención que comprende al menos los siguientes pasos:

1) un paso para obtener un anticuerpo anti-presepsina candidato, y

2) un paso para determinar si el anticuerpo reconoce específicamente una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 como un epítipo o no.

En este procedimiento, el paso (2) puede ser un procedimiento para determinar un epítipo descrito anteriormente que se puede usar, sin ninguna limitación.

Por ejemplo, el paso (2) puede comprender además el siguiente paso:

2) un paso de selección del anticuerpo, en el que la unión entre el anticuerpo y la presepsina se inhibe competitivamente en un 50 % o más en un sistema de reacción en el que una secuencia de residuos de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 1 se somete a una reacción competitiva (absorbancia) de modo que se inhiba la unión entre dicho anticuerpo y presepsina.

El siguiente paso (3) se puede añadir opcionalmente al procedimiento de determinación de un epítipo:

3) un paso de selección del anticuerpo en el que se completa la inhibición de la unión entre dicho anticuerpo y la presepsina debido a al menos una de las secuencias de residuos de aminoácidos que consisten en las SEQ ID Nos: 35, 36, 37, 38, 39, 40 y 41 es inferior al 20 %, en un sistema de reacción en el que una secuencia de residuos de aminoácidos se somete a una reacción competitiva (absorbancia) de modo que se inhiba la unión entre dicho anticuerpo y la presepsina.

Además, un procedimiento de cribado del anticuerpo de la presente invención puede comprender al menos los siguientes pasos:

1) un paso para obtener un anticuerpo anti-presepsina candidato utilizando el proceso de producción descrito anteriormente, y

5 2) un paso de selección de dicho anticuerpo en el que un coeficiente de correlación con el valor de medición de presepsina en una muestra que usa el anticuerpo S68 exhibe 0,9 o más.

Este procedimiento se puede llevar a cabo de acuerdo con las descripciones descritas anteriormente y el Ejemplo 5. También se puede cambiar apropiadamente un coeficiente de correlación.

Además, en el presente documento se describe un procedimiento de cribado del anticuerpo de la presente invención que comprende al menos los siguientes pasos:

10 1) un paso para obtener un anticuerpo anti-presepsina candidato, y
2) una etapa de selección de un anticuerpo que se une con presepsina en afinidad (constante de disociación de equilibrio, valor KD) de menos de 10^{-8} M.

Alternativamente, el paso (2) se puede reemplazar con el siguiente paso:

15 2) un paso de selección de un anticuerpo en el que la actividad de unión del anticuerpo con presepsina es excelente en comparación con la actividad de unión del anticuerpo S68 con presepsina.

Es posible llevar a cabo la medición de la afinidad (constante de disociación de equilibrio, valor KD) y la actividad de unión de acuerdo con la descripción anterior de la presente invención. La actividad de unión puede evaluarse mediante una relación de absorbancia. Preferiblemente, una relación de absorbancia cuando reaccionan el anticuerpo de la presente invención y la presepsina es 2 o más, cuando se encuentra que la absorbancia del anticuerpo S68 y la presepsina es 1.

El procedimiento de cribado del anticuerpo de la presente invención como se describe anteriormente se puede llevar a cabo combinando los pasos respectivos. Una combinación preferida es, por ejemplo, la siguiente:

Un procedimiento de cribado de un anticuerpo anti-presepsina que comprende al menos los siguientes pasos:

25 1) un paso para obtener un anticuerpo anti-presepsina candidato,
2) un paso de selección del anticuerpo en el que la unión entre dicho anticuerpo y presepsina es competitiva-inhibida en un 50 % o más en un sistema de reacción (preferiblemente, absorbancia) al que se somete una secuencia de residuos de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 1 a una reacción competitiva de modo que se inhiba la unión entre dicho anticuerpo y presepsina, y
30 3) un paso de selección de un anticuerpo en el que la actividad de unión del anticuerpo con presepsina es excelente en comparación con la actividad de unión del anticuerpo S68 con presepsina.

9. Procedimiento de tratamiento del paciente con sepsis

Se describe en este documento un procedimiento para tratar a un paciente con sepsis que comprende realizar un tratamiento de sepsis en un sujeto que ha sido sometido a un procedimiento para ayudar a la detección de sepsis usando un anticuerpo de la invención o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo.

35 El procedimiento para ayudar a la detección de sepsis puede ser el mismo que el descrito anteriormente. El tratamiento de la sepsis incluye la administración de un agente antibacteriano o un esteroide, un vasopresor, una solución de refuerzo, la administración de oxígeno, el manejo de la respiración artificial, la diálisis de filtración sanguínea sostenida y el intercambio de plasma.

10. Procedimiento de prueba de detección de fármacos (o terapéuticos)

40 En el presente documento se divulga un procedimiento de cribado de un fármaco de prueba (o terapéutico), que comprende un paso para determinar la concentración de presepsina en una muestra de un sujeto al que se le ha administrado un fármaco de prueba (o terapéutico), utilizando un anticuerpo de la invención o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo, o un kit del mismo. Una enfermedad a la que se dirige un fármaco de prueba no está particularmente limitada siempre que sea una enfermedad en la que se incrementa la concentración de presepsina en una muestra de un sujeto. Preferiblemente, la concentración de presepsina en una muestra de un sujeto se compara entre antes y después de la administración del fármaco de prueba para determinar si la concentración de presepsina después de la administración del fármaco de prueba se reduce en comparación con antes de la administración o no. Alternativamente, se puede determinar si la concentración de presepsina en una muestra de un sujeto después de la administración del fármaco de prueba se reduce en comparación con una persona normal que no ha recibido el fármaco de prueba.

En el presente documento se describe un procedimiento de cribado de un fármaco de prueba que comprende el siguiente paso: 1) un paso para determinar la concentración de presepsina en una muestra de un sujeto al que se le ha administrado un fármaco de prueba.

5 11. rsCD14ST-Fc

El rsCD14ST-Fc tiene una estructura que comprende una secuencia de la Posición 1 a la Posición 64 de la SEQ ID NO: 3 (CD14 soluble de longitud completa humana), y una región Fc de una cadena pesada de anticuerpo. rsCD14ST-Fc se puede obtener, por ejemplo, mediante la transfección de un plásmido para expresión transitoria que expresa rsCD14ST-Fc, que tiene una secuencia que tiene una secuencia de reconocimiento de trombina aguas abajo de una secuencia de la Posición 1 a la Posición 64 de la sCD14 humana, y una secuencia de una Región Fc de la cadena pesada de un anticuerpo IgG1 de origen humano, en una célula huésped como una célula COS-1, cultivando la célula huésped y recuperando y purificando el sobrenadante de cultivo resultante.

Es deseable que se inserte una secuencia que facilite el corte entre una secuencia de la Posición 1 a la Posición 64 de sCD14 y Fc humanos, y además de una secuencia de reconocimiento de trombina, por ejemplo, pueden usarse sin limitación particular una secuencia de reconocimiento de Factor Xa, una Proteasa de PreScission que reconozca secuencia y similares. No es esencial que rsCD14ST-Fc tenga una secuencia que facilite el corte.

La región Fc de una cadena pesada de anticuerpo en rsCD14ST-Fc no está limitada. Además de una región Fc derivada de un anticuerpo IgG1 de origen humano, se pueden usar regiones Fc de todos los demás anticuerpos conocidos. La célula huésped tampoco está particularmente limitada.

Dado que rsCD14ST-Fc se obtiene cultivando una célula huésped como una célula COS-1, la expresión es fácil, y dado que Fc se une específicamente a la proteína A, y se puede usar una columna de proteína A para la purificación, tiene una ventaja en la producción puesto que esa purificación también es fácil. La purificación después del corte de una región Fc es posible usando el procedimiento convencional además de la columna de Proteína A, y la purificación puede realizarse, por ejemplo, usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 13 del documento WO 2005/108429.

RsCD14ST-Fc también puede usarse como rsCD14-ST cortando una región Fc, o puede usarse como rsCD14ST-Fc sin cortar la región Fc, y ambos se unen específicamente a un anticuerpo anti-presepsina.

El rsCD14ST-Fc elaborado en el Ejemplo 9-(2) tiene la misma secuencia de trombina que la de un estándar rsCD14-ST, que se inserta entre rsCD14ST y Fc. rsCD14ST obtenido cortando una región Fc con trombina tiene la misma secuencia que la de un estándar rsCD14ST y tiene propiedades equivalentes (véase WO 2005/108429).

En la preparación de rsCD14 a partir de rsCD14ST-Fc, después de cortar el Fc, solo el Fc puede eliminarse fácilmente haciéndolo pasar a través de una columna de Proteína A, y la preparación también es fácil. Se puede seleccionar apropiadamente un medio para cortar una región Fc de rsCD14ST-Fc de acuerdo con una secuencia insertada que facilite el corte.

Dado que rsCD14ST-Fc tiene la actividad de rsCD14-ST sin cortar la región Fc, puede utilizarse como antígeno.

El estándar rsCD14-ST anterior se obtiene expresando rsCD14 en el que se inserta un sitio de reconocimiento de trombina entre la Posición 64 y la Posición 65 de la sCD14 humana, en una célula huésped, y cortando el rsCD14 en un sitio de reconocimiento de trombina. Una estructura de rsCD14 comprende rsCD14-ST, pero muestra poca reactividad como rsCD14-ST. Solo después del corte y la purificación, el rsCD14-ST obtiene una actividad que se vuelve utilizable. Por otro lado, dado que rsCD14ST-Fc se puede usar como rsCD14-ST o un estándar, independientemente de si se corta la región Fc. Por lo tanto, la operación de corte se puede omitir y se puede utilizar de forma sencilla.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de anticuerpo monoclonal contra péptido sintético como antígeno 1-(1) Inmunización de conejo

La producción de un antígeno de administración y la inmunización de un conejo se realizaron de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 del documento WO 2004/044005 A1. Específicamente, el péptido fue producido por el péptido en el que se insertó cisteína en el N-terminal de un péptido (en adelante, descrito como péptido S68) que consiste en la secuencia descrita en SEQ ID NO: 2 (correspondiente a la secuencia de la Posición 53 a la Posición 68 descrita en SEQ ID NO: 3). Este péptido se unió a KLH (PIERCE) y se usó como un antígeno de administración (en lo sucesivo, descrito como péptido S68-KLH).

Se mezclaron 100 µg de péptido S68-KLH con el mismo volumen de adyuvante completo de Freund (DIFCO) y se administraron por vía intradérmica al lomo de un conejo blanco de Nueva Zelanda (tres meses de edad). Dos semanas después y también una semana después, se mezclaron 100 µg de péptido S68-KLH con el mismo volumen de adyuvante incompleto de Freund (DIFCO) y se administraron por vía intradérmica en el lomo. Además, se administraron dos veces 20 µg de péptido S68-KLH en la vena de la oreja.

Una semana después de la finalización de la administración, se tomaron muestras de sangre de la vena de la oreja y se separó el antisuero de acuerdo con un procedimiento estándar, y se determinaron el título de anticuerpos y la reactividad para la presepsina usando ELISA sándwich. Específicamente, se inmovilizó F1106-13-3 en una INMUNO PLATE (MAXISORP, C96, 430341, fabricado por Nunc) y se bloqueó. Cada antisuero de conejo se diluyó con D-PBS (pH 7,4) y se sometió a una dilución en serie cuadrática de $x1/1000$ a $x1/32000$ veces (8 puntos). El estándar de referencia de presepsina (rsCD14-ST descrito en el Ejemplo 16 del documento WO 2005/108429) se diluyó con una solución de dilución (BSA al 0,1 %/D-PBS) para preparar una solución estándar de 3 ng/ml. Después de añadir la serie de diluciones de antisuero a una placa, se añadió posteriormente a la misma una solución estándar de 3 ng/ml. La placa se incubó durante una hora y, posteriormente, la placa se lavó cinco veces con solución salina fisiológica que contenía Tween 20 al 0,05 %. A continuación, se añadieron 100 μ l de una solución obtenida diluyendo Ig-HRP anti-conejo (DAKO, P448) y se incubó la placa durante una hora a 25 °C. Después de lavar de forma similar la placa cinco veces, se añadió una solución de tetrametilbencidina (TMB, fabricada por BioFix) y se hizo reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez que se completó la reacción, la reacción se terminó con una solución de ácido sulfúrico 1 M. La absorbancia a 450/650 nm se midió usando Multiskan JX (fabricado por Thermolab Systems). Basándose en el resultado de la medición de la absorbancia, se seleccionó una pieza con un título de anticuerpos alto.

Cuatro días antes de recolectar un bazo, se administraron 400 μ g de péptido S68-KLH en la vena de la oreja. Después de la recolección aséptica del bazo, se recuperaron los linfocitos.

1-(2) Fusión y clonación celular

De acuerdo con el procedimiento descrito en la Patente de Estados Unidos No. 7429487, se mezclaron entre sí 2×10^8 células de los linfocitos y 1×10^8 células de linfocitos B inmortalizados derivados de un conejo para el asociado de fusión, y se realizó la fusión celular en dos tiempos divididos. Las células fusionadas se sembraron en una placa de 96 pocillos y se cultivaron de acuerdo con un procedimiento general.

Con respecto al sobrenadante de cultivo de los 286 clones obtenidos, se determinó la actividad de unión para el antígeno administrado usando péptido S68-BSA, y se seleccionaron 72 clones con actividad de unión confirmada.

Con respecto a los 72 clones que tienen actividad de unión confirmada para el antígeno administrado, la actividad de unión para un patrón de referencia de presepsina se determinó mediante el sistema ELISA sándwich, que es el mismo que 1-(1), y se seleccionaron los clones con actividad de unión confirmada.

Con respecto a los clones con actividad de unión confirmada para un patrón de referencia de presepsina, se determinó la especificidad para la presepsina en la sangre de un paciente. Específicamente, tres sueros de una persona normal (comprados en ProMedDx) y tres sueros de un paciente con sepsis (comprados en Bioreclamation) se diluyeron cinco veces con una solución diluyente y se determinaron mediante el sistema ELISA sándwich, que es lo mismo que 1-(1). Como resultado, se seleccionaron cinco clones en los que la reactividad con un patrón de referencia de presepsina es buena, la absorbancia no aumenta en una muestra de una persona normal y la absorbancia aumenta en una muestra del paciente que tiene sepsis. Cada clon se clonó mediante dilución limitante y se preparó cada ampolla congelada.

1-(3) Análisis para el modo de unión por BIACORE

Para determinar el modo de unión entre cada anticuerpo que se ha obtenido del clon seleccionado y la presepsina, se realizó el análisis usando BIACORE3000 (fabricado por GE Health Care). En un chip CM5 (fabricado por GE Health Care), el anticuerpo F1106-13-3 se inmovilizó mediante un procedimiento estándar y se añadió además con un estándar de referencia de presepsina (1 μ g/ml). Se añadió adicionalmente sobrenadante de cultivo diluido (0,5 μ g/ml) y se representó un sensorgrama. Todos los clones exhibieron un buen modo de unión del que no se observó disociación en la fase de disociación.

1-(4) Preparación de anticuerpo monoclonal de conejo

Mediante el uso del hibridoma obtenido que produce un anticuerpo monoclonal anti-presepsina de conejo, se produjo un anticuerpo monoclonal de conejo. Específicamente, de acuerdo con un procedimiento estándar, la ampolla congelada se descongeló y las células se recolectaron después de cultivarlas en RPMI1640 (fabricado por Sigma) que contenía 10 % de suero bovino fetal y 8 % de suplemento A (fabricado por Abcam), y las células se cultivaron utilizando medio IS-MAB-CD (fabricado por Irvine) según el protocolo de CELLline (fabricado por Integra Bioscience), y se recogió el sobrenadante del cultivo que contenía el anticuerpo. A continuación, a partir del sobrenadante del cultivo obtenido, se purificó el anticuerpo utilizando rmp-Proteína A Sepharose FF (fabricada por GE Health Care). La solución eluida que contenía el anticuerpo purificado se concentró y posteriormente se dializó frente a D-PBS (pH 7,4). La concentración de proteína del anticuerpo se midió mediante el procedimiento de Bradford usando IgG bovina (fabricada por BioRad) como estándar. El anticuerpo obtenido se analizó mediante SDS-PAGE y, como resultado, se identificó una única banda con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa. Además, como resultado de la reducción, se identificaron una cadena pesada de aproximadamente 50 kDa y una Cadena liviana de aproximadamente 25 kDa.

Ejemplo 2: Producción de anticuerpo recombinante**2-(1) Construcción de plásmido para expresión y determinación de secuencia de aminoácidos en región variable de anticuerpo monoclonal de conejo**

De cada hibridoma obtenido en el Ejemplo 1, se extrajo el ARN total usando RNeasy Mini Kit (fabricado por Quiagen) y se sintetizó un ADNc monocatenario usando el Kit de Síntesis de ADNc SuperScript VILO (fabricado por Invitrogen). Mediante el uso del Rabbit Ig-Primer Set (Rader C, et al. JBC 2000; 275: 13668-76, and Lang I, et al. Gene 1996; 172: 295-8) que usa el ADNc monocatenario obtenido como plantilla, la región variable se amplificó mediante PCR y la secuencia de nucleótidos de cada región variable de la cadena pesada y la Cadena liviana se determinó mediante un procedimiento estándar.

Se realizó una búsqueda en la base de datos con respecto a la información de secuencia distinta de la región variable y se diseñaron el cebador del lado 5' y el cebador del lado 3'. Mediante el uso de esos cebadores, se realizó PCR para amplificar cada una de la cadena pesada de longitud completa y la cadena liviana de longitud completa, que luego se clonaron en pTK-2433 que tenía el promotor EF-1 α y el potenciador de CMV, es decir, un vector para la expresión transitoria en células mamíferas. De acuerdo con un procedimiento estándar, se determinaron la secuencia de nucleótidos de cada una de la cadena pesada de longitud completa y la Cadena liviana de longitud completa y la secuencia de aminoácidos codificada por ellas. Las secuencias de aminoácidos de la parte CDR de la región variable del anticuerpo se ilustran en la Tabla 10 (Cadena pesada) y la Tabla 11 (cadena liviana).

Tabla 10

Nombre del anticuerpo	Cadena pesada		
	CDR1	CDR2	CDR3
F 1466-5	RYAMG SEQ ID NO.: 4	IYRNIKTYATWAKG SEQ ID NO.: 5	GDF
F 1466-26	RYTMG SEQ ID NO.: 7	IINSGATYYASWAKG SEQ ID NO.: 8	GDF
F 1466-16	SFWMS SEQ ID NO.: 10	IISDIDDLFYASWAKG SEQ ID NO.: 11	GGL
F 1466-12	SYDMI SEQ ID NO.: 13	YIGSPGTTYGWSWAKG SEQ ID NO.: 14	SGDITNRFNL SEQ ID NO.: 15
F 1466-19	NYDMI SEQ ID NO.: 16	YIGSPGTTYASWAKG SEQ ID NO.: 17	SGDITNRFNL SEQ ID NO.: 18

Tabla 11

Nombre del anticuerpo	Cadena liviana		
	CDR1	CDR2	CDR3
F 1466-5	QASEDIISNLA SEQ ID NO.: 19	KASTLAS SEQ ID NO.: 20	QSSYTESTTFGHV SEQ ID NO.: 21
F 1466-26	QASQSIGSNLA SEQ ID NO.: 22	KASKLAS SEQ ID NO.: 23	QCSYT AIGNYGHV SEQ ID NO.: 24
F1466-16	QASQSI SNLA SEQ ID NO.: 25	KTSTLES SEQ ID NO.: 26	QSTYYRSTTTYGNT SEQ ID NO.: 27
F1466-12	QASERIRNWL SEQ ID NO.: 28	RASTLES SEQ ID NO.: 29	QCSAGGNAGNA SEQ ID NO.: 30
F1466-19	QASERIRNWL SEQ ID NO.: 31	RASTLES SEQ ID NO.: 32	QCSAGGNAGNG SEQ ID NO.: 33

2-(2) Preparación de anticuerpo recombinante para expresión transitoria

Los plásmidos para expresión transitoria que se han producido en 2-(1) anterior (el plásmido de expresión que contiene la secuencia de la cadena pesada y el plásmido de expresión que contiene la secuencia de la cadena liviana) se mezclaron entre sí en la misma cantidad y se transfectaron células COS-1 (ATCC: CRL-1650) con la mezcla. Específicamente, después de mezclar el reactivo de transfección a 2 μ l/ml y el plásmido a 4 μ g/ml y añadirlos al medio,

se añadieron células COS-1 y se cultivaron a 37 °C. Setenta y dos horas más tarde, se recogió el sobrenadante del cultivo y se añadió de nuevo a un medio nuevo. Noventa y seis horas después, se recogió el sobrenadante del cultivo y las fracciones obtenidas mediante dos recogidas se mezclaron y filtraron a través de un filtro de 0,22 µm (Sterivac, fabricado por Millipore). El sobrenadante del cultivo obtenido se purificó mediante el procedimiento descrito en 1-(4) anterior, y como resultado del análisis por SDS-PAGE, se identificó un anticuerpo recombinante que mostraba una única banda a aproximadamente 150 kDa.

2-(3) Construcción de plásmido para expresión estable de anticuerpo recombinante

Mediante el uso de una enzima de restricción, el fragmento del gen que codifica la cadena pesada y el fragmento del gen que codifica la cadena liviana se digirieron de los plásmidos para la expresión transitoria que se han producido en 2-(2) anterior, y se unieron al plásmido (pTK-2577; descrito en JP 2007-215546 A) que contiene el promotor EF-1α y la unidad de expresión DHFR de ratón [promotor SV40 como promotor (no contiene una región potenciadora), señal poliA derivada de SV40] para producir un plásmido para expresión estable en células de animales mamíferos.

Ejemplo 3: Fabricación de anticuerpos por células CHO

3-(1) Preparación de células CHO recombinantes de producción de anticuerpos de anticuerpos monoclonales de conejo

Se transfectaron células CHO deficientes en el gen DHFR (CHO DXB11) con el plásmido para una expresión estable que se ha construido en 2-(3) anterior, y se establecieron células CHO transformadas que producían un anticuerpo de conejo. Específicamente, CHO DXB11 que ha sido aclimatado y cultivado con EX-CELL 302 PF CHO (fabricado por JRH Bioscience) que contiene el Suplemento de medio HT (50 ×) Hybri-Max (fabricado por Sigma; usado a 1 × concentración final) y 200 mM L-glutamina (fabricada por Sigma; se usó a una concentración final de 4 mM) se centrifugó el día de la transfección y se inoculó en un matraz a la concentración de 8×10^6 células/150 cm² de Roux. Usando 125 µl de FuGENE6 (fabricado por Promega), se prepararon 12,5 µg del plásmido de expresión de acuerdo con el protocolo adjunto a FuGENE6 y luego se introdujeron en el CHO DXB11. Después de cultivar durante dos días a 37 °C, 5 % de CO₂, las células se recogieron y lavaron dos veces con medio EX-CELL 302 PF CHO sin HT que contenía L-glutamina 4 mM (a continuación, descrita como EX-CELL (HT-)) y resuspendido en EX-CELL (HT-). A continuación, las células se sembraron de nuevo en una placa de 96 pocillos a 12500 a 50000 células/pocillo y se cultivaron continuamente a 37 °C, 5 % de CO₂. La mitad del volumen del medio se reemplazó con EX-CELL (HT-) reciente cada tres o cuatro días. Después de continuar el cultivo durante aproximadamente dos semanas, las células dentro de un pocillo que presentaba una colonia se transfirieron a una nueva placa.

El anticuerpo en el sobrenadante del cultivo de células CHO se rastreó mediante el procedimiento ELISA que usa el antígeno del péptido S68 como fase sólida, y luego se seleccionaron cinco tipos de células CHO que producen un anticuerpo que se une al péptido S68.

3-(2) Amplificación de genes utilizando metotrexato

Al realizar un proceso de amplificación génica, las células CHO transformadas para expresar el anticuerpo recombinante obtenido de 3-(1) se seleccionaron y cultivaron en medio EX-CELL (HT-) que contenía metotrexato (en lo sucesivo, descrito como MTX), clones en los que se selecciona la cantidad de producción de un anticuerpo recombinante diana. Específicamente, las células transformadas obtenidas del Ejemplo 3-(1) se suspendieron en medio EX-CELL (HT-) que contenía MTX 30 nM y luego se extendieron en una placa de 96 pocillos. La mitad del volumen del medio se reemplazó cada tres o cuatro días con EX-CELL (HT-) reciente que contenía MTX 30 nM y se continuó el cultivo a 37 °C, CO₂ al 5 % hasta que se generó una colonia. La concentración de IgG en el sobrenadante del cultivo de la colonia obtenida se determinó mediante el procedimiento ELISA y se seleccionaron los clones que presentaban una mayor cantidad de producción. Como resultado, se obtuvo el transformante que exhibía la cantidad de producción aumentada de dos a diez veces. Mientras tanto, sometiendo el transformante con gen amplificado a selección y cultivo repetidos en un medio en el que la concentración de MTX se incrementa de tres a diez veces, fue posible obtener los clones con una cantidad de producción adicionalmente aumentada.

3-(3) Producción de anticuerpos recombinantes por células CHO

Los clones obtenidos de 3-(2) se inocularon en medio CHO-SFM (HT-) (fabricado por GIBCO) que contenía MTX 30 nM para tener 1×10^5 células/ml y se cultivaron durante siete días a 37 °C. El sobrenadante de cultivo obtenido se utilizó para purificar el anticuerpo. El anticuerpo se purificó del sobrenadante del cultivo utilizando una columna de Proteína A (Prosep-A, fabricada por Millipore). Como resultado del análisis del anticuerpo recombinante purificado por SDS-PAGE, se identificó un anticuerpo que mostraba el mismo peso molecular que el anticuerpo derivado del hibridoma.

Ejemplo 4: Evaluación de la reactividad de cada anticuerpo en un sistema ELISA sándwich

Se evaluó la reactividad con presepsina para 5 tipos de anticuerpos monoclonales de conejo preparados en el Ejemplo 2, anticuerpo S68 descrito en el Ejemplo 1 de WO 2004/044005 A1 (anticuerpo policlonal obtenido por inmunización de un conejo con péptido S68) y F1146-17-2 descrito en el Ejemplo 2 del documento WO 2004/044005 A1 (anticuerpo

monoclonal obtenido por inmunización de una rata con péptido S68). Específicamente, cada anticuerpo se diluyó a 5 µg/ml con PBS (pH 7,4) y se añadieron 50 µl del mismo a cada pocillo de una inmunoplaaca (Maxisorb, fabricado por NUNC). Después de la reacción durante la noche a 4 °C, se realizó un lavado con agua de intercambio iónico cinco veces y el bloqueo se realizó agregando a cada pocillo 200 µl de PBS que contenía StabilGuard al 0,1 % (fabricado por SurModics, Inc) y Tween 20 al 0,1 % (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). A continuación, el estándar de referencia de presepsina se diluyó a 1000 ng/ml usando una solución diluyente y posteriormente se diluyó en una proporción de tres veces para preparar una dilución en serie del material de referencia. La dilución en serie del estándar de referencia se añadió en una cantidad de 50 µl por pocillo y se hizo reaccionar durante una hora a 25 °C. Una vez completada la reacción, se lavó cinco veces con solución salina fisiológica que contenía Tween 20 al 0,05 %, y se añadieron a cada pocillo 50 µl de anticuerpo F1106-13-3 marcado con peroxidasa que se había diluido a 0,25 µg/ml. Después de la reacción durante dos horas a 25 °C, se realizó un lavado cinco veces de la misma manera que anteriormente y se añadió una solución de TMB a cada pocillo. Después de la reacción durante 20 min a temperatura ambiente, la reacción se terminó usando una solución de ácido sulfúrico 0,5 M y se midió la absorbancia a 450 nm (sublongitud de onda de 650 nm) usando un espectrofotómetro de placa (fabricado por Molecular Devices).

Los resultados de la medición se muestran en la Tabla 12. Cualquier sistema de medición que use cada anticuerpo monoclonal de conejo preparado en el Ejemplo 2 tuvo una reactividad excelente con el estándar de referencia de presepsina y mostró una reactividad casi equivalente a la del sistema de medición que usa el anticuerpo S68.

Por otro lado, el sistema de medición que usa F1146-17-2 mostró una baja reactividad y 0,368 de absorbancia cuando la concentración de presepsina fue de 1000 ng/ml. Esta absorbancia fue casi equivalente a la absorbancia mostrada cuando la concentración de presepsina fue de 0,03 a 0,1 ng/ml en el sistema de medición que usa el anticuerpo monoclonal de conejo. Como se indicó anteriormente, se reveló que el sistema de medición que usa el anticuerpo monoclonal de conejo mejoró la reactividad en aproximadamente 10000 veces en comparación con el sistema de medición que usa F1146-17-2. Dado que la concentración de presepsina de una muestra de una persona normal suele ser de aproximadamente 50 a 300 pg/ml, se demostró que la medición es imposible en un sistema de medición que utiliza F1146-17-2.

Tabla 12

Concentración de presepsina (ng/ml)	Anticuerpo S68	F 1466-5	F 1466-26	F 1466-16	F1466-12	F 1466-19	F1146-17-2
0	0,022	0,019	0,025	0,021	0,013	0,014	0,02
0,03	0,316	0,253	0,472	0,112	0,144	0,27	0,022
0,1	0,723	0,684	1,197	0,321	0,465	0,791	0,022
3	1,897	2,326	2,292	1,598	1,915	2,12	0,021
30	2,026	2,217	2,34	1,743	1,99	2,319	0,03
1000	1,697	2,155	2,274	1,69	1,869	1,985	0,368

Ejemplo 5: Medición de muestra del paciente y prueba de interferencia

Los valores de presepsina en muestras de sangre de 30 pacientes con sepsis se midieron mediante el sistema ELISA Sandwich descrito en el Ejemplo 4 usando cada anticuerpo fabricado en el Ejemplo 2, y se analizó su correlación con los valores de medición mediante el sistema ELISA Sandwich usando anticuerpo S68.

Como resultado, en cada sistema ELISA que usa el anticuerpo monoclonal de conejo, hay dos tipos de sistemas, un sistema que muestra una buena correlación con el valor de medición por el sistema ELISA que usa el anticuerpo S68 y otro sistema que muestra una mala correlación. Los resultados mostraron que los coeficientes de correlación de los anticuerpos monoclonales de conejo F1466-12 y F1466-19 eran peores en comparación con los demás. Los coeficientes de correlación de los respectivos anticuerpos fueron F1466-12=0,89, F1466-19=0,93 y F1466-26=0,98.

A continuación, se investigaron las influencias de las sustancias de interferencia en la sangre (bilirrubina F, bilirrubina C, hemoglobina, factor de reumatismo y triglicéridos) sobre el valor de medición de presepsina en sistemas ELISA sándwich fabricados utilizando cada uno de los anticuerpos monoclonales de conejo y el anticuerpo S68, respectivamente. Cada una de las sustancias de interferencia en concentraciones escalonadas se añadió al suero de voluntarios sanos contenido con una cantidad fija de presepsina y se midió la concentración de presepsina, y se evaluó la influencia de cada una de las sustancias de interferencia en el valor de medición sobre la base del valor de medición cuando no se añadió la sustancia de interferencia.

Como resultado, la interferencia de la bilirrubina F, la bilirrubina C, la hemoglobina y el factor de reumatismo no fue un nivel problemático en los sistemas de medición que utilizan ningún anticuerpo.

Por otro lado, los triglicéridos (TG) influyeron en el sistema de medición utilizando algunos anticuerpos. La prueba de interferencia de TG se llevó a cabo como se describe a continuación. Se utilizó como muestra suero humano de voluntarios sanos al que se añadió una cierta cantidad de presepsina. Las muestras diluidas en serie a 20 mg/ml de concentración de TG en las muestras se produjeron usando una transfusión de Intralipid al 20 % (Fresenius SE & Co. KGaA). Los TG contenidos originalmente en el suero de la muestra no se consideran en esta concentración de TG. Las muestras diluidas se diluyeron adicionalmente 20 veces con una solución de dilución de muestra y el valor de presepsina se midió mediante ELISA. Esta prueba de interferencia TG se llevó a cabo para varias muestras.

Como resultado, la adición de TG tuvo una influencia en el valor de medición de presepsina en el sistema de medición usando anticuerpos F1466-12 y F1466-19, y la proporción de la muestra que mostraba más de ± 20 % del grado de separación del valor de medición de presepsina fue alto cuando la concentración de TG en la muestra fue de 20 mg/ml.

Además, se obtuvo un grado de separación del valor de medición de presepsina a la concentración de TG en una muestra de 20 mg/ml en una pluralidad de muestras, y se calculó un promedio del grado de separación para cada anticuerpo. Como resultado, un promedio del grado de separación exhibe ± 20 % o menos en un sistema de medición que usa el anticuerpo S68, F1466-5 y F1466-26.

Por otro lado, en un sistema de medición que usa anticuerpos de F1466-12, F1466-19 y F1466-16, el resultado fue que un promedio del grado de separación excede ± 20 %.

Además, se compararon los grados de disociación de los valores de medición de presepsina mediante la adición de TG entre un sistema de ensayo que usa cada anticuerpo monoclonal de conejo y un sistema de ensayo que usa el anticuerpo S68. Por lo tanto, cuando la concentración de TG en la muestra fue de 20 mg/ml por adición de TG, las muestras que muestran más del 20 % sobrerrepresentan tanto en la diferencia entre el grado de disociación del sistema de medición de F1466-12 como en el grado de disociación del sistema de medición del anticuerpo S68, y la diferencia entre el grado de disociación del sistema de medición de F1466-19 y el grado de disociación del sistema de medición del anticuerpo S68, alto.

Esto sugiere la posibilidad de que la diferencia en las prestaciones de los anticuerpos en la prueba de interferencia de TG tenga una influencia sobre el análisis de correlación como se describió anteriormente.

Se intentó la prueba de la sustancia de interferencia para F1146-17-2, pero no se obtuvieron los datos debido a la baja reactividad.

Ejemplo 6: Especificidad del anticuerpo; Análisis para epítipo

Se analizaron los epítipos de cada uno de los anticuerpos monoclonales de conejo y F1146-17-2 fabricados en el Ejemplo 2 (anticuerpo monoclonal obtenido por inmunización de una rata con péptido S68).

Se sintetizaron 8 tipos de péptidos que consisten en 10 aminoácidos que contienen el fragmento parcial de la secuencia peptídica de la SEQ ID NO: 2, que se usó como antígeno de administración en el Ejemplo 1 (véase Tabla 13). La secuencia del epítipo se investigó observando la reacción de competición-inhibición con un estándar de referencia de presepsina mediante el sistema ELISA sándwich descrito en el Ejemplo 4. Específicamente, se prepararon placas de inmovilización de cada anticuerpo de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4. A continuación, se añadieron 400 pg/ml del estándar de referencia de presepsina y 20 μ g/ml de los péptidos sintéticos mostrados en la Tabla 13 (P01 a P08) en 25 μ l, respectivamente, a las placas, y se hicieron reaccionar. No se utilizó ninguna adición del péptido (descrito como PBS) y un péptido para un control negativo (descrito como NC: Secuencia CGDKTTATDIKGKE (SEQ ID NO: 34)) como control negativo. Además, se utilizó péptido S68 como control positivo. El sistema de reacción se desarrolló en color con TMB una vez finalizada la reacción. Si el péptido sintético reaccionó con el anticuerpo, la absorbancia disminuyó porque se inhibió la unión del estándar de referencia de presepsina al anticuerpo. Se calculó la tasa de inhibición de cada péptido cuando se supuso que la absorbancia de PBS era del 100 %.

Como resultado del mismo, un anticuerpo que reconoce P03 solamente, un anticuerpo que reconoce P03 a P04 y un anticuerpo que reconoce P04 a P05 se confirmaron como se muestra en la Tabla 14. Además, se reveló que F1146-17-2 reconoció P04 a P05. Como resultado de ello, se reveló que se obtuvo un anticuerpo monoclonal que reconoce la ubicación de P03 como epítipo. Se encontró que F1466-12 y F1466-19, que mostraron peores resultados en la prueba de interferencia de TG y la correlación con el sistema de medición usando el anticuerpo S68 en el Ejemplo 5, reconocieron P04 a P05 y no reconocieron a P03 como el epítipo de manera similar al anticuerpo monoclonal de rata (F1146-17-2). Los otros anticuerpos reconocieron a P03 como el epítipo. Esto sugiere que existe una relación entre la capacidad adecuada para la medición de presepsina del anticuerpo y el epítipo que reconoce el anticuerpo. Además, la presepsina tiene una secuencia de aminoácidos que es muy deficiente en una porción C-terminal de sCD14 de alto peso molecular, y se supone que la longitud de un aminoácido de la misma tiene variación. Es posible que una diferencia en la especificidad de un anticuerpo influyera en la correlación con el valor de medición usando el anticuerpo S68 en el Ejemplo 5.

Tabla 13

	Ubicación del aminoácido en SEQ ID NO.: 3	Secuencia de aminoácido	SEQ ID NO.:
Péptido S68	Posición 53 a Posición 68	rvdadadprqyadtvk	2
P01	Posición 46 a Posición 55	nlepflkrvd	35
P02	Posición 49 a Posición 58	pflkrvdada	36
P03	Posición 52 a Posición 61	krvdadadpr	1
P04	Posición 55 a Posición 64	dadadprqya	37
P05	Posición 58 a Posición 67	adprqyadtv	38
P06	Posición 61 a Posición 70	rqyadtvkal	39
P07	Posición 64 a Posición 73	adtvkalvr	40
P08	Posición 67 a Posición 76	vkalrvrrlt	41

Tabla 14

	F 1466-5	F 1466-26	F 1466-16	F1466-12	F1466-19	F1146-17-2
P01	-	-	-	-	-	-
P02	-	-	-	-	-	-
P03	++	++	++	-	-	-
P04	-	-	++	++	++	++
P05	-	-	-	++	++	++
P06	-	-	-	-	-	-
P07	-	-	-	-	-	-
P08	-	-	-	-	-	-
S68	++	++	++	++	++	++
Reactividad residual (%) -:80 % o más, +:50 % o más y menos del 80 %, ++ menos del 50 %						

5 Ejemplo 7: Análisis detallado del epítipo

Con respecto al anticuerpo monoclonal de conejo que reconoce el péptido P03, se investigó la reactividad con los péptidos obtenidos modificando el péptido P03 por un aminoácido. Péptidos (péptidos P031 a P039) obtenidos sustituyendo los aminoácidos en la Posición 53 a la Posición 61 con alanina (glicina cuando el aminoácido original es alanina) por un aminoácido en el péptido P03 (correspondiente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y la secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de la Posición 52 a la Posición 61 de la SEQ ID NO: 3), y las reactividades entre los péptidos P031 a P039 y el anticuerpo, se confirmaron mediante el sistema ELISA Sandwich de acuerdo con la descripción del Ejemplo 4.

Como resultado, la actividad de unión con el anticuerpo se perdió cuando el ácido aspártico en la Posición 59 de la SEQ ID NO: 3 en el péptido P03 (correspondiente a la Posición 8 de la SEQ ID NO: 1) se sustituyó con alanina.

La actividad de unión con el anticuerpo se mantuvo cuando los aminoácidos de la Posición 53 a la Posición 58 de la SEQ ID NO: 3 (correspondiente a los aminoácidos de la Posición 2 a la Posición 7 de la SEQ ID NO: 1), Posición 60 y Posición 61 de la SEQ ID NO: 3 en el péptido P03 (correspondiente a la Posición 9 y Posición 10 de la SEQ ID NO: 1) se sustituyeron con alanina (o glicina).

Como se describió anteriormente, se confirma que el anticuerpo que reconoce el péptido P03 como un epítipo reconoce los péptidos como un epítipo cuyos péptidos se obtuvieron sustituyendo los aminoácidos en la Posición 53 por la Posición 58, Posición 60 y Posición 61 descritas en la SEQ ID NO: 3 en péptido P03 con alanina (o glicina) para un aminoácido.

Ejemplo 8: Preparación de una variante de anticuerpo monoclonal anti-presepsina derivado de conejo

Con base en la secuencia de anticuerpos monoclonales anti-presepsina derivados de conejo descritos en el Ejemplo 1, se prepararon variantes.

8-(1) Análisis de secuencia CDR

Como resultado del análisis de la secuencia CDR de cinco tipos de anticuerpos anti-presepsina que se han obtenido del Ejemplo 1, se supuso que la secuencia de cada anticuerpo tiene una secuencia que afecta a la actividad del anticuerpo y una secuencia que no afecta a la actividad del anticuerpo. Por lo tanto, al usar como base la secuencia de CDR del anticuerpo F1466-26, que es uno de los anticuerpos que se muestra claramente para reconocer la secuencia de P03 (SEQ ID NO: 1) como un epítipo en el Ejemplo 6, se realizó la modificación de aminoácidos de cada secuencia de CDR para preparar una variante y se evaluó la actividad de la variante. Se prepararon alrededor de 100 variantes. La modificación de aminoácidos se realizó mediante sustitución, inserción o eliminación de un aminoácido, o sustitución de una secuencia por varios aminoácidos.

También se preparó y evaluó una variante que contenía la longitud completa de la cadena pesada del anticuerpo F1466-26 y la longitud completa de la cadena liviana del anticuerpo F1466-5 y se evaluó de la misma manera que anteriormente.

8-(2) Preparación de plásmido para la preparación de producto modificado de cadena pesada

Se preparó un plásmido para un producto modificado de cadena pesada como sigue. Aunque se dan descripciones para el plásmido pTK-5793, también se construyeron otros plásmidos de acuerdo con el mismo procedimiento. Utilizando como molde el plásmido para la expresión transitoria de una cadena pesada (pTK-5605) que contiene toda la longitud de la cadena pesada de F1466-26 obtenida del Ejemplo 2 y un par de cebadores (conejo IgG (14-12)-e: cebador lateral 3' e IgV2 de conejo Aor13HI: cebador lateral 5'), se realizó PCR. Utilizando también el fragmento amplificado obtenido como molde y un par de cebadores (IgG (14-12)-e de conejo e IgV2 de conejo Aor13HI), se realizó la PCR. El fragmento amplificado obtenido a partir del mismo se clonó en el plásmido pT7-Blue y luego se preparó un fragmento que incluía una secuencia deseada usando la enzima de restricción Aor13HI. Además, pTK-4273 (fabricado por nuestra empresa) que tiene un promotor EF-1 α y un potenciador de CMV, y una secuencia de genes adicional que comprende otras partes distintas de la región variable de la cadena pesada de IgG de conejo, que es un vector para la expresión transitoria en células de mamíferos, fue digerido con la enzima de restricción Aor13HI para preparar un fragmento de vector. El fragmento preparado que contiene la secuencia deseada se clonó en el fragmento de vector para preparar pTK-5793.

8-(3) Preparación de plásmido para la preparación de producto modificado de cadena liviana

Se preparó un plásmido para un producto modificado de cadena liviana como sigue. Aunque se dan descripciones para el plásmido pTK-5844, también se construyeron otros plásmidos de acuerdo con el mismo procedimiento. Utilizando como molde el plásmido para la expresión transitoria de una cadena liviana (pTK-5608) que contiene toda la longitud de la cadena liviana de F1466-26 obtenida del Ejemplo 2 y un par de cebadores (pEF2ce-28: cebador lateral 3' y pEF2ce-49: cebador lateral 5'), se realizó la PCR. Utilizando también el fragmento amplificado obtenido como molde y un par de cebadores (pEF2ce-28 y pEF2ce-49), se realizó la PCR. El fragmento amplificado obtenido a partir del mismo se clonó en el plásmido pT7-Blue y luego se preparó un fragmento que incluía una secuencia deseada utilizando las enzimas de restricción BamHI y XbaI. Además, pTK-2433 (fabricado por nuestra empresa), que es un vector de expresión transitoria en células de mamíferos, se digirió con las enzimas de restricción BamHI y XbaI para preparar un fragmento de vector. El fragmento preparado que contiene la secuencia deseada se clonó en el fragmento de vector para preparar pTK-5844.

Secuencia de cebadores

IgG de conejo (14-12)-e : 5'GGG GGT CCG GAG GTC GCC TGG TCA CGC CTG G 3'(SEQ ID NO.: 85)

IgV2 de conejo Aor13HI : 5'GGG TCC GGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT GCC 3'(SEQ ID NO.: 86)

pEF2ce-28 : 5' TTC ATT CTC AAG CCT CAG AC 3'(SEQ ID NO.: 87)

pEF2ce-49 : 5' TTT TCA CTG CAT TCT AGT TGT GGT 3'(SEQ ID NO.: 88)

8-(4) Preparación de anticuerpo recombinante en sistema de expresión transitoria

A continuación, se muestra como ejemplo representativo el procedimiento para la expresión transitoria de un anticuerpo usando el plásmido pTK-5793 para preparar un producto modificado de cadena pesada. El plásmido (pTK-5793) para preparar el producto modificado de cadena pesada que se ha preparado en el Ejemplo 8-(2) y el plásmido (pTK-5608) para la expresión transitoria de una cadena liviana que se ha descrito en el Ejemplo 8-(3) se mezclaron en la misma cantidad y se transfectaron células COS-1 (ATCC: CRL-1650) con ellas utilizando un reactivo de transfección (FuGENE (marca registrada) 6, Promega KK). Específicamente, usando medio Opti-MEM (marca registrada) de suero reducido (fabricado por Life Technologies) como líquido para dilución, se prepararon un reactivo

de transfección y el plásmido a 0,96 µl/25 µl y 0,48 µg/25 µl, respectivamente. Después de mezclar y agregar a un medio, se agregaron a las células COS-1, que luego se cultivaron a 37 °C. Después de cultivar durante 72 h, se recogió el sobrenadante del cultivo.

- 5 De manera similar a lo anterior, el plásmido para preparar cada producto modificado de cadena pesada se usó después de mezclar con el plásmido (pTK-5608) para la expresión transitoria de una cadena liviana. El plásmido para preparar cada producto modificado de cadena liviana se usó después de mezclar con el plásmido (pTK-5605) para la expresión transitoria de una cadena pesada. El producto modificado que incluye la longitud completa de la cadena pesada del anticuerpo F1466-26 y la longitud completa de la cadena liviana del anticuerpo F1466-5 se preparó mezclando con el
- 10 pTK-5605 y un plásmido para la expresión transitoria de una cadena liviana que incluye toda la longitud de la cadena liviana de F1466-5.

Ejemplo 9: Evaluación de la variante (1)

Se purificaron dieciséis tipos de variantes (anticuerpos IgG) que se obtuvieron por expresión en células COS-1 en el Ejemplo 8 y se evaluaron la reactividad con presepsina, especificidad y afinidad (valor KD) de cada anticuerpo.

15 9-(1) Purificación de anticuerpo

- Se recogió el sobrenadante del cultivo de células COS-1 obtenido de 8-(4) y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (Sterivac, Merck Millipore). El sobrenadante de cultivo obtenido se purificó utilizando Prosep vA (Merck Millipore). Se concentró un eluato que contenía el producto purificado y posteriormente se dializó frente a D-PBS (pH 7,4). La concentración de proteína se obtuvo mediante el procedimiento de Lowry utilizando IgG (BioRad Laboratories, Inc.)
- 20 como estándar. El anticuerpo obtenido se analizó mediante SDS-PAGE. Como resultado, se determinó un anticuerpo recombinante que mostraba una única banda de aproximadamente 150 kDa.

9-(2) Preparación de rsCD14ST-Fc en sistema de expresión transitoria

- En primer lugar, utilizando como plantilla pTK356H (TB64) (un plásmido que tiene una secuencia que codifica rsCD14 que se describe en el Ejemplo 13 del documento WO 2005/108429), un par de cebadores (hCD14-a, hCD14-d) y un Taq polimerasa (TAKARA BIO INC.), se realizó la reacción de PCR. El fragmento amplificado obtenido a partir del mismo (que contiene una secuencia de reconocimiento de trombina en el sentido 3' de la secuencia de la posición 1 a la posición 64 de la sCD14 humana que incluye una secuencia señal y un sitio de enzima de restricción en ambos extremos) se usó para la clonación de TA en el vector pT7Blue (Merck Millipore). Después de confirmar la secuencia,
- 25 se utilizó como pTK-3047. A continuación, el fragmento obtenido al digerir el pTK-3047 con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI se insertó en un fragmento de vector que se había preparado de antemano mediante restricción de pTK-2233 (un plásmido para la expresión de células de mamífero que contiene una secuencia que codifica la región Fc de la cadena pesada de la cadena pesada del anticuerpo IgG1 derivada de ser humano) con EcoRI y BamHI, y el clon obtenido se utilizó como pTK-3053.
- 30

Secuencia de hCD14-a 5'-GGGAATTCGCCGCCACCATGGAGCGCGCTCCTGC-3' (SEQ ID NO.:89)

- 35 Secuencia de hCD14-d 5'-GGGATCCACGCGGAACCAGAGCATACTGCCGCGGG-3' (SEQ ID NO.:90)

- Se transfectaron células COS-1 (ATCC: CRL-1650) con el plásmido pTK-3053 para la expresión transitoria para expresar rsCD14ST-Fc. Específicamente, un reactivo de transfección y el plásmido se mezclaron entre sí a 2 µl/ml y 4 µg/ml, respectivamente. Después de mezclar y agregar a un medio, se agregaron a las células COS-1, que luego se cultivaron a 37 °C. Después de cultivar durante 72 h, se recogió el sobrenadante del cultivo y se añadió más medio
- 40 nuevo. Después de cultivar durante 96 h, se recogió el sobrenadante del cultivo y las fracciones obtenidas de dos colecciones se mezclaron y filtraron a través de un filtro de 0,22 µm (Sterivac, Merck Millipore). El sobrenadante de cultivo obtenido se purificó utilizando Prosep vA (Merck Millipore). Se concentró un eluato que contenía el producto purificado y posteriormente se dializó frente a D-PBS (pH 7,4). La concentración de proteína se obtuvo mediante el procedimiento de Lowry usando BSA (BioRad Laboratories, Inc.) como estándar. El rsCD14ST-Fc obtenido se analizó
- 45 mediante SDS-PAGE. Como resultado, se determinó una única banda con un peso molecular de aproximadamente 75 kDa. La actividad de unión del rsCD14ST-Fc preparado a un anticuerpo anti-presepsina se determinó mediante ELISA en el que se inmoviliza un antígeno en una fase sólida.

9-(3) Establecimiento de ELISA sándwich

- Mediante el uso de la variante que se ha purificado en 9-(1), se estableció el ELISA sándwich. Específicamente, cada variante se inmovilizó sobre IMMUNO PLATE (MAXISORP, C96, 430341) fabricada por Nunc seguido de bloqueo. A continuación, mediante la adición de un producto estándar de presepsina (0 a 300 pg/ml), la placa se hizo reaccionar durante una hora a 25 °C. Posteriormente, la placa se lavó cinco veces con solución salina fisiológica que contenía 0,05 % de Tween 20. A continuación, se añadió una solución que contenía F1106-13-3 F(ab')₂-HRP diluido a cada pocillo y se dejó que la reacción se produjera durante 2 h a 25 °C. De manera similar, después de lavar la placa cinco
- 50 veces, se añadió una solución de TMB y se dejó que ocurriera la reacción durante 20 min a temperatura ambiente. Cuando se completó la reacción, la reacción se terminó usando una solución de ácido sulfúrico 1 M. La absorbancia a 450/650 nm se midió usando un lector de placas.
- 55

9-(4) Evaluación de especificidad (1)

Para evaluar la especificidad de la variante que se ha purificado en 9-(1), se realizó ELISA usando una placa en la que se inmovilizó el péptido P03 (SEQ ID NO: 1, preparado en el Ejemplo 6). Para la comparación, también se realizó la evaluación de F1466-26.

Específicamente, se inmovilizó BSA o péptido P03-BSA en IMMUNO PLATE (MAXISORP, C96, 430341) mediante Nunc seguido de bloqueo.

Con base en el resultado de la concentración de proteína que se ha obtenido a partir de 9-(1), se hizo una dilución con D-PBS y se preparó para tener 500 ng/ml. Cada solución diluida se añadió en una cantidad de 50 µl por pocillo y se dejó que ocurriera la reacción en la placa durante una hora. Posteriormente, se lavó la placa cinco veces con solución salina fisiológica que contenía Tween 20 al 0,05 %. A continuación, se añadió a cada pocillo una solución en la que se diluye Igs-HRP anti-conejo (DAKO, P448) y se dejó que la reacción ocurriera durante una hora a temperatura ambiente. De manera similar, después de lavar la placa, se añadió una solución de TMB y se dejó que ocurriera la reacción durante 3 a 5 min a temperatura ambiente. Cuando se completó la reacción, la reacción se terminó usando una solución de ácido sulfúrico 1 M. La absorbancia a 450/650 nm se midió usando un lector de placas (Molecular Devices). Junto con la secuencia de CDR modificada de la variante, los resultados se muestran en la Tabla 16 a la Tabla 22.

Como resultado, se encontró que el 87 % de las variantes se unen al péptido P03 y, por tanto, se demostró que el sitio P03 se reconoce como un epítipo. Específicamente, se demostró que 5795, 5803, 5811, 5810, 5784, 5793, 5858, 5878, 5875, 5876, 5844, 5874 y 5684 reconocieron el sitio P03 como un epítipo entre los productos modificados obtenidos.

9-(5) Evaluación de afinidad

Se evaluó la afinidad (KD) de la variante a la presepsina (se usó rsCD14ST-FC preparado en 9-(2)), el péptido P03 y el péptido S68. La evaluación también se realizó de manera similar para el anticuerpo S68, un anticuerpo monoclonal derivado de rata (F1146-17-2) y el F1146-26.

La medición de la afinidad se realizó utilizando BIAcore3000 (GE Healthcare). En un chip CM5 (GE Healthcare), se inmovilizó cada uno de los rsCD14ST-Fc, P03-BSA y S68-BSA de acuerdo con un procedimiento común y se agregó una serie de dilución de cada anticuerpo (1,6 a 1000 nM) y el modo de unión se determinó para cada antígeno. Se trazó un sensorgrama y, obteniendo la constante de velocidad de asociación (Ka) y la constante de velocidad de disociación (Kd), se calculó la constante de disociación de equilibrio (KD).

El resultado de medir la afinidad (KD) del anticuerpo S68, el anticuerpo monoclonal derivado de rata (F1146-17-2) y F1146-26 para el rsCD14ST-FC se muestra en la Tabla 15.

Como resultado, se encontró que el F1146-26 (valor KD de 1,48E-09) tiene una afinidad por la presepsina que es aproximadamente diez veces mayor que la del anticuerpo S68 (valor KD de 1,08E-08) en términos del valor KD. También se encontró que el F1146-26 tiene una afinidad por la presepsina (valor KD) que es aproximadamente diez mil veces mayor que la de un anticuerpo monoclonal derivado de rata (F1146-17-2: valor KD de 1,08E-05).

El resultado de medir la afinidad (KD) de cada variante por el rsCD14ST-FC se muestra en la Tabla 16 a la Tabla 22, junto con la secuencia de CDR modificada. Como resultado, se encontró que el 80 % de la variante tiene una afinidad mayor o igual a la del anticuerpo S68. Según la modificación de la secuencia CDR del F1146-26, se obtuvo una variante (5810) que tiene una afinidad por la presepsina (valor KD) que es aproximadamente mil veces mayor que la del F1146-26.

Una realización preferida de la presente invención es un anticuerpo que tiene una mayor afinidad del anticuerpo por la presepsina en comparación con la afinidad del anticuerpo S68 por la presepsina. Cuando se hace la comparación en términos de valor KD, los ejemplos del anticuerpo preferido incluyen F1466-26 y 5795, 5803, 5810, 5784, 5793, 5858, 5844 y 5684 como una variante. Además, un anticuerpo que exhibe un valor KD de anticuerpo de menos de 10⁻⁸ también es favorable y también se anotaron F1466-26, 5795, 5803, 5810, 5784, 5793, 5858, 5844 y 5684. Además, también es preferible un anticuerpo que tenga una excelente afinidad por la presepsina para presepsina que muestre un valor de KD que sea 1/2 o menos que el valor de KD del anticuerpo S68 y también se observaron F1466-26, 5795, 5803, 5810, 5784 y 5793. Aquellos que exhibieron un valor KD particularmente excelente fueron 5793 (7,3E-10) y 5810 (6,52E-12).

Se encontró que la variante 5684 en la que se combinan la longitud completa de la cadena pesada de F1146-26 y la longitud completa de la cadena liviana de F1146-5 mantiene la especificidad de P03 y la actividad de unión para la presepsina. Debido a que F1146-26 y F1146-5 son los anticuerpos que reconocen el mismo sitio P03 como un sitio de epítipo, se demostró que la actividad del anticuerpo se puede mantener posiblemente incluso cuando se realiza la sustitución de secuencia entre anticuerpos que tienen la misma especificidad.

Como se muestra en el Ejemplo 2, cualquiera de la secuencia CDR3 de cadena pesada de F1146-5 y F1146-26 que reconoce a P03 como un epítipo es GDF y está compuesta por una secuencia relativamente corta, es decir, tres aminoácidos. Como tal, se cree que es una característica del presente anticuerpo.

- 5 Además, debido a que se observó un aumento en la afinidad en la variante 5793 según la modificación de la 3ª de la secuencia de la CDR3 de la cadena pesada, se demostró que la 3ª de la secuencia de la CDR3 de la cadena pesada posiblemente podría tener un efecto sobre la actividad del anticuerpo.

Tabla 15

Anticuerpo	Epítipo	rsCD14ST-Fc (KD)
Anticuerpo S68		1,08E-08
F1466-17-2 (rata)	P04-05	1,08E-05
F 1146-26 (conejo)	P03	1,48E-09

10

Tabla 16- CDR1 de cadena pesada de la región modificada

Anticuerpo	VH CDR1					P03(OD)	rsCD14ST-Fc(KD)
F 1466-26	R	Y	T	M	G	0,822	1,48E-09
5795			A			2,480	1,71E-09
5803	S					1,631	4,20E-09
5811	A					1,030	1,13E-08

Tabla 17- CDR2 de cadena pesada de la región modificada

Anticuerpo	VL CDR2															P03(OD)	rsCD14ST-Fc(KD)
F 1466-26	I	I	N	S	G	A	T	Y	Y	A	S	W	A	K	G	0,822	1,48E-09
5810		A														2,048	6,52E-12
En 5810, A se insertó entre I en el 2º y N en el 3º.																	

Tabla 18- CDR3 de cadena pesada de la región modificada

Anticuerpo	VH CDR3			P03(OD)	rsCD14ST-Fc(KD)
F 1466-26	G	D	F	0,822	1,48E-09
5784	A			1,018	3,73E-09
5793			A	0,881	7,30E-10
5794	A	A	A	0,582	4,06E-07

15

Tabla 19- CDR1 de cadena liviana de la región modificada

Anticuerpo	VL CDR1											P03(OD)	rsCD14ST-Fc(KD)
F 1466-26	Q	A	S	Q	s	I	G	S	N	L	A	0,822	1,48E-09
5858						A						0,946	9,04E-09
5878							S	N	Y			2,327	1,43E-08
5879							S	I	Y			0,352	8,42E-07

Tabla 20- CDR2 de cadena liviana de la región modificada

Anticuerpo	VL CDR2							P03(OD)	rsCD14ST-Fc(KD)
F 1466-26	K	A	S	K	L	A	S	0,822	1,48E-09
5875		T		T		E		1,038	1,96E-08
5876		T		T		D		0,657	1,97E-06

5

Tabla 21- CDR3 de cadena liviana de la región modificada

Anticuerpo	VL CDR3													P03(OD)	rsCD14ST-Fc(KD)
F 1466-26	Q	c	s	Y	T	A	I	G	N	Y	G	H	V	0,822	1,48E-09
5844									A					0,677	9,82E-09
5874		S				E	S	T	T	F				2,108	1,95E-08
En 5844, A se insertó entre N en el 9° e Y en el 10°.															

Tabla 22- Longitud total de la cadena liviana en la región modificada

Anticuerpo	VL	P03 (OD)	rsCD14ST-FC (KD)
F1146-26	-	0,822	1,48E-09
5684	-	1,137	7,37E-09

9-(6) Evaluación de la especificidad (2) - Reacción de inhibición competitiva de péptidos

- 10 De acuerdo con el Ejemplo 6, se realizó una prueba para la reacción de inhibición competitiva por péptidos P01 a P08 para la reacción entre cada variante y presepsina.

La prueba se realizó usando ELISA en el que la variante está inmovilizada en un estado sólido.

- 15 Específicamente, la variante se inmovilizó en IMMUNO PLATE (MAXISORP, C96, 430341) mediante Nunc seguido de bloqueo. Luego, se añadió la presepsina estándar (300 pg/ml) a cada pocillo en una cantidad de 25 µl por pocillo. Posteriormente, se añadió cada péptido que se había diluido (0,01 a 10 µg/ml) en una cantidad de 25 µl. Se dejó que ocurriera la reacción en la placa durante una hora a 25 °C. Posteriormente, la placa se lavó cinco veces con solución salina fisiológica que contenía 0,05 % de Tween 20. A continuación, se añadió a cada pocillo una solución en la que se diluye F1106-13-3 F(ab')₂-HRP en una cantidad de 50 µl por bien y se dejó que ocurriera la reacción durante 2 h a 25 °C. De manera similar, después de lavar la placa cinco veces, se añadió una solución de TMB y se dejó que ocurriera la reacción durante 30 a 40 min a temperatura ambiente. Cuando se completó la reacción, la reacción se terminó usando una solución de ácido sulfúrico 1 M. La absorbancia a 450/650 nm se midió usando un lector de placas. Como control negativo, se utilizó una muestra sin añadir el péptido (descrito como PBS). Como control positivo, se utilizó péptido S68. Teniendo la absorbancia de PBS como 100 %, se calculó la proporción de inhibición de cada péptido. Como resultado, se confirmó que todas las variantes que se han probado reconocen específicamente la
- 25 secuencia P03 como se muestra en la Tabla 23.

Tabla 23

	5793	5795	5803	5810	5811	5858	5874
P01	-	-	-	-	-	-	-
P02	-	-	-	-	-	-	-
P03	++	++	++	++	++	++	++

(continuación)

	5793	5795	5803	5810	5811	5858	5874
P04	-	-	-	-	-	-	-
P05	-	-	-	-	-	-	-
P06	-	-	-	-	-	-	-
P07	-	-	-	-	-	-	-
P08	-	-	-	-	-	-	-
S68	++	++	++	++	++	++	++
Reactividad residual (%) -:80 % o más, +:50 % o más y menos del 80 %, ++ menos del 50 %							

Ejemplo 10: Evaluación de la variante (2)

- 5 Entre las variantes preparadas en el Ejemplo 8, se evaluaron la actividad de unión para la presepsina y la especificidad para la variante que no se ha evaluado en el Ejemplo 9.

10-(1) Medida de la concentración de anticuerpos por ELISA

10 Para determinar la concentración de IgG en el sobrenadante del cultivo obtenido del Ejemplo 8-(4), se midió la concentración de IgG usando ELISA sándwich. Específicamente, el anticuerpo anti-conejo (DAKO, Z196) se inmovilizó en IMMUNO PLATE (MAXISORP, C96, 430341) mediante Nunc seguido de bloqueo. Utilizando el anticuerpo monoclonal de conejo purificado como estándar, se preparó una solución estándar de 100 a 1,56 ng/ml de acuerdo con la dilución con un tampón de dilución (0,1 % BSA/D-PBS). A continuación, el sobrenadante del cultivo recogido se diluyó con el tampón de dilución (BSA al 0,1 %/D-PBS). Se añadió a los pocillos la solución diluida del sobrenadante del cultivo o la serie de diluciones del estándar y se dejó que la reacción se produjera durante una hora en una placa.

15 Posteriormente, la placa se lavó cinco veces con solución salina fisiológica que contenía Tween 20 al 0,05 %. A continuación, se añadió a cada pocillo una solución en la que se diluye Igs-HRP anti-conejo (DAKO, P399) y se dejó que la reacción ocurriera durante una hora a temperatura ambiente. De manera similar, después de lavar la placa cinco veces, se añadió una solución de tetrametilbencidina (TMB, BioFix) y se dejó que ocurriera la reacción durante 10 min a temperatura ambiente. Cuando se completó la reacción, la reacción se terminó usando una solución de ácido sulfúrico 1 M. La absorbancia a 450/650 nm se midió usando un lector de placas (Molecular Devices). La concentración de anticuerpo en cada sobrenadante de cultivo se midió usando una curva estándar que se ha obtenido a partir de una dilución de concentración en serie del estándar.

10-(2) Evaluación de la actividad de unión y especificidad para presepsina

25 Para evaluar la actividad de unión y la especificidad para la presepsina de la variante, se realizó ELISA utilizando una placa en la que se inmoviliza un antígeno en estado sólido.

Específicamente, se inmovilizó BSA, rsCD14ST-Fc o péptido P03-BSA sobre PLACA INMUNO (MAXISORP, C96, 430341) mediante Nunc seguido de bloqueo.

30 Con base en el resultado de la concentración de IgG en el sobrenadante del cultivo, se hizo la dilución del sobrenadante del cultivo con D-PBS para tener 500 ng/ml (para una muestra con baja concentración de anticuerpos, se usó el stock original del sobrenadante del cultivo). Se añadió cada solución diluida de un sobrenadante en una cantidad de 50 µl por pocillo y se dejó que ocurriera la reacción en la placa durante una hora. Posteriormente, la placa se lavó cinco veces con solución salina fisiológica que contenía Tween 20 al 0,05 %. A continuación, se añadió a cada pocillo una solución en la que se diluye Ig-HRP anti-conejo (DAKO, P448) y se dejó que ocurriera la reacción durante una hora a temperatura ambiente. De manera similar, después de lavar la placa, se añadió una solución de TMB y se dejó que ocurriera la reacción durante 3 a 5 min a temperatura ambiente. Cuando se completó la reacción, la reacción se terminó usando una solución de ácido sulfúrico 1 M. La absorbancia a 450/650 nm se midió usando un lector de placas (Molecular Devices).

40 Para la comparación, también se realizó la evaluación del anticuerpo S68 con la evaluación de la actividad de unión para la presepsina. La actividad de unión para la presepsina se mostró como la relación de absorbancia en el momento de la reacción entre cada anticuerpo y rsCD14ST-Fc, cuando la absorbancia en el momento de la reacción entre el anticuerpo S68 y el sCD14ST-Fc se establece en 1. Junto con la secuencia de cada variante, los resultados se muestran en la Tabla 24 a la Tabla 29.

Como resultado, se encontró que la mayoría de los anticuerpos se unen a los péptidos P03 y, por tanto, se demostró que el sitio P03 es reconocido por el 76 % de los anticuerpos como un epítipo.

Además, se encontró que F1466-26 y la mayoría de las variantes exhibían una relación de absorbancia que es aproximadamente 4 a 5 veces mayor en comparación con el anticuerpo S68 y, por lo tanto, tienen una excelente actividad de unión para la presepsina. En comparación con el valor de KD y la relación de absorbancia de F1466-26 para la presepsina, se supone que el valor de KD de estos anticuerpos será el mismo nivel que el valor de KD favorable de los anticuerpos medidos en el ejemplo 9.

Una realización preferida de la presente invención es un anticuerpo que tiene una actividad de unión para la presepsina mayor que la del anticuerpo S68. Por ejemplo, en términos de la absorbancia como se describe en los Ejemplos, se cree que es preferible un anticuerpo que muestre una absorbancia mayor que la del anticuerpo S68, preferiblemente un anticuerpo que muestre una absorbancia mayor en al menos 2 veces que la del anticuerpo S68.

Un anticuerpo que exhibe, como actividad de unión para la presepsina, la absorbancia 5 veces o más que la del anticuerpo S68 y tiene una propiedad de unión particularmente excelente fue 5934, 5935, 5939, 5944, 5808, 5809, 5824, 5979, 5980, 5983, 5984, 5987, 5988, 5860, 5864 y 5863 entre los anticuerpos obtenidos, 5979, 5983, 5988 y 5864 exhibieron la absorbancia 5,5 veces o más que la del anticuerpo S68 y tuvieron una actividad de unión particularmente excelente para la presepsina entre ellos.

Tabla 24- CDR1 de cadena pesada de la región modificada

Anticuerpo	VH CDR1					P03(OD)	rsCD14ST-Fc(OD)
Anticuerpo S68							1,0
F 1466-26	R	Y	T	M	G	2,314	4,9
5932	M					2,194	4,3
5933	P					2,244	4,8
5934	V					2,281	5,1
5935	I					2,237	5,0
5937	D					2,200	4,5
5938	E					2,221	4,5
5939	H					2,207	5,0
5940	T					2,199	4,8
5941	Q					2,257	4,0
5942	Y					2,252	4,9
5943	G					2,253	4,6
5944	K					2,258	5,0
5945	N					2,177	4,1
5946	w					2,214	4,5
5804	D		A	L	N	0,033	1,1

20

Tabla 25- CDR2 de cadena pesada de la región modificada

Anticuerpo	VH CDR2														P03(OD)	rsCD14ST-Fc(OD)	
Anticuerpo S68																1,0	
F 1466-26	I	I	N	S	G	A	T	Y	Y	A	S	W	A	K	G	2,314	4,9
5807												A				2,253	4,3

(continuación)

Anticuerpo	VH CDR2												P03(OD)	rsCD14ST-Fc(OD)
5808												A	2,267	5,3
5809												A	2,296	5,1
5812											G		2,269	4,5
5824			VSSD			G	I						2,269	5,3
5825			YAGG			S							0,028	0,5
5826			YRNIK						T				2,277	4,4
5827			SDIDQIV						T				1,849	4,2
5841			SDIDDLF										2,169	4,3

Tabla 26- CDR3 de cadena pesada de la región modificada

Anticuerpo	VH CDR3			P03(OD)	rsCD14ST-Fc(OD)
Anticuerpo S68					1,0
F 1466-26	G	D	F	2,314	4,9
5912	T			0,027	0,3
5914	Q			1,345	1,7
5918	E			0,023	0,2
5920	L			1,498	3,1
5921	M			0,853	3,8
5922	P			0,038	0,2
5923	w			1,235	0,4
5924	Y			0,204	2,7
5926	S			2,301	4,4
5927	V			0,036	0,2
5928	D			0,033	0,2
5929	R			2,130	0,9
5976		F		2,204	4,7
5977		S		2,241	4,7
5978		P		2,288	4,6
5979		H		2,309	5,5
5980		I		2,293	5,3
5981		N		2,289	4,4
5982		R		2,251	4,7
5983			S	2,287	5,5
5984			P	2,186	5,1
5985			H	2,317	4,9

(continuación)

Anticuerpo	VH CDR3			P03(OD)	rsCD14ST-Fc(OD)
5986			D	2,346	4,4
5987			I	2,357	5,2
5988			N	2,337	5,6
5989			R	2,342	4,5

Tabla 27- CDR1 de Cadena liviana de la región modificada

Anticuerpo	VL CDR1											P03(OD)	rsCD14ST-Fc(OD)
Anticuerpo S68													1,0
F 1466-26	Q	A	S	Q	s	I	G	S	N	L	A	2,314	4,9
5859			A									2,282	4,6
5860		G										2,248	5,2
5865	A											2,276	4,7
5864										A		2,253	5,7
5884				E	D		I					2,221	4,7
5885				E	R		R	N	W		S	1,549	3,8
5910					N				D		S	2,129	4,2

Tabla 28- CDR2 de Cadena liviana de la región modificada

Anticuerpo	VL CDR2							P03(OD)	rsCD14ST-Fc(OD)
Anticuerpo S68									1,0
F 1466-26	K	A	S	K	L	A	S	2,314	4,9
5862					A			2,211	4,4
5863			A					2,241	5,2
5877				T				2,210	4,6

Tabla 29- CDR3 de Cadena liviana de la región modificada

Anticuerpo	VL CDR3													P03(OD)	rsCD14ST-Fc(OD)
Anticuerpo S68															1,0
F 1466-26	Q	C	S	Y	T	A	I	G	N	Y	G	H	V	2,314	4,9
5842												A		2,313	4,7
5843											A			2,290	4,7
5861	A													2,235	4,5
5880		S	Y		G	G		S	S	L	Y	N	I	0,036	0,2
5882							G			A		N	A	0,023	0,2
5905		S	T		YRSTTT							N		0,031	0,2
5907	L	G	V	V	G	S	T	S	D	D		F	A	0,019	0,2

Ejemplo 11: Preparación de anticuerpo monoclonal usando el procedimiento de presentación en fagos que usa péptido sintético como antígeno

Con respecto al Ejemplo 1-(1), utilizando linfocitos que se recogen de un conejo inmunizado con el péptido S68-KLH como antígeno para su administración, se prepara un anticuerpo monoclonal según un procedimiento de presentación en fagos.

11-(1) Establecimiento de una biblioteca de fagos inmuno F(ab)

Según el procedimiento descrito por CARLOS F. BARBAS III, et. al, Phage Display A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press), se extrae el ARN total de los linfocitos derivados del bazo que se han recogido del Ejemplo 1- (1) usando el reactivo TRIZOL (Life Technologies). Luego, mediante el uso del sistema de síntesis de primera cadena SuperScript III para RT-PCR (Life Technologies), se sintetiza un ADNc A monocatenario. A partir de este ADNc, utilizando un cebador específico para el gen del anticuerpo de conejo informado por BARBAS III, et al., se preparan un fragmento que contiene la región variable de la cadena pesada y un fragmento que contiene la región variable de la Cadena liviana. Utilizando fragmentos amplificados de la región variable de cadena pesada de conejo obtenida y CH1 de cadena pesada humana como molde, el fragmento de cadena pesada quimérica de conejo/humano se amplifica mediante PCR. Además, utilizando fragmentos amplificados de la región variable de cadena liviana de conejo (tipo kappa o tipo lambda) y región constante de cadena liviana humana como molde, se amplifica el fragmento de cadena liviana quimérica de conejo/humano. Utilizando estos fragmentos obtenidos de cadena pesada quimérica de conejo/humano y cadena liviana quimérica de conejo/humano como molde, se prepara finalmente el fragmento Fab quimérico de conejo/humano. A continuación, de acuerdo con la digestión de pCDisplay-4 (Creative Biogene), que es un fagémido para la expresión de anticuerpos, con las enzimas de restricción SacI y SpeI, se prepara un fagémido. De manera similar, de acuerdo con la digestión del fragmento Fab quimérico de conejo/humano con SacI y SpeI y la inserción del fragmento de ADNc en el fragmento de fagémido así preparado, se prepara un plásmido para expresar la biblioteca de fagos.

11-(2) Preparación de solución de fagos para presentación de fagos

Siguiendo un procedimiento común, la cepa *E. coli* TG1 (Aligent Technologies) se transforma con el plásmido que se ha preparado en 11-(1), y la solución que contiene el *E. Coli* se inocula en una placa de medio LB añadido con ampicilina. Después del cultivo a 37 °C, se recogen las colonias formadas para preparar la biblioteca de *E. coli*. Se cultiva parte de la biblioteca y, después de añadir ampicilina y glucosa a una suspensión de *E. coli*, se cultiva con agitación durante una hora a 37 °C. Después de eso, se transfecta con el fago auxiliar M13K07 (Life Technologies) y el cultivo con agitación se continúa de nuevo durante una hora. Las células se recogen mediante centrifugación y, después de retirar la solución de cultivo, se suspenden en 10 ml de solución de cultivo 2x YT seguido de cultivo con agitación a 37 °C. Al día siguiente, el sobrenadante del cultivo se separa mediante centrifugación y se transfieren 8 ml del sobrenadante a otro tubo. Después de agregar 2 ml de solución de PEG/NaCl seguida de mezcla, se mantiene en hielo durante una hora. Luego, el fago precipitado se recoge mediante centrifugación y se usa como una solución de fagos para la presentación de fagos.

11-(3) Selección del anticuerpo diana por procedimiento de cribado

A partir de una solución de fagos preparada a partir de 11-(2), se selecciona un anticuerpo mediante un procedimiento de cribado. La panorámica se realiza de acuerdo con dos tipos de procedimientos. El primer procedimiento se realiza según el procedimiento de BARBAS et. Alabama. Específicamente, S68-BSA se inmoviliza en estado sólido en la INMUNO PLATE (MAXISORP, C96, 430341) fabricada por Nunc, seguido de bloqueo. Después de añadir, en una cantidad de 50 µl por pocillo, D-PBS que contiene leche desnatada al 4 % y TritonX-100 al 0,2 %, se añaden 50 µl de la solución de fago obtenida a partir de 11-(2). Se deja que la reacción se produzca en la placa durante una hora. Posteriormente, se lava con D-PBS que contiene TritonX-100 al 0,1 %. A continuación, se realiza la elución durante 10 min utilizando glicina-HCl 100 mM (pH 2,2) y la solución recuperada se neutraliza con Tris-HCl 1 M (pH 7,4). El eluido y la cepa *E. coli* TG1 se mezclan entre sí y se hacen reaccionar a 37 °C. La cepa TG1 se transfecta de nuevo con el fago unido al antígeno del péptido S68. A la solución de cultivo, se agregan ampicilina y fago auxiliar M13K07. Después de hacerlos reaccionar a 37 °C, se recoge *E. coli* para añadir un medio y kanamicina al mismo, y se cultiva durante la noche. De la solución de cultivo, el sobrenadante se recoge mediante centrifugación y la solución de fagos se prepara mediante un tratamiento con PEG. Repitiendo tres veces el mismo procedimiento, se concentra un fago que se une específicamente al péptido S68.

Como segundo procedimiento, el cribado también se realiza tres veces usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 12-(2) para concentrar el fago específico de la presepsina.

11-(4) Medición de la actividad de unión del anticuerpo e interpretación de la secuencia CDR

La solución de cultivo TG1 de 11-(3), que se transfecta con el fago, se inocula en una placa LB que contiene ampicilina para formar una colonia. De cada colonia, se prepara nuevamente una solución de fagos y se determina la reactividad mediante ELISA. Específicamente, cada uno de BSA, S68-BSA, P03-BSA y sCD14ST-Fc se inmoviliza en la INMUNO PLATE (MAXISORP, C96, 430341) fabricada por Nunc, seguido de bloqueo. Después de añadir D-PBS que contiene leche desnatada al 4 % y TritonX-100 al 0,2 %, se añade la solución de fagos recogida. Se deja que la reacción se

produzca en la placa durante una hora. Posteriormente, la placa se lava cinco veces con solución salina fisiológica que contiene Tween 20 al 0,05 %. A continuación, se añade a cada pocillo una solución en la que se diluye el conjugado monoclonal HRP/Anti-M13 (GE Healthcare) y se deja que la reacción se produzca durante una hora a temperatura ambiente. De manera similar, después de lavar la placa cinco veces, se agrega una solución de TMB y se deja que ocurra la reacción durante 10 a 20 min a temperatura ambiente. Cuando se completa la reacción, la reacción se termina usando una solución de ácido sulfúrico 1 M. La absorbancia a 450/650 nm se mide utilizando un lector de placas (ThermoMax, Molecular Devices). Como resultado, se confirma la unión de varios tipos de fagos. A partir de esas colonias, se aísla el fagémido y se determina la secuencia.

Según el procedimiento de presentación en fagos, se obtiene un anticuerpo anti-presepsina que se une específicamente a P03 y presepsina y es una secuencia diferente de la secuencia CDR obtenida mediante un procedimiento de hibridoma.

Ejemplo 12: Preparación de una variante de la secuencia de CDR3 de cadena pesada usando el procedimiento de presentación de fagos

Debido a que se espera que la secuencia de CDR3 de cadena pesada tenga un efecto sobre la actividad enzimática, se preparó una variante de la secuencia de CDR3 de cadena pesada usando un procedimiento de presentación en fagos y se evaluó.

12-(1) Preparación de la variante modificada de la secuencia CDR3 de la cadena VH utilizando el procedimiento de presentación de fagos

Para preparar la biblioteca de mutaciones aleatorias de VH CDR3, se realizó PCR utilizando el plásmido pTK-5956 que contenía la cadena pesada y la Cadena liviana de F1466-26 como molde, un par de cebadores (p-nnk3-2s; -GGT NNK NNK NNK TGG GGC CAA GGC ACC CTG GTC ACC GTC T-3' fosforilado en 5' (SEQ ID: 91), p-nnk3-2a; GCC ACAAAAATAAGT GGC CGT GTC CTC GGT TGT CGG ACT G-3' fosforilado en 5' (SEQ ID: 92) (N representa cualquiera de G, A, T y C, y K representa G o T)) y una ADN polimerasa resistente al calor (TAKARA BIO INC.). El fragmento amplificado obtenido a partir del mismo se autoligó usando ADN ligasa. El resultante se transformó en *E. coli* XL1-Blue (Agilent Technologies) y se cultivó en una placa de agar que contenía LB/Ampicilina/Tetraciclina. Al día siguiente, las colonias generadas se recogieron usando una solución de cultivo 2x YT. A la suspensión de *E. coli*, se añadieron ampicilina, tetraciclina y glucosa y se realizó el cultivo durante una hora a 37 °C con agitación. Después de eso, se transfectó con el fago auxiliar M13KO7 (Life Technologies) y se continuó el cultivo bajo agitación durante una hora. Las células se recogieron mediante centrifugación y, después de retirar la solución de cultivo, se suspendieron en 10 ml de solución de cultivo 2x YT seguido de cultivo con agitación a 32 °C. Al día siguiente, el sobrenadante del cultivo se separó mediante centrifugación y se transfirieron 8 ml del sobrenadante a otro tubo. Después de añadir 2 ml de solución de PEG/NaCl seguido de mezcla, se mantuvo en hielo durante una hora. Luego, el fago precipitado se recogió mediante centrifugación y se usó como una solución de fago de la biblioteca de mutaciones aleatorias de VH CDR3.

12-(2) Selección del anticuerpo diana por procedimiento de cribado

Con la biblioteca preparada en 12-(1), se realizó un cribado para seleccionar un anticuerpo. Específicamente, la solución de fagos (2 ml) obtenida de 12-(1) y 6 µg de sCD14ST-Fc se hicieron reaccionar a 37 °C. Dos horas más tarde, se añadieron 200 µl de resina de proteína A (Prosep-vA, Merck Millipore) seguido de reacción durante 20 min. Después de lavar cinco veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05 %, se añadió a la resina un eluyente (Tris-HCl, glicina (pH 2,2)) y se mantuvo durante 8 minutos. Luego, se recogió la solución de fagos eluida y se neutralizó la solución. La solución recogida y la solución de cultivo de *E. coli* XL-1 Blue se mezclaron entre sí y se hicieron reaccionar a 37 °C. Una hora más tarde, se añadieron L-glutamina, ampicilina y el fago auxiliar M13KO7 (Invitrogen) y se dejó que la reacción tuviera lugar a 37 °C. De nuevo, una hora más tarde, el medio se reemplazó con un medio 2X YT seguido de cultivo durante la noche. Por tanto, se recogieron los fagos unidos específicamente a rsCD14ST-Fc. Repitiendo tres veces el mismo procedimiento, se concentró un anticuerpo diana.

12-(3) Preparación de fagos que contienen secuencia específica de presepsina y determinación de secuencia CDR

Se transfectó de nuevo XL-1 Blue con la solución de fago finalmente obtenida en 12-(2) y se inoculó el sobrenadante del cultivo en un medio 2X YT para preparar una colonia. La colonia resultante se volvió a cultivar con XL-1 Blue y, añadiendo un fago auxiliar, se preparó una solución de fago que contenía un solo fago. A continuación, utilizando la solución de fagos obtenida, se confirmó la reactividad basándose en ELISA. Específicamente, se inmovilizó sCD14ST-Fc en una placa, es decir, INMUNO PLATE (MAXISORP, C96, 430341) fabricada por Nunc, seguido de bloqueo. La solución de fagos se diluyó (x 2) usando D-PBS que contenía leche desnatada al 4 % y TritonX-100 al 0,2 % y se dejó que la reacción tuviera lugar en la placa durante una hora. Posteriormente, se lavó la placa cinco veces con solución salina fisiológica que contenía Tween 20 al 0,05 %. A continuación, se agregó una solución en la que se diluye el conjugado monoclonal HRP/Anti-M13 (GE Healthcare) en una cantidad de 50 µl por pocillo y se realizó la reacción. Se deja que ocurra durante una hora a temperatura ambiente. De manera similar, después de lavar la placa cinco veces, se añadió una solución de TMB y se dejó que ocurriera la reacción a temperatura ambiente. Cuando se completó la reacción, la reacción se terminó usando una solución de ácido sulfúrico 1 M. La absorbancia a 450/650 nm se midió

usando un lector de placas (ThermoMax, Molecular Devices). Luego, se transfectó *E. coli* con la solución de fago con actividad de unión confirmada, y después de recolectar el plásmido de acuerdo con un procedimiento común, se determinó la secuencia del gen.

5 12-(4) Preparación de anticuerpo IgG

Se recogió el fagémido de los fagos candidatos obtenidos y se preparó un fragmento que codificaba la región variable de la cadena pesada. De acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 8, se preparó un plásmido para preparar una variante de cadena pesada. A continuación, se utilizó para la transfección de células COS-1, junto con el plásmido (pTK-5608) para la expresión transitoria de la cadena liviana que contiene toda la longitud de la cadena liviana de F1466-26. Las células COS-1 se cultivaron a 37 °C. Setenta y dos horas más tarde, se recogió el sobrenadante del cultivo.

15 12-(5) Evaluación de variante de secuencia CDR3 de cadena pesada

La variante obtenida se sometió a la misma prueba que en el Ejemplo 10-(2) para evaluar la actividad de unión para presepsina (rsCD14ST-Fc) y la especificidad de P03. Los resultados se muestran en la Tabla 30, junto con la secuencia de CDR de la CDR3 de cadena pesada modificada.

Como resultado, la variante 6027 en la que se han sustituido 3 aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada mostró una reactividad ligeramente menor para la presepsina en comparación con otras variantes. Sin embargo, en comparación con el anticuerpo S68, mostró casi la misma reactividad. Las variantes 6026, 6028 y 6029 exhibieron una excelente reactividad para la presepsina incluso aunque se hayan sustituido dos aminoácidos. Con base en estos resultados, se demostró que la actividad del anticuerpo puede posiblemente mantenerse incluso cuando la CDR3 de cadena pesada está compuesta por tres aminoácidos y sus dos aminoácidos están sustituidos. La variante 6028 mostró una actividad de unión particularmente excelente para la presepsina.

Tabla 30- CDR3 de cadena pesada de la región modificada

Anticuerpo	VH CDR3			P03(OD)	rsCD14ST-Fc(OD)
Anticuerpo S68					1,0
F 1466-26	G	D	F	1,516	4,9
6026		V	L	1,542	4,6
6027	S	N	C	1,382	0,9
6028		G	E	1,531	5,5
6029		L	H	1,576	5,1

25 **Ejemplo 13: Prueba de interferencia de triglicéridos (TG)**

De acuerdo con el Ejemplo 5 y el Ejemplo 6, se ha demostrado que la medición de presepsina usando un anticuerpo que reconoce P04-05 como un epítipo es fácilmente interferida por TG en una muestra, pero la medición de presepsina usando un anticuerpo que reconoce P03 como un epítipo apenas es interferida por TG.

13-(1) Prueba de interferencia de TG (1) usando suero sanguíneo de humanos normales

30 Para una confirmación adicional, se determinó la influencia de TG en una muestra de prueba normal. La prueba de interferencia de TG se realizó para F1466-26 (especificidad: P03), F1466-5 (P03) y F1466-19 (P04-05) utilizando suero sanguíneo de un humano normal.

35 A la muestra de ensayo de ser humano normal (8 muestras) (plasma sanguíneo con EDTA, TENECCE BLOOD SERVICIES), se añadió TG a una concentración final de 10 mg/ml y se comparó el valor de medición de presepsina antes y después de la adición. Con respecto a la concentración de TG en ese momento, no se tomó en consideración el TG originalmente incluido en la muestra de prueba. La evaluación se realizó utilizando una placa en la que cada anticuerpo está inmovilizado en estado sólido y el sistema ELISA de sándwich descrito en el Ejemplo 9-(3). Los resultados se muestran en la Figura 1.

40 Como resultado, los anticuerpos F1466-26 y F1466-5 que reconocen a P03 como un epítipo no mostraron casi ningún cambio en el valor de medición antes y después de la adición de TG. Sin embargo, el valor de medición del anticuerpo F1466-19 que reconoce a P04-05 como un epítipo se vio afectado significativamente por la adición de TG. Se espera que, como F1466-19, la medición con un anticuerpo en el que el valor de medición de presepsina se ve afectado significativamente por los TG presentes en una muestra de prueba exhiba un valor de medición alto para una persona sana que normalmente muestra un valor bajo. En ese caso, es difícil tener una diferencia entre un valor normal y un

valor anormal. Por tanto, se puede decir que dicho anticuerpo no es adecuado para la medición de presepsina en una muestra de prueba. Mientras tanto, se confirmó que el anticuerpo que reconoce a P03 como un epítipo apenas se ve afectado por los TG presentes en una muestra de prueba y, por lo tanto, es un anticuerpo adecuado para medir la presepsina presente en una muestra de prueba.

Además, una prueba que usa este suero humano de una persona normal respalda que una reacción cruzada con sCD14 de alto peso molecular es insignificante en un sistema de ensayo que usa un anticuerpo que reconoce a P03 como un epítipo.

En el suero humano de una persona normal, la presepsina es de unos pocos cientos de pg/ml, mientras que la sCD14 de alto peso molecular está presente en alrededor de 5,6 a 11,2 $\mu\text{g/ml}$ (WO 2005/108429, Ejemplo 12), y si el anticuerpo reacciona con sCD14 de alto peso molecular, es imposible medir una cantidad menor de presepsina.

De acuerdo con el presente ejemplo, se confirmó que, en un sistema de ensayo que usa un anticuerpo que reconoce a P03 como un epítipo, no se produce una reacción cruzada con sCD14 de alto peso molecular y es posible medir la presepsina en una cantidad menor de alrededor de unos pocos cientos de pg/ml.

13-(2) Prueba de interferencia TG (2) usando variante

La prueba de interferencia de TG se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 5 para las variantes recién obtenidas y se determinó la influencia de TG presente en la muestra de prueba. La variante se utilizó después de la purificación.

Específicamente, la variante se inmovilizó en IMMUNO PLATE (MAXISORP, C96, 430341) fabricada por Nunc seguido de bloqueo. La dilución de un estándar de presepsina se realizó usando un tampón de dilución para preparar series de concentraciones de presepsina (15,6 a 500 pg/ml). A tres tipos de muestra de prueba humana, se añadió triglicérido (Intralipid, fabricado por Fresenius Kabi Japón) para tener una concentración final de 6,7, 13,3 o 20 mg/ml. En cuanto a la muestra de prueba humana, se utilizaron una muestra de prueba de suero sanguíneo obtenida de un paciente con sepsis y dos muestras de prueba de suero obtenidas de una persona normal, a las que se les ha añadido una cierta cantidad de presepsina. Además, los TG contenidos originalmente en una muestra de prueba no se consideraron para la concentración de TG. La muestra de prueba se diluyó ($\times 20$) usando un tampón de dilución, y a cada pocillo se añadió una muestra no añadida con TG o añadida con TG en cada concentración o una serie de diluciones de un estándar. La medición se llevó a cabo usando ELISA sándwich como en el Ejemplo 9-(3). La relación (%) de la muestra de prueba que presenta una tasa de disociación de ± 20 % o menos para la medición de presepsina cuando la concentración de TG es de 20 mg/ml en una muestra de prueba se muestra en la Tabla 31.

Como resultado, se confirmó que el anticuerpo que reconoce a P03 como un epítipo apenas se ve afectado por los triglicéridos.

Tabla 31

Anticuerpo	Epítipo	Región modificada	Relación (%) de muestra de prueba con una tasa de disociación de ± 20 % o menos
5793	P03	CDR3	100
5795	P03	CDR1	100
5810	P03	CDR2	100
5803	P03	CDR1	100
5811	P03	CDR1	100
5826	P03	CDR2	100
5942	P03	CDR1	100
5945	P03	CDR1	100

Ejemplo 14: Lista de productos modificados con propiedades deseables

La secuencia CDR de anticuerpos con propiedades deseables, que se han obtenido de los Ejemplos 8 y 12 de la presente invención, se muestra en la Figura 2 a la Figura 2-2 (ADF, GDA, SEQ ID NO: 95 a SEQ ID NO: 123, LDF, SDF, SEQ ID NO: 126-139, GFG, GSF, GPF, GHF, GIF, GNF, GRF, GDS, GDP, GDH, GDD, GDF, GDN, GDR, GVL, GGE y GLH). El número total de anticuerpos preparados en los Ejemplos 8 y 12 fue 109 y el número de anticuerpos preferidos fue 65.

Los anticuerpos que tienen una afinidad por la presepsina (valor KD) de menos de 10^{-8} M se evaluaron como ○ y los anticuerpos que tienen la afinidad de menos de 10^{-9} M se evaluaron como ⊙. Los anticuerpos que tienen un valor KD de menos de 10^{-7} M pero que exhiben una afinidad casi equivalente a la afinidad por la presepsina del anticuerpo S68 se evaluaron como Δ. De acuerdo con la evaluación del valor de KD, los anticuerpos que se encontró que tenían una actividad de unión particularmente excelente para la presepsina fueron las variantes 5793 y 5810.

La actividad de unión para presepsina se evaluó mediante la relación de absorbancia obtenida en la reacción entre cada anticuerpo y rsCD14ST-Fc frente a la absorbancia obtenida en la reacción entre el anticuerpo S68 y rsCD14ST-Fc, cuando la absorbancia obtenida en la reacción entre el anticuerpo S68 y rsCD14ST-Fc se establece en 1. El anticuerpo con la relación de absorbancia de 4 o más se evaluó como ○ y el anticuerpo con la relación de absorbancia de 5,5 o más se evaluó como ⊙. De acuerdo con la evaluación basada en la comparación de absorbancia, el anticuerpo que se encontró que tenía una actividad de unión particularmente excelente para la presepsina fue la variante 5864, 5979, 5983, 5988 y 6028.

Listado de secuencias<110> Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Novedoso anticuerpo anti-presepsina<130> MD1040WO, G1025WO

<150> EP 15755779,4

<151> 2015-02-25

<150> US 61/944,674

<151> 2014-02-26

<160> 186

<170> PatentIn version 3,5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 1

Lys Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg
1 5 10

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<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> Secuencia Artificial

<400> 3

ES 2 880 225 T3

Thr 1	Thr	Pro	Glu	Pro 5	Cys	Glu	Leu	Asp	Asp 10	Glu	Asp	Phe	Arg	Cys 15	Val
Cys	Asn	Phe	Ser 20	Glu	Pro	Gln	Pro	Asp 25	Trp	Ser	Glu	Ala	Phe 30	Gln	Cys
Val	Ser	Ala 35	Val	Glu	Val	Glu	Ile 40	His	Ala	Gly	Gly	Leu 45	Asn	Leu	Glu
Pro	Phe 50	Leu	Lys	Arg	Val	Asp 55	Ala	Asp	Ala	Asp	Pro 60	Arg	Gln	Tyr	Ala
Asp 65	Thr	Val	Lys	Ala	Leu 70	Arg	Val	Arg	Arg	Leu 75	Thr	Val	Gly	Ala	Ala 80
Gln	Val	Pro	Ala	Gln 85	Leu	Leu	Val	Gly	Ala 90	Leu	Arg	Val	Leu	Ala 95	Tyr
Ser	Arg	Leu	Lys	Glu	Leu	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Lys	Ile	Thr	Gly	Thr

ES 2 880 225 T3

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> 5

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 4
Arg Tyr Ala Met Gly
1 5

5 <210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 5
Ile Ile Tyr Arg Asn Ile Lys Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

10 <210> 6
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

15 <400> 6
Gly Asp Phe
1
 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT

20 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 7
Arg Tyr Thr Met Gly
1 5
 <210> 8
 <211> 15

25 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 8
Ile Ile Asn Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15
 <210> 9

30 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 9

Gly Asp Phe

1

<210> 10

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

<400> 10

Ser Phe Trp Met Ser

1

5

<210> 11

10 <211> 16

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

<400> 11

Ile Ile Ser Asp Ile Asp Asp Leu Phe Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly

1

5

10

15

15 <210> 12

<211> 3

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

<400> 12

Gly Gly Leu

1

20

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

25 <400> 13

Ser Tyr Asp Met Ile

1

5

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

30 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

<400> 14

Tyr Ile Gly Ser Pro Gly Thr Thr Tyr Tyr Gly Ser Trp Ala Lys Gly

1

5

10

15

<210> 15

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 5 <400> 15
 Ser Gly Asp Ile Thr Asn Arg Phe Asn Leu
 1 5 10
 <210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 10 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 16
 Asn Tyr Asp Met Ile
 1 5
 <210> 17
 <211> 16
 15 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 17
 Tyr Ile Gly Ser Pro Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 18
 20 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 18
 Ser Gly Asp Ile Thr Asn Arg Phe Asn Leu
 1 5 10
 25 <210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 19
 Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ile Ser Asn Leu Ala
 30 1 5 10
 <210> 20
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 20

Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

5 <210> 21
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 21

Gln Ser Ser Tyr Thr Glu Ser Thr Thr Phe Gly His Val
1 5 10

10 <210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

15 <400> 22

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 23
 <211> 7
 <212> PRT

20 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 23

Lys Ala Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 24
 <211> 13

25 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 24

Gln Cys Ser Tyr Thr Ala Ile Gly Asn Tyr Gly His Val
1 5 10

<210> 25

30 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 25

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 26

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

<400> 26

Lys Thr Ser Thr Leu Glu Ser
1 5

<210> 27

10 <211> 14

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

<400> 27

Gln Ser Thr Tyr Tyr Arg Ser Thr Thr Thr Tyr Gly Asn Thr
1 5 10

15 <210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

<400> 28

Gln Ala Ser Glu Arg Ile Arg Asn Trp Leu Ser
1 5 10

20

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

25 <400> 29

Arg Ala Ser Thr Leu Glu Ser
1 5

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

<400> 30

Gln Cys Ser Ala Gly Gly Asn Ala Gly Asn Ala
1 5 10

<210> 31

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 5 <400> 31
 Gln Ala Ser Glu Arg Ile Arg Asn Trp Leu Ser
 1 5 10
 <210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 10 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 32
 Arg Ala Ser Thr Leu Glu Ser
 1 5
 <210> 33
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 33
 Gln Cys Ser Ala Gly Gly Asn Ala Gly Asn Gly
 1 5 10
 <210> 34
 20 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 34
 Cys Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu
 1 5 10
 25 <210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens (Humano)
 <400> 35
 Asn Leu Glu Pro Phe Leu Lys Arg Val Asp
 30 1 5 10
 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Homo sapiens (Humano)
 <400> 36
Pro Phe Leu Lys Arg Val Asp Ala Asp Ala
 5 1 5 10
 <210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens (Humano)
 10 <400> 37
Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala
 1 5 10
 <210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens (Humano)
 <400> 38
Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala Asp Thr Val
 1 5 10
 <210> 39
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens (Humano)
 <400> 39
 Arg Gln Tyr Ala Asp Thr Val Lys Ala Leu
 1 5 10
 <210> 40
 25 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens (Humano)
 <400> 40
Ala Asp Thr Val Lys Ala Leu Arg Val Arg
 1 5 10
 30 <210> 41
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens (Humano)
 <400> 41

		Val	Lys	Ala	Leu	Arg	Val	Arg	Arg	Leu	Thr
		1				5					10

<210> 42

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus (Rata)

<400> 42

		Asp	Tyr	Phe	Met	Asn
		1				5

<210> 43

10 <211> 19

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus (Rata)

<400> 43

Gln	Ile	Arg	Asn	Lys	Asn	Tyr	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Ser
1				5					10					15	

Leu Glu Gly

15 <210> 44

<211> 4

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus (Rata)

<400> 44

		Thr	Phe	Asp	Cys
		1			

20 <210> 45

<211> 16

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus (Rata)

25 <400> 45

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Asn	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Ser
1				5					10					15	

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Rattus norvegicus (Rata)

<400> 46

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5
 <210> 47
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus (Rata)
 <400> 47
Gly Gln Gly Thr Gln Tyr Pro Tyr Thr
1 5
 <210> 48
 10 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 48
Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser
 15 **20 25** <210> 49
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 49
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
 20 **1 5 10**
 <210> 50
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 25 <400> 50
Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile
1 5 10 15
Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val
20 25 30
 <210> 51
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

<400> 51

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 52

5 <211> 29

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

<400> 52

Gln Ser Val Glu Gly Ser Arg Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Asn
20 25

10 <210> 53

<211> 14

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

<400> 53

15 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
1 5 10

<210> 54

<211> 31

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

20 <400> 54

Arg Tyr Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Leu
1 5 10 15

Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

25 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

<400> 55

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 56

<211> 43

30 <212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

<400> 56

Met Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu
20 25 30

Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys
35 40

5 <210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus(Conejo)

<400> 57

10 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 58

<211> 32

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

15 <400> 58

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 59

<211> 44

<212> PRT

20 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

<400> 59

Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Gly Asp Pro Val Ala Pro
1 5 10 15

Thr Val Leu Ile Phe Pro Pro Ala Ala Asp Gln Val Ala Thr Gly Thr
20 25 30

Val Thr Ile Val Cys Val Ala Asn Lys Tyr Phe Pro
35 40

<210> 60

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 60

Asp Leu Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Glu Pro Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys
20

5

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <400> 61

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 62

<211> 32

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<400> 62

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Arg Ser Gly Thr Glu Tyr Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 63

<211> 11

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 63

Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Lys Gly Lys
1 5 10

<210> 64

25 <211> 48

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (conejo)

<220>

<221> características_miscláneas

30 <222> (15)..(16)

- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
- <221> características_misceláneas
- 5 <222> (22) .. (22)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
- <221> características_misceláneas
- <222> (42)..(42)
- 10 <223>Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
- <221> características_misceláneas
- <222> (45)..(46)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 15 <400> 64
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Met | Glu | Thr | Gly | Leu | Arg | Trp | Leu | Leu | Leu | Val | Ala | Val | Leu | Xaa | Xaa |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Val | Gln | Cys | Gln | Ser | Xaa | Glu | Glu | Ser | Gly | Gly | Arg | Leu | Val | Thr | Pro |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gly | Thr | Pro | Leu | Thr | Leu | Thr | Cys | Thr | Xaa | Ser | Gly | Xaa | Xaa | Leu | Ser |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
- <210> 65
- <211> 48
- <212> PRT
- 20 <213> Oryctolagus cuniculus (conejo)
- <220>
- <221> características_misceláneas
- <222> (22) .. (22)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 25 <400> 65
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Met | Glu | Thr | Gly | Leu | Arg | Trp | Leu | Leu | Leu | Val | Ala | Val | Leu | Lys | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Val | Gln | Cys | Gln | Ser | Xaa | Glu | Glu | Ser | Gly | Gly | Arg | Leu | Val | Thr | Pro |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gly | Thr | Pro | Leu | Thr | Leu | Thr | Cys | Thr | Ala | Ser | Gly | Phe | Ser | Leu | Ser |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
- <210> 66
- <211> 48

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

<220>

5 <221> características_misceláneas

<222> (15)..(16)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 66

Met	Glu	Thr	Gly	Leu	Arg	Trp	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Val	Leu	Xaa	Xaa
1				5					10					15	
Val	Gln	Cys	Gln	Ser	Val	Glu	Glu	Ser	Gly	Gly	Arg	Leu	Val	Thr	Pro
			20					25					30		
Gly	Thr	Pro	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Ile	Asp	Leu	Ser
		35					40					45			

10 <210> 67

<211> 14

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

<220>

15 <221> características_misceláneas

<222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> características_misceláneas

20 <222> (11)..(12)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 67

Trp	Val	Arg	Gln	Xaa	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Xaa	Xaa	Ile	Gly
1				5					10				

<210> 68

25 <211> 14

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

<220>

<221> características_misceláneas

30 <222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 68

Trp Val Arg Gln Xaa Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
1 5 10

<210> 69

<211> 14

5 <212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus(Conejo)

<400> 69

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 70

10 <211> 31

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

<220>

<221> características_misceláneas

15 <222> (6)..(8)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (12)..(12)

20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (16) .. (16)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25 <220>

<221> características_misceláneas

<222> (19) .. (19)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

30 <221> características_misceláneas

<222> (22) .. (22)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> características_misceláneas

35 <222> (30)..(31)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 70

Arg Phe Thr Ile Ser Xaa Xaa Xaa Ser Thr Thr Xaa Asp Leu Lys Xaa
1 5 10 15

Thr Ser Xaa Thr Thr Xaa Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Xaa Xaa
20 25 30

<210> 71

5 <211> 31

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

<220>

<221> características_misceláneas

10 <222> (9) .. (9)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (16) .. (16)

15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (19) .. (19)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20 <220>

<221> características_misceláneas

<222> (22) .. (22)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

25 <221> características_misceláneas

<222> (31)..(31)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 71

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Xaa Thr Thr Val Asp Leu Lys Xaa
1 5 10 15

Thr Ser Xaa Thr Thr Xaa Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Xaa
20 25 30

30 <210> 72

<211> 31

<212> PRT

- <213> *Oryctolagus cuniculus* (Conejo)
- <220>
- <221> características_misceláneas
- 5 <222> (7)..(8)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
- <221> características_misceláneas
- <222> (12)..(12)
- 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <400> 72
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Lys | Xaa | Xaa | Ser | Thr | Thr | Xaa | Asp | Leu | Lys | Met |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Thr | Ser | Pro | Thr | Thr | Glu | Asp | Thr | Ala | Thr | Tyr | Phe | Cys | Gly | Gly | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
- <210> 73
- <211> 37
- 15 <212> PRT
- <213> *Oryctolagus cuniculus* (Conejo)
- <400> 73
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Gln | Pro | Lys | Ala |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Cys | Cys | Gly | Asp | Thr | Pro | Ser | Ser |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Thr | Val | Thr | Leu | Gly | | | | | | | | | | | |
| | | | 35 | | | | | | | | | | | | |
- <210> 74
- 20 <211> 46
- <212> PRT
- <213> *Oryctolagus cuniculus* (Conejo)
- <220>
- <221> características_misceláneas
- 25 <222> (23) .. (25)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
- <221> características_misceláneas
- <222> (35) .. (37)
- 30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 74

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Xaa Xaa Xaa Val Met Thr Gln Thr Pro Ala
          20          25          30

Ser Val Xaa Xaa Xaa Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys
          35          40          45

```

<210> 75

5 <211> 46

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (conejo)

<220>

<221> características_misceláneas

10 <222> (25) .. (25)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (35) .. (37)

15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 75

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Asp Xaa Val Met Thr Gln Thr Pro Ala
          20          25          30

Ser Val Xaa Xaa Xaa Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys
          35          40          45

```

<210> 76

<211> 45

20 <212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

<400> 76

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
          20          25          30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys
          35          40          45

```

<210> 77
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (2) .. (2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 10 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (6) .. (6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 15 <221> características_misceláneas
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> características_misceláneas
 20 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 77
 Trp Xaa Gln Gln Lys Xaa Gly Gln Pro Pro Lys Xaa Leu Ile Xaa
 1 5 10 15
 <210> 78
 25 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus (conejo)
 <220>
 <221> características_misceláneas
 30 <222> (6) .. (6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 78
 Trp Tyr Gln Gln Lys Xaa Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 <210> 79
 35 <211> 15
 <212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (conejo)
 <220>
 <221> características_misceláneas
 5 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (15)..(15)
 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 79
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Xaa Leu Ile Xaa
1 5 10 15
 <210> 80
 <211> 32
 15 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (1)..(3)
 20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (6) .. (7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 25 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 30 <221> características_misceláneas
 <222> (16) .. (16)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> características_misceláneas
 35 <222> (19) .. (19)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>

<221> características_misceláneas
 <222> (21).. (23)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 5 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (28).. (29)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 10 <221> características_misceláneas
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 80

Xaa	Xaa	Xaa	Ser	Arg	Xaa	Xaa	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Xaa	Phe	Xaa
1				5					10					15	
Leu	Thr	Xaa	Ser	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Ala	Asp	Ala	Xaa	Xaa	Tyr	Xaa	Cys
			20					25					30		

15 <210> 81
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <220>
 20 <221> características_misceláneas
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> características_misceláneas
 25 <222> (6) .. (6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (16) .. (16)
 30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (19) .. (19)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 35 <220>

<221> características_misceláneas

<222> (28) .. (28)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

5 <400> 81

Gly Val Xaa Ser Arg Xaa Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Xaa
1 5 10 15

Leu Thr Xaa Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Xaa Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 82

<211> 32

<212> PRT

10 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

<400> 82

Val Phe Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Ser Cys
20 25 30

<210> 83

<211> 32

15 <212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (conejo)

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (29).. (29)

20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 83

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Ala Asp Ala Ala Xaa Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 84

25 <211> 36

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (conejo)

<400> 84

ES 2 880 225 T3

Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Gly Asp Pro Val Ala Pro
1 5 10 15

Thr Val Leu Ile Phe Pro Pro Ala Ala Asp Gln Val Ala Thr Gly Thr
20 25 30

Val Thr Ile Val
35

<210> 85

<211> 31

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<400> 85

gggggtccgg aggtcgctg gtcacgctg g 31

<210> 86

10 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<400> 86

gggtccggag gagacggtga ccagggtgcc 30

15 <210> 87

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<400> 87

20 ttcatctca agcctcagac 20

<210> 88

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <400> 88

tttcactgc attctagtgtg tggt 24

<210> 89

<211> 35

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<400> 89

gggaattcgc cgccaccatg gagcgcgctg cctgc 35

<210> 90

<211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <400> 90
 gggatccacg cggaaccaga gcatactgcc gcggg 35
 <210> 91
 <211> 40
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (4)..(5)
 <223> n es a, c, g, o t
 15 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (7)..(8)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 20 <221> características_misceláneas
 <222> (10)..(11)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 91
 ggtnnknnkn nktggggcca aggcaccctg gtcaccgtct 40
 25 <210> 92
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 92
 30 gccacaaaaa taagtggccg tgcctcggt tgcggactg 40
 <210> 93
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <400> 93
Ala Asp Phe
1
 <210> 94

<211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 Gly Asp Ala
 5 <400> 94 **1**
 <210> 95
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10 <400> 95
 Arg Tyr Ala Met Gly
 1 5
 <210> 96
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <400> 96
 Ser Tyr Thr Met Gly
 1 5
 <210> 97
 <211> 16
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 97
 Ile Ile Ala Asn Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 98
 25 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 98
 Ala Tyr Thr Met Gly
 1 5
 30 <210> 99
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<400> 99

Gln Cys Ser Tyr Thr Ala Ile Gly Asn Ala Tyr Gly His Val
1 5 10

<210> 100

5 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 100

Gln Ala Ser Gln Ser Ala Gly Ser Asn Leu Ala
1 5 10

10 <210> 101

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 101

Gln Ser Ser Tyr Thr Glu Ser Thr Thr Phe Gly His Val
1 5 10

15 <210> 102

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <400> 102

Lys Thr Ser Thr Leu Glu Ser
1 5

<210> 103

<211> 11

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<400> 103

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 104

<211> 15

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 104

Ile Ile Asn Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Ala Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 105
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial
 <400> 105
 Ile Ile Asn Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 <210> 106
 <211> 15
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 106
 Ile Ile Asn Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ala
 1 5 10 15
 <210> 107
 15 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 107
 Ile Ile Asn Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Gly Lys Gly
 1 5 10 15
 20 <210> 108
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 108
 Ile Val Ser Ser Asp Gly Gly Ile Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 25 1 5 10 15
 <210> 109
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <400> 109
 Ile Ile Tyr Arg Asn Ile Lys Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 110
 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

$\langle 400 \rangle$ 110

Ile Ile Ser Asp Ile Asp Gln Ile Val Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
5 1 5 10 15

$\langle 210 \rangle$ 111

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <400> 111

Ile Ile Ser Asp Ile Asp Asp Leu Phe Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 112

<211> 13

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<400> 112

Gln Cys Ser Tyr Thr Ala Ile Gly Asn Tyr Gly His Ala
1 5 10

<210> 113

<211> 13

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 113

Gln Cys Ser Tyr Thr Ala Ile Gly Asn Tyr Ala His Val
1 5 10

25 <210> 114

 $\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 114

Gln Ala Ala Gln Ser Ile Gly Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 115

 $\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

Gln Gly Ser Gln Ser Ile Gly Ser Asn Leu Ala
 <400> 115 1 5 10
 <210> 116
 <211> 13
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 116
 Ala Cys Ser Tyr Thr Ala Ile Gly Asn Tyr Gly His Val
 1 5 10
 <210> 117
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 117
 Lys Ala Ser Lys Ala Ala Ser
 1 5
 15 <210> 118
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 118
 Lys Ala Ala Lys Leu Ala Ser
 1 5
 20 <210> 119
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25 <400> 119
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Asn Ala Ala
 1 5 10
 <210> 120
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial
 <400> 120
 Ala Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Asn Leu Ala
 1 5 10

<210> 121

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<400> 121

Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 122

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 122

Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ile Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 123

15 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 123

Gln Ala Ser Gln Asn Ile Gly Ser Asp Leu Ser
1 5 10

20 <210> 124

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 124

Leu Asp Phe
1

25

<210> 125

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <400> 125

Ser Asp Phe
1

<210> 126

<211> 5

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 126

 5 Met Tyr Thr Met Gly
 1 5
 <210> 127
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10 <400> 127

 Pro Tyr Thr Met Gly
 1 5
 <210> 128
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <400> 128
 Val Tyr Thr Met Gly
 1 5
 <210> 129
 <211> 5
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 129

 Ile Tyr Thr Met Gly
 1 5
 <210> 130
 25 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 130

 Asp Tyr Thr Met Gly
 1 5
 30 <210> 131
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

	<400> 131				
			Glu Tyr Thr Met Gly		
			1		5
	<210> 132				
5	<211> 5				
	<212> PRT				
	<213> Secuencia Artificial				
	<400> 132				
			His Tyr Thr Met Gly		
			1		5
10	<210> 133				
	<211> 5				
	<212> PRT				
	<213> Secuencia Artificial				
	<400> 133				
			Thr Tyr Thr Met Gly		
15			1		5
	<210> 134				
	<211> 5				
	<212> PRT				
	<213> Secuencia Artificial				
20	<400> 134				
			Gln Tyr Thr Met Gly		
			1		5
	<210> 135				
	<211> 5				
	<212> PRT				
25	<213> Secuencia Artificial				
	<400> 135				
			Tyr Tyr Thr Met Gly		
			1		5
	<210> 136				
	<211> 5				
30	<212> PRT				
	<213> Secuencia Artificial				
	<400> 136				
			Gly Tyr Thr Met Gly		
			1		5

<210> 137
 <211> 5
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial
 <400> 137
Lys Tyr Thr Met Gly
1 5
 <210> 138
 <211> 5
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 138
Asn Tyr Thr Met Gly
1 5
 <210> 139
 15 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 139
Trp Tyr Thr Met Gly
1 5
 20 <210> 140
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 140
Gly Phe Phe
 25 **1**
 <210> 141
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <400> 141
Gly Ser Phe
1
 <210> 142
 <211> 3

	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
	<400> 142	
	Gly Pro Phe	
5	1	
	<210> 143	
	<211> 3	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<400> 143	
	Gly His Phe	
	1	
	<210> 144	
	<211> 3	
	<212> PRT	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<400> 144	
	Gly Ile Phe	
	1	
	<210> 145	
	<211> 3	
20	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
	<400> 145	
	Gly Asn Phe	
	1	
	<210> 146	
25	<211> 3	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
	<400> 146	
	Gly Arg Phe	
	1	
30	<210> 147	
	<211> 3	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	

<400> 147

Gly Asp Ser
1

<210> 148

5 <211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 148

Gly Asp Pro
1

10 <210> 149

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 149

Gly Asp His
1

15

<210> 150

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <400> 150

Gly Asp Asp
1

<210> 151

<211> 3

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<400> 151

Gly Asp Ile
1

<210> 152

<211> 3

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 152

Gly Asp Asn
1

<210> 153
 <211> 3
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial
 <400> 153

 Gly Asp Arg
 1

 <210> 154
 <211> 3
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 154

 Gly Val Leu
 1

 <210> 155
 15 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 155

 Gly Gly Glu
 1

 20 <210> 156
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 156

 Gly Leu His
 25 1
 <210> 157
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 30 <400> 157
 taggtatgca atggg 15
 <210> 158
 <211> 48
 <212> ADN

<213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 158
 atcattata gaaatattaa gacatactac gcgacctggg ccaaaggc 48

5 <210> 159
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 159

10 ggggacttt 9
 <210> 160
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

15 <400> 160
 taggtataca atggg 15
 <210> 161
 <211> 45
 <212> ADN

20 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 161
 atcattaata gtggtgccac atactacgcg agctgggcga aaggc 45
 <210> 162
 <211> 9

25 <212> ADN
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 162
 ggggacttt 9
 <210> 163

30 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 163
 tagcttctgg atgag 15

35 <210> 164
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)

<400> 164
 attattagt atattgatga cctattctac gcgagctggg cgaaaggc 48
 <210> 165
 5 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 165
 ggtggttg 9
 10 <210> 166
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 166
 15 agctacgaca tgatc 15
 <210> 167
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 20 <400> 167
 tacattggga gtcccgggac cacatactac gggagctggg cgaaaggc 48
 <210> 168
 <211> 30
 <212> ADN
 25 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 168
 tctggtgata ttactaatag atttaactg 30
 <210> 169
 <211> 15
 30 <212> ADN
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 169
 aactacgaca tgatc 15
 <210> 170
 35 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 170

tacattggga gtcccgggac cacttactac gcgagctggg cgaaaggc 48
 <210> 171
 <211> 30
 5 <212> ADN
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 171
 tctggtgata tcacaaatag atttaatttg 30
 <210> 172
 10 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 172
 caggccagtg aggatattat tagtaattta gcc 33
 15 <210> 173
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 273
 20 aaggcatcca ctctggcatc t 21
 <210> 174
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 25 <400> 174
 cagagcagtt atactgagag tactactttt ggacatgtt 39
 <210> 175
 <211> 33
 <212> ADN
 30 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 175
 caggccagtc agagtattgg tagtaattta gcc 33
 <210> 176
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 176
 aaggcatcta aactggcatc t 21

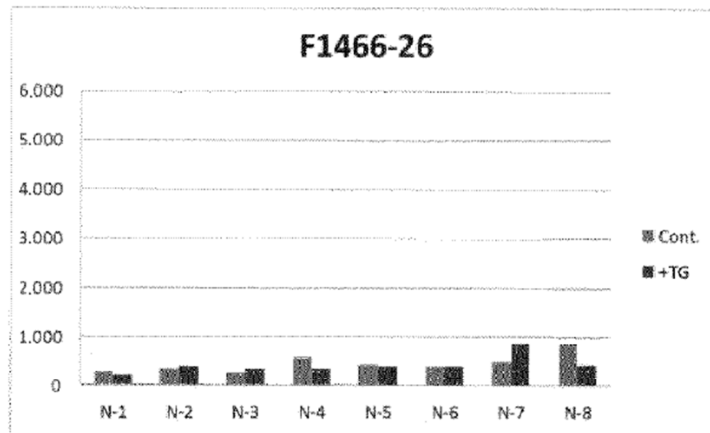
<210> 177
 <211> 39
 <212> ADN
 5 <213> *Oryctolagus cuniculus* (Conejo)
 <400> 177
 caatgcagtt atactgcaat tggtaattat ggacatggt 39
 <210> 178
 <211> 33
 10 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus* (Conejo)
 <400> 178
 caggccagtc agagcattag taactactta gcc 33
 <210> 179
 15 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus* (Conejo)
 <400> 179
 aagacatcca ctctggaatc t 21
 20 <210> 180
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus* (Conejo)
 <400> 180
 25 caaagtactt attataggag tactacaact tatggtata c 42
 <210> 181
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus* (Conejo)
 30 <400> 181
 caggccagtg agaggattag gaattggtta tcc 33
 <210> 182
 <211> 21
 <212> ADN
 35 <213> *Oryctolagus cuniculus* (Conejo)
 <400> 182
 agggcctcca ctctagaatc t 21
 <210> 183

<211> 33
 <212> ADN
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 5 <400> 183
 caatgtagtg ctggtggcaa tgctggtaat gct 33
 <210> 184
 <211> 33
 <212> ADN
 10 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 184
 caggccagtg agaggattag gaattggta tcc 33
 <210> 185
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 185
 agggcctcca ctctagaatc t 21
 <210> 186
 20 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Oryctolagus cuniculus (Conejo)
 <400> 186
 caatgtagtg ctggtggcaa tgctggtaat ggt 33
 25

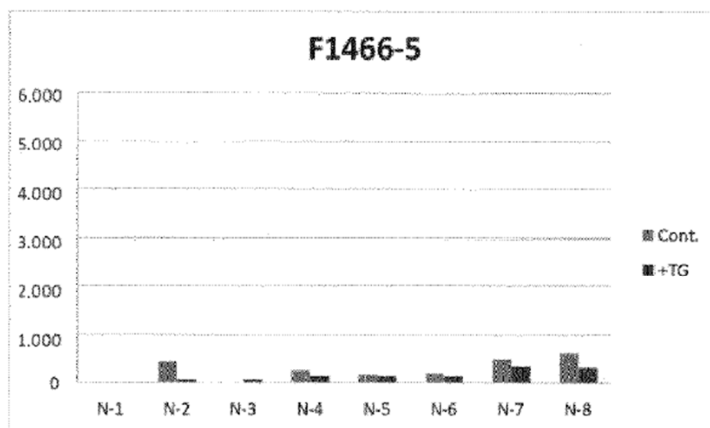
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal anti-presepsina o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o el fragmento reconoce específicamente un epítipo que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o el fragmento se une a la presepsina en menos de 10^{-8} M de afinidad (KD).
- 10 3. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo o el fragmento se produce utilizando un péptido de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 como un antígeno de administración.
- 15 4. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el fragmento de anticuerpo de unión a antígeno es un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno seleccionado del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂, anticuerpo monocatenario (scFv), región V dimerizada (diacuerpo), región V estabilizada con disulfuro (dsFv), sc(Fv)₂, un polipéptido que comprende CDR, un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada y un polipéptido que comprende una región variable de cadena liviana.

A.



B.



C.

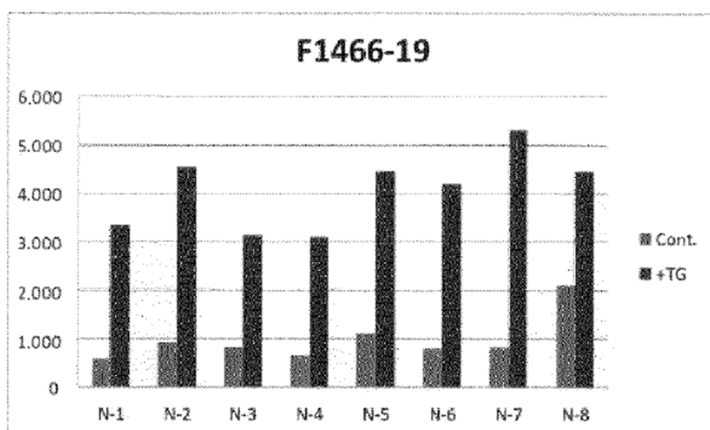


Figura 1

Variante	VH				VL				Eva-luación
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR4	CDR1	CDR2	CDR3	KD	
5784	RYTMG	INNSGATTVASWAKG		ADF (Seuencia ID No. 93)	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAGNTGVH	3,73E-09	○
5793	RYTMG	INNSGATTVASWAKG		GDA (Seuencia ID No. 94)	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAGNTGVH	7,30E-10	⊗
5795	RYTMG	(Seuencia ID No. 95)		GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAGNTGVH	1,71E-09	○
5803	SYTMG	(Seuencia ID No. 96)		GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAGNTGVH	4,20E-09	○
5810	RYTMG		(Seuencia ID No. 97)	GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAGNTGVH	6,52E-12	⊗
5811	AYTMG	(Seuencia ID No. 98)		GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAGNTGVH	1,13E-08	△
5844	RYTMG	INNSGATTVASWAKG		GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAGNTGVH	9,82E-09	○
5858	RYTMG	INNSGATTVASWAKG		GDF	QASQSIGSNLA	(Seuencia ID No. 100)	QCSYTAGNTGVH	9,04E-09	○
5874	RYTMG	INNSGATTVASWAKG		GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAGNTGVH	1,95E-08	△
5875	RYTMG	INNSGATTVASWAKG		GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAGNTGVH	1,90E-08	△
5878	RYTMG	INNSGATTVASWAKG		GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAGNTGVH	1,43E-08	△
5884	RYTMG	INNSGATTVASWAKG		GDF	QASQSIGSNLA	KASKLAS	QCSYTAGNTGVH	7,57E-09	○

Figura 2

Variante	VII					VI				pCD45T-4e razón OD	exp- lución
	CDR1	CDR2		CDR3		CDR1	CDR2		CDR3		
5807	RYTBMG	INSGATYYASWAKG	(Secuencia ID No. 104)	GDF		QASQISGNLA	KASKLAS		QCSYTAIGNYGHV	4,3	○
5808	RYTBMG	INSGATYYASWAKG	(Secuencia ID No. 105)	GDF		QASQISGNLA	KASKLAS		QCSYTAIGNYGHV	5,3	○
5809	RYTBMG	INSGATYYASWAKA	(Secuencia ID No. 106)	GDF		QASQISGNLA	KASKLAS		QCSYTAIGNYGHV	5,1	○
5812	RYTBMG	INSGATYYASWAKG	(Secuencia ID No. 107)	GDF		QASQISGNLA	KASKLAS		QCSYTAIGNYGHV	4,5	○
5814	RYTBMG	INSGATYYASWAKG	(Secuencia ID No. 108)	GDF		QASQISGNLA	KASKLAS		QCSYTAIGNYGHV	5,3	○
5816	RYTBMG	INSGATYYATWAKG	(Secuencia ID No. 109)	GDF		QASQISGNLA	KASKLAS		QCSYTAIGNYGHV	4,4	○
5817	RYTBMG	INSGATYYATWAKG	(Secuencia ID No. 110)	GDF		QASQISGNLA	KASKLAS		QCSYTAIGNYGHV	4,2	○
5841	RYTBMG	INSGATYYASWAKG	(Secuencia ID No. 111)	GDF		QASQISGNLA	KASKLAS		QCSYTAIGNYGHV	4,3	○
5842	RYTBMG	INSGATYYASWAKG		GDF		QASQISGNLA	KASKLAS		QCSYTAIGNYGHV (Secuencia ID No. 112)	4,7	○
5843	RYTBMG	INSGATYYASWAKG		GDF		QASQISGNLA	KASKLAS		QCSYTAIGNYGHV (Secuencia ID No. 113)	4,7	○
5849	RYTBMG	INSGATYYASWAKG		GDF		QASQISGNLA (Secuencia ID No. 114)	KASKLAS		QCSYTAIGNYGHV	4,6	○
5869	RYTBMG	INSGATYYASWAKG		GDF		QASQISGNLA (Secuencia ID No. 115)	KASKLAS		QCSYTAIGNYGHV	5,2	○
5881	RYTBMG	INSGATYYASWAKG		GDF		QASQISGNLA	KASKLAS		QCSYTAIGNYGHV (Secuencia ID No. 116)	4,5	○
5882	RYTBMG	INSGATYYASWAKG		GDF		QASQISGNLA	KASKLAS		QCSYTAIGNYGHV (Secuencia ID No. 117)	4,4	○
5883	RYTBMG	INSGATYYASWAKG		GDF		QASQISGNLA	KASKLAS		QCSYTAIGNYGHV (Secuencia ID No. 118)	5,2	○
5884	RYTBMG	INSGATYYASWAKG		GDF		QASQISGNLA (Secuencia ID No. 119)	KASKLAS		QCSYTAIGNYGHV	5,7	⊗
5885	RYTBMG	INSGATYYASWAKG		GDF		QASQISGNLA	KASKLAS		QCSYTAIGNYGHV	4,7	○
5877	RYTBMG	INSGATYYASWAKG		GDF		QASQISGNLA	KASKLAS (Secuencia ID No. 121)		QCSYTAIGNYGHV	4,6	○
5884	RYTBMG	INSGATYYASWAKG		GDF		QASQISGNLA (Secuencia ID No. 122)	KASKLAS		QCSYTAIGNYGHV	4,7	○

Figura 2-1

5910	RYTMG		INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA	(Sequencia ID No. 125)	KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		4,2	○
5920	RYTMG		INSGATYYASWAKG		<u>LDF</u>	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		3,1	
5925	RYTMG		INSGATYYASWAKG		<u>SDF</u>	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		4,4	○
5932	<u>RYTMG</u>	(Sequencia ID No. 126)	INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		4,3	○
5933	<u>RYTMG</u>	(Sequencia ID No. 127)	INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		4,8	○
5934	<u>RYTMG</u>	(Sequencia ID No. 128)	INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		5,1	○
5935	<u>RYTMG</u>	(Sequencia ID No. 129)	INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		5,9	○
5937	<u>RYTMG</u>	(Sequencia ID No. 130)	INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		4,5	○
5938	<u>RYTMG</u>	(Sequencia ID No. 131)	INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		4,5	○
5939	<u>RYTMG</u>	(Sequencia ID No. 132)	INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		5,9	○
5940	<u>RYTMG</u>	(Sequencia ID No. 133)	INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		4,8	○
5941	<u>RYTMG</u>	(Sequencia ID No. 134)	INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		4,9	○
5942	<u>RYTMG</u>	(Sequencia ID No. 135)	INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		4,9	○
5943	<u>RYTMG</u>	(Sequencia ID No. 136)	INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		4,6	○
5944	<u>RYTMG</u>	(Sequencia ID No. 137)	INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		5,9	○
5945	<u>RYTMG</u>	(Sequencia ID No. 138)	INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		4,1	○
5946	<u>RYTMG</u>	(Sequencia ID No. 139)	INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		4,5	○
5976	RYTMG		INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		4,7	○
5977	RYTMG		INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		4,7	○
5978	RYTMG		INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		4,6	○
5979	RYTMG		INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		5,5	○
5980	RYTMG		INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		5,3	○
5981	RYTMG		INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		4,4	○
5982	RYTMG		INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		4,7	○
5983	RYTMG		INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		5,5	○
5984	RYTMG		INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		5,1	○
5985	RYTMG		INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		4,9	○
5986	RYTMG		INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		4,4	○
5987	RYTMG		INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		5,2	○
5988	RYTMG		INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		5,6	○
5989	RYTMG		INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		4,5	○
6026	RYTMG		INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		4,6	○
6028	RYTMG		INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		5,5	○
6029	RYTMG		INSGATYYASWAKG		GDF	QASQSGSRLA		KASRLAS		QCSYTAGNSGHV		5,1	○

Figura 2-2