

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 200380103145.4

[51] Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

C12N 15/06 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 11 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 100558746C

[22] 申请日 2003.11.12

[21] 申请号 200380103145.4

[30] 优先权

[32] 2002.11.12 [33] JP [31] 328866/2002

[32] 2003.9.22 [33] JP [31] 330775/2003

[86] 国际申请 PCT/JP2003/014389 2003.11.12

[87] 国际公布 WO2004/044005 日 2004.5.27

[85] 进入国家阶段日期 2005.5.12

[73] 专利权人 持田制药株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 古迫正司 白川嘉门

[56] 参考文献

EP1213586A1 2002.6.12

WO 9620956A1 1996.7.11

WO0242333A1 2002.5.30

WO0172993A1 2001.10.4

审查员 周 霞

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭广迅 王景朝

权利要求书 2 页 说明书 64 页 附图 7 页

[54] 发明名称

人低分子量 CD14 测定试剂盒和抗体

[57] 摘要

本发明提供了使用一种肽作为抗原制备的抗体,该肽具有选自人高分子量 CD14 的 1 到 68 位的氨基酸序列的 8 到 30 个氨基酸残基,或者结合包括 1 到 68 位特定氨基酸序列的肽的抗体。使用该抗体的人低分子量 CD14 的测定试剂盒和本发明的测定方法,优选三明治方法,能够以简单方式高度灵敏和特异地定性或定量确定人低分子量 CD14,从而它们可用于脓毒症患者的诊断。

1. 用于测定人低分子量 CD14 而不检测人高分子量 CD14 的三明治免疫测定试剂盒, 该试剂盒含有:

- (a) 结合由 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列组成的肽的抗体;
- (b) 结合由 SEQ ID NO: 5 的第 17 位至第 26 位氨基酸序列组成的肽的抗体;

其中所述人低分子量 CD14 具有以下特性:

- (1) 不结合保藏号为 FERM BP-7296 的 F1025-3-1 抗体,
- (2) 凝胶过滤层析时显示出 25 到 45 kDa 的分子量范围中的峰;
- (3) 可以从人血获得。

2. 用于测定人低分子量 CD14 而不检测人高分子量 CD14 的三明治免疫测定试剂盒, 该试剂盒含有:

- (a) 结合由 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列组成的肽的抗体;
- (b) 与结合由 SEQ ID NO: 5 的第 17 位至第 26 位氨基酸序列组成的肽的抗体竞争的抗体;

其中所述人低分子量 CD14 具有以下特性:

- (1) 不结合保藏号为 FERM BP-7296 的 F1025-3-1 抗体,
- (2) 凝胶过滤层析时显示出 25 到 45 kDa 的分子量范围中的峰;
- (3) 可以从血液获得。

3. 一种抗体, 其结合人低分子量 CD14, 其中所述抗体是用由 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列组成的肽制备的, 其中所述人低分子量 CD14 具有以下特性:

- (1) 不结合保藏号为 FERM BP-7296 的 F1025-3-1 抗体,
- (2) 凝胶过滤层析时显示出 25 到 45 kDa 的分子量范围中的峰;
- (3) 可以从血液获得。

4. 一种抗体, 其结合人低分子量 CD14, 不结合人高分子量 CD14, 其中所述抗体是用由 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列组成的肽制备的, 其中所述人低分子量 CD14 具有以下特性:

- (1) 不结合保藏号为 FERM BP-7296 的 F1025-3-1 抗体,
- (2) 凝胶过滤层析时显示出 25 到 45 kDa 的分子量范围中的峰;
- (3) 可以从血液获得。

5. 一种抗体, 其结合由 SEQ ID NO: 5 的第 17 位至第 26 位的氨

氨基酸序列组成的肽。

6. 一种抗体，其与结合由 SEQ ID NO: 5 的第 17 位至第 26 位的氨基酸序列组成的肽的抗体竞争。

人低分子量 CD14 测定试剂盒和抗体

技术领域

本发明涉及使用肽作为抗原制备的抗体,该肽具有选自人高分子量 CD14 的特定氨基酸序列的 8 到 30 个氨基酸残基。此外,本发明涉及结合具有人高分子量 CD14 的氨基酸序列中特定氨基酸序列的肽。

此外,本发明涉及人低分子量 CD14 的测定试剂盒和测量人低分子量 CD14 的方法。此外,本发明涉及脓毒症的新诊断方法,其中低分子量 CD14 被直接确定。此外,本发明涉及可用于制备上面的抗体的肽和制备该抗体的方法。

背景技术

在 1986 年的第三届白细胞分型会议(Third Leukocyte Typing Conference)上将 CD14 分子命名为通过识别在单核细胞的膜表面上表达的糖蛋白的抗体家族鉴定的蛋白质。1990 年,Wright 等人阐明 CD14 分子是内毒素 LPS 的受体(“Science”,卷 249,1431-1433 页,1990)。该 CD14 分子是分子量为 53-55kDa 的糖蛋白,对 cDNA 的分析揭示 1.4kb mRNA 具有 356 个氨基酸的编码序列(“Nucleic Acids Research”(U.K.),卷 16,4173 页,1988)。

据报导人 CD14 分子包括可溶性 CD14 分子以及膜结合的 CD14 分子,并且血液含有具有不同分子量的可溶性 CD14 分子(“European Journal of Immunology”(德国),卷 23,2144-2151 页,1993)。此外,Landmann 等人进行了对患有脓毒症的患者的血清中可溶性 CD14 的蛋白质印迹分析并且报导在未幸存的脓毒症患者和阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)患者中有高水平的约 55 kDa 的可溶性 CD14,在正常血清中,没有检测到该分子但是检测到 49kDa(分子量比前者稍低)的可溶性 CD14 分子(“The Journal of Infectious Disease”,卷 171,639-644 页,1995)。

Stelter 报导糖链的差异与具有不同分子量的那些亚型有关,并且甚至在除去 N-和 O-连接的糖链后仍然发现血液中具有不同分子量的两种可溶性 CD14 亚型(“European Journal of Biochemistry”(德国),卷 236,457-464 页,1996)。此外,Bufler 等人对可溶性 CD14

进行了 C-末端分析并报导 GPI 组结合可溶性 CD14 的 327 位的丝氨酸残基,并且具有约 56kDa 分子量的一种 CD14 分子是 GPI 不锚定的分子种类之一(“European Journal of Immunology”(德国),卷 25,604-610 页,1995)。

抗 CD14 分子的抗体包括许多抗 CD14 抗体,它们已经被制备并用于 CD14 蛋白的鉴定,如 Bazil 等人(“European Journal of Immunology”(德国),卷 16,1583-1589 页,1986)MEM-18, shutt 等人制备的 RoMo-1(“Allergie and Immunologie”(Germany),Vol. 34, p.17-26,1988),和 Steinman 等人(Journal of Experimental Medicine”(美国),卷 158,126-145 页,1983)制备的 3C10。

此外,Shutt 等人(DE-286876-A)、Bazil 等人(“Molecular Immunology”(英国),卷 26,657-662,1989),和 Grunwald 等人(“Journal of Immunological Methods”(荷兰),卷 155,225-232 页,1992)已经报导使用这些抗体的可溶性 CD-14 测定系统,容许分析人体液中的可溶性 CD14。

此外,IBL-Hanburg、Medgenix,和 R&D Systems 已经上市了可溶性 CD14-ELISA 试剂盒,并且已经为许多疾病如脓毒症进行了可溶性 CD14 测定(“Clinical Immunology And Immunopathology”(美国),卷 80,307-310 页,1996;和 “Rinshokensa”,卷 38,341-344 页,1994)。

然而,发现可溶性 CD14 不是脓毒症-特异性标记物,因为既使在脓毒症之外的疾病中,约 55 kDa 和 49 kDa(不同报导之间,分子量是不同的并且不限于约 55 kDa 和 49 kDa,并且这同样适用于下面的描述中)的可溶性分子的水平也根据疾病发展的程度而增加(“Infection and Immunity”(美国),卷 67,417-420 页,1999; “Clinical and Experimental Immunology”(英国),卷 120,483-487 页,2000;和 “Clinical Experimental Immunology”(英国),卷 96,15-19 页,1994)。此外,预期可溶性 CD14 是脓毒症严重性的标记。然而,可溶性 CD14 还没有被提供作为脓毒症的诊断性产品,因为可溶性 CD14 与脓毒性休克没有相关性(“Pediatric allergy and immunology”(丹麦),卷 8,194-199,1997 页)并且与系统性炎症反应综合症也没有相关性(SIRS)(“European Journal of Clinical Investigation”(英

国), 卷 28, 672-678, 1998)。

EP1213586 公开了一种分级测定低分子量可溶性 CD14 蛋白的方法, 其中涉及 F1025-3-1 抗体(保藏号为 FERM BP-7296)。

W09620956 公开了基于 CD14 的氨基酸 7-10、11-14 和 57-64 的抗炎性 CD14 肽。

本发明的发明人已经发现血液中存在约为 36 kDa 的低分子量可溶性 CD14 分子以及其他分子如 Landmann 等报导的约 55 kDa 和 49 kDa 的上述两种可溶性 CD14 分子(高分子量 CD14(不同报导之间, 分子量是不同的并且不限于约 55 kDa 和 49 kDa, 并且这同样适用于下面的描述中))。本发明的发明人还发现在正常个体中存在少量低分子量 CD14 并且在脓毒症患者中存在增加量的该低分子量 CD14。从而, 本发明的发明人证实了对可溶性低分子量 CD14 的测定的临床效能。然而, 本领域中公知的抗-CD14 抗体是识别高分子量可溶 CD14 蛋白或者识别高-和低-分子量可溶 CD14 蛋白的抗体。因而, 本领域中还没有仅识别低分子量 CD14 的抗体。此外, 已经认为低分子量 CD14 蛋白的氨基酸序列与高分子量可溶性 CD14 蛋白的氨基酸序列的一部分相同, 所以认为制备如上述的抗体和使用该抗体对低分子量 CD14 的直接免疫学测定是困难的。因此, 作为对可溶性低分子量 CD14 的测定, 建议血液中可溶性 CD14 的总水平减去血液中高分子量 CD14 的水平间接得到血液中低分子量 CD14 的水平。

发明内容

在这种情况下, 希望存在方便地、高度灵敏和特异地定性或定量确定人低分子量 CD14 的测定法, 该测定法容许直接确定人低分子量 CD14 并且可用于脓毒症患者的诊断, 和该测定法的测定试剂盒。此外, 希望有用于该测定法的针对人低分子量 CD14 的抗体。

本发明的发明人在大量研究后已经发明了使用一种肽作为抗原制备的抗体, 该肽具有选自人高分子量 CD14 的 1 到 68 位的氨基酸序列的 8 到 30 个氨基酸残基, 该抗体可用于方便地、高度灵敏和特异地定性或定量确定人低分子量 CD14。此外, 本发明的发明人发明了结合具有人高分子量 CD14 的氨基酸序列中特定氨基酸序列的肽的抗体。

此外, 本发明的发明人发明了特异确定人低分子量 CD14 的测定法和人低分子量 CD14 的测定试剂盒。而且, 本发明的发明人发明了脓毒症的新的诊断方法, 其中人低分子量 CD14 被直接确定。此外, 本发明的发明人发明了用于制备上面的抗体的肽和制备上面抗体的方法。

换句话说, 本发明提供了下面的新抗体和人低分子量 CD14 的测定试剂盒。

(1) 如在下面的(1-1)到(1-5)中描述的抗体:

(1-1) 使用一种肽作为抗原制备的抗体, 该肽具有选自 SEQ ID NO: 1 中描述的氨基酸序列的连续的 8 到 30 个氨基酸残基。

(1-2) 使用一种肽作为抗原制备的抗体, 该肽具有选自 SEQ ID NO: 1 中描述的氨基酸序列的连续的 8 到 20 个氨基酸残基。

(1-3) 使用一种肽作为抗原制备的抗体, 该肽具有选自 SEQ ID NO: 1 中描述的氨基酸序列中 53 到 68 位的氨基酸序列的连续的 8 到 16 个氨基酸残基。

(1-4) 使用一种肽作为抗原制备的抗体, 该肽具有 SEQ ID NO: 2 到 4 任何一个中描述的氨基酸序列。

(1-5) 使用一种肽作为抗原制备的抗体, 该肽具有选自 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基。

(2) 如在下面的(2-1)和(2-2)中描述的抗体:

(2-1) 结合具有 SEQ ID NO: 2 到 4 任何一个中描述的氨基酸残基的肽的抗体。

(2-2) 结合具有 SEQ ID: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体。

(3) 人低分子量 CD14 测定试剂盒, 其在下面的(3-1)和(3-22)中表示:

(3-1) 用于直接测定样品中人低分子量 CD14 而不检测人高分子量 CD14 的人低分子量 CD14 的测定试剂盒, 该试剂盒含有结合至少一种人低分子量 CD14 或者其片段的抗体。

(3-2) (3-1) 的人低分子量 CD14 测定试剂盒, 其中结合人低分子量 CD14 或者其片段的抗体是上面的(1-1)到(1-5)、(2-1)、或(2-2)任一项中描述的抗体, 或者其片段。

(3-3) (3-1) 的人低分子量 CD14 测定试剂盒, 其中结合人低分子量 CD14 或者其片段的抗体是上面的(1-4)、(1-5)、(2-1)、或(2-2)任一项中描述的抗体, 或者其片段。

(3-4) (3-1) 的人低分子量 CD14 测定试剂盒, 其中结合人低分子量 CD14 或者其片段的抗体是上面的(1-5)或(2-2)任一项中描述的抗体, 或者其片段。

(3-5) (3-1)到(3-4)任一项的人低分子量 CD14 测定试剂盒, 其中人低分子量 CD14 通过三明治免疫测定法测定。

(3-6) (3-5)的人低分子量 CD14 测定试剂盒,其还含有结合人低分子量 CD14 的第二结合物质。

(3-7) (3-6)的人低分子量 CD14 测定试剂盒,其中第二结合物质是结合人低分子量 CD14 或者其片段的抗体。

(3-8) (3-6)的人低分子量 CD14 测定试剂盒,其中第二结合物质是结合人低分子量 CD14 的单克隆抗体。

(3-9) (3-6)的测定试剂盒,其中第二结合物质是结合下面的任一区域的抗体:人高分子量 CD14 的 1 到 52 位的氨基酸残基;其片段;与结合人高分子量 CD14 的 1 到 52 位的氨基酸残基的任一区域的抗体竞争或者显示出交叉反应性的抗体;或者其片段。

(3-10) (3-6)的测定试剂盒,其中第二结合物质是:结合人高分子量 CD14 的 17 到 26 位任一个氨基酸残基的抗体;其片段;与结合人高分子量 CD14 的 17 到 26 位的任一个氨基酸残基的抗体竞争或者显示出交叉反应性的抗体;或者其片段。

(3-11) (3-6)到(3-10)任一项的人低分子量 CD14 的测定试剂盒,其中在上面的(1-1)到(1-5)、(2-1),或(2-2)的任一项中描述的抗体或者其片段与不可溶的载体结合。

(3-12) (3-6)到(3-10)任一项的人低分子量 CD14 的测定试剂盒,其中第二结合物质与不可溶的载体结合。

(3-13) (3-6)到(3-10)任一项的人低分子量 CD14 的测定试剂盒,其中在上面的(1-1)到(1-5)、(2-1),或(2-2)的任一项中描述的抗体,或者其片段被标记。

(3-14) (3-6)到(3-11)任一项的人低分子量 CD14 的测定试剂盒,其中第二结合物质被标记。

(3-15) (3-6)到(3-14)任一项的人低分子量 CD14 的测定试剂盒,其还含有:第二特异结合物质和该第二特异结合物质的配偶体,其中该第二结合物质和其配偶体一起形成第二特异结合。

(3-16) (3-15)的人低分子量 CD14 的测定试剂盒,其中第二结合物质或其配偶体与不可溶的载体结合。

(3-17) (3-15)的人低分子量 CD14 的测定试剂盒,其中第二特异结合物质或其配偶体被标记。

(3-18) (3-5)到(3-12)、(3-15),和(3-16)任一项的人低分子量

CD14 的测定试剂盒，其还含有标记的人低分子量 CD14 或者标记的人低分子量 CD14 类似物，其中通过三明治免疫测定法基于竞争方法实施测定。

(3-19) (3-5) 到 (3-18) 任一项的人低分子量 CD14 的测定试剂盒，其中标记为酶、染料、金胶体、有色乳胶、化学发光物质、荧光物质，和同位素中的至少一种。

(3-20) (3-5) 到 (3-19) 任一项的人低分子量 CD14 的测定试剂盒，其中三明治免疫测定法是使用免疫层析的测定方法。

(3-21) (3-5) 到 (3-19) 任一项的人低分子量 CD14 的测定试剂盒，其中三明治免疫测定法是使用流通 (flow through) 方法的测定方法。

(3-22) (3-1) 的人低分子量 CD14 的测定试剂盒，其中通过凝集方法、直接固相方法，或者竞争方法实施测定。

此外，提供了下面的人低分子量 CD14 的测定法、脓毒症的新型诊断方法、肽、和制备抗体的方法：

(4) 如下面的 (4-1) 到 (4-3) 中描述的人低分子量 CD14 的测定法。

(4-1) 人低分子量 CD14 的测定方法，其使用结合至少一种人低分子量 CD14 的抗体直接测定人低分子量 CD14 以便检测人低分子量 CD14 而不检测人高分子量 CD14。

(4-2) (4-1) 的人低分子量 CD14 的测定方法，其中结合人低分子量 CD14 的抗体是上面 (1-1) 到 (1-5)、(2-1) 或 (2-2) 任一项中描述的抗体，或者其片段。

(4-3) (4-2) 的人低分子量 CD14 的测定方法，其中通过三明治免疫测定法确定人低分子量 CD14。

(5) 脓毒症的诊断方法，其直接测定人低分子量 CD14。

(6) 具有 SEQ ID NO: 2 到 4 任一项中描述的氨基酸残基的肽。

(7) 如下面的 (7-1) 和 (7-2) 中描述的制备抗体的方法。

(7-1) 制备上面的 (1-1) 到 (1-5)、(2-1)、和 (2-2) 的任一项的抗体的方法，其中具有选自 SEQ ID NO: 1 中描述的氨基酸序列的连续 8 到 30 个氨基酸残基的肽，或者具有 SEQ ID NO: 2 到 4 任一项中描述的氨基酸残基的肽被用作抗原。

(7-2) 制备(1-4)、(1-5)、(2-1)、和(2-2)的任一项抗体的方法, 其中具有 SEQ ID NO: 2 到 4 任一项中描述的氨基酸残基的肽被用作抗原。

本发明的抗体可用于本发明的人低分子量 CD14 的测定试剂盒, 并且该试剂盒容许方便地、高度灵敏和特异地定性或定量测量人低分子量 CD14 并且用于脓毒症患者的诊断。

附图简述

图 1 是使用 S68-肽多克隆抗体的免疫层析试剂盒的示意图, 其中 (A) 部分是使用金-胶体-标记的 F1031-8-3 作为标记抗体的免疫层析测定法的示意图, (B) 部分是使用生物素和链霉抗生物素作为第二结合物质的免疫层析试剂盒的示意图。

图 2 显示了通过免疫层析试剂盒使用 S68-肽多克隆抗体对标准物质实施的测定法的结果。

图 3 显示了其中仅仅 S68 肽抑制 S68-肽多克隆抗体和低分子量 CD14 蛋白质之间的结合的结果, 其中 (A) 部分显示了在正常个体的血清中没有发现结合的状态, (B) 部分显示了脓毒症患者的血清中使用 S68 肽对结合的抑制。

图 4 是代表使用本发明的低分子量 CD14 的 EIA 试剂盒, 通过 sCD14(1-307)S286C 蛋白质, 得到的标准曲线的图。

图 5 阐明了一种情况, 其中来自正常个体的血清的可溶性 CD14 蛋白不影响通过本发明的低分子量 CD14 的 EIA 试剂盒, 使用 sCD14(1-307)S286C 测量的值。

图 6 是显示通过分别使用低分子量 CD14 的 EIA 试剂盒和商业途径可得到的 CD14-EIA 试剂盒 (IBL-Hamburg), 利用凝胶过滤层析, 分析脓毒症患者的血清中低分子量 CD14 蛋白和高分子量 CD14 蛋白所得到的结果的图。

图 7 是显示通过分别使用低分子量 CD14 的 EIA 试剂盒和商业途径可得到的 CD14-EIA 试剂盒 (IBL-Hamburg), 利用凝胶过滤层析, 分析脓毒症患者的血清中低分子量 CD14 蛋白和高分子量 CD14 蛋白所得到的结果的图, 其中, 图的上面的黑色箭头分别指出用于校准的标记物的位置, 即, 从左到右为 BSA、卵清蛋白、胰凝乳蛋白酶原-A, 和核糖核酸酶-A。

实施本发明的最佳模式

此后, 将更详细地描述本发明。

人血液中的主要可溶性 CD14 分子包括约 55 kDa 和约 49 kDa 的可溶性 CD14 分子(此后, “人” 可被省略并且它们可被描述为高分子量 CD14 分子), 它们在背景技术中描述的 Landmann 等的报导中描述。已经证实那些高分子量 CD14 分子结合 F1025-3-1 抗体(见 WO 01/22085)。

另一方面, 还发现存在不结合 F1025-3-1 抗体的 CD14 片段, 换句话说, 存在不同于高分子量 CD14 的具有低分子量的低分子量 CD14。还表明关于特定疾病的血液中低分子量 CD14 水平的增加。

此后, 将描述作为本发明的测定法分析物的人低分子量 CD14(此后, “人” 可被省略并且其可以被描述为低分子量 CD14)。

作为本发明的测定法的分析物的人低分子量 CD14 具有如下至少三个特征:

- (1) 不结合 F1025-3-1 抗体;
- (2) 特异结合使用一种肽作为抗原制备的抗体, 该肽具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基; 和
- (3) 凝胶过滤层析时显示出 25 到 45 kDa 的分子量范围中的峰。

上述特征(1)容许作为本发明的测定法分析物的人低分子量 CD14 被识别为与上述高分子量 CD14 不同的分子。特征(1)中描述的 F1025-3-1 抗体是使用一种肽作为抗原制备的抗体, 该肽具有 SEQ ID NO: 5 中描述的全长人 CD14 的 316 到 328 位的氨基酸序列。从而, 因为不结合 F1025-3-1 抗体, 可想象 SEQ ID NO: 5 中描述的全长人 CD14 的 316 位和后面的序列不存在于人低分子量 CD14 中。

上面的特征(2)中描述的 SEQ ID NO: 2 中描述的具有 16 个氨基酸的肽相应于 SEQ ID NO: 5 中描述的人 CD14 的 53 到 68 位的 16 个氨基酸残基。在人蛋白质中, 除了人 CD14, 含有 SEQ ID NO: 2 的其他蛋白质迄今仍属未知, 从而该序列可能是对人 CD14 特异的序列。该事实证实作为本发明中测定法的分析物的肽可以是一种人 CD14。

此外作为代替特征(2)的特征(2'), 作为本发明中测定法的分析物的人低分子量 CD14 的特征可以是结合一种抗体, 该抗体结合 SEQ ID

NO: 2 中描述的具有 16 个氨基酸的肽。

从上面的特征(3)，通过凝胶过滤层析，作为本发明中测定法的分析物的人低分子量 CD14 显示出分子量范围为 25 到 45 kDa 的洗脱峰。通常，使用用凝胶过滤层析的分子量分析导致分析结果的变化，该变化依赖于实验条件，其包括用于层析的树脂、柱子的尺寸，和所用标记的分子量。作为本发明中测定法的分析物的人低分子量 CD14 的特征是其可以在凝胶过滤层析中与高分子量 CD14 区分开来并且在较低分子量被洗脱。

提供了具有可以被上面的(1)到(3)解释的特征的人低分子量 CD14，作为本发明中测定法的分析物。下面将描述作为本发明中测定法的分析物的人低分子量 CD14 的其他优选特征。

(4) 对抗-人 CD14 多克隆抗体的特异结合

作为本发明中测定法的分析物的人低分子量 CD14 特异结合使用全长人 CD14 或重组全长人 CD14 作为抗原得到的多克隆抗体。抗人 CD14 多克隆抗体的实例包括：如后面在实施例 3-(2)-(2) 中描述的用人血液中的 CD14 蛋白免疫小鼠得到的具有增强的抗体效价的抗血清；和其中包括的特定抗体。

此外，人低分子量 CD14 的特征是结合特异抗-CD14 单克隆抗体。例如，人低分子量 CD14 的独特特征是其结合识别 SEQ ID NO: 5 中描述的全长人 CD14 的 17 到 26 位的氨基酸序列的抗 CD14 单克隆抗体或者与该抗体竞争的抗-CD14 单克隆抗体。这种抗体的具体实例包括使用人血清中的 CD14 作为抗原制备的下述 F1031-8-3 抗体和使用重组人 CD14 作为抗原制备的下述 F1106-13-3 抗体。

另一方面，人低分子量 CD14 的其他特征如下。人低分子量 CD14 的特征是其可以同时两个位置结合：识别 SEQ ID NO: 5 中描述的全长人 CD14 的 17 到 26 位的氨基酸序列的抗-CD14 单克隆抗体和与该抗体竞争的抗-CD14 单克隆抗体之一；和使用一种肽作为抗原制备的抗体，该肽具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基，如上面的特征(2)中描述的。例如，人低分子量 CD14 的特征是其可以通过三明治方法，使用这两种抗体的组合来测定。

本发明的发明人发现上面描述中揭示的人低分子量 CD14 是人血液中的可溶蛋白并且与正常个体相比更多地存在于脓毒症患者的血液

中,并且可以使用特异抗体直接测定该蛋白。另外,在上述 WO 01/22085 中,分子量为 36 kDa 的一种蛋白被例示为作为测定法的分析物的低分子量 CD14 的一种分子种类。

此外,在本说明书中描述的“可溶性 CD14”指存在于人血浆中并且用于与附着在细胞膜上但是没有在人血浆中发现的“膜-结合 CD14”形成对比的蛋白质。

用于本发明的“使用一种肽作为抗原制备的抗体”指一种抗体,其中用作“抗原”的肽作为表位或表位的一部分提供。此外,其显示出结合“使用一种肽作为抗原制备的抗体”的“抗原”的肽的能力。

“使用一种肽作为抗原制备的抗体”的实例包括代表上述特征的抗体,尽管使用肽作为它们的免疫原,加入载体或载体蛋白或者其他氨基酸残基以提供作为具有免疫原性的“抗原”的各自肽制得这些抗体。

根据本发明的第一个方面,提供了使用一种肽作为抗原制备的抗体,该肽具有选自 SEQ ID: 1 中描述的氨基酸序列的连续的 8 到 30 个氨基酸残基。

使用一种肽作为抗原制备根据本发明的第一个方面的抗体,该肽具有选自 SEQ ID: 1 中描述的氨基酸序列的连续的 8 到 30 个氨基酸残基。

氨基酸残基的数目不被特别限制,只要其是使用一种肽作为抗原制备的抗体,该肽具有选自 SEQ ID: 1 中描述的氨基酸序列的连续的 8 到 30 个氨基酸残基。其是使用一种肽作为抗原制备的抗体,该肽具有优选 10 个或更多连续氨基酸,更优选 12 个或更多连续氨基酸,尤其优选 16 个连续氨基酸。此外,其是使用一种肽作为抗原制备的抗体,该肽优选有 25 个或更少,更优选 20 个或更少的氨基酸。

此外,其可以是 SEQ ID NO: 1 中描述的氨基酸序列中 1 到 68 位的任一区域并且不被具体限制。然而,优选为使用一种肽作为抗原制备的抗体,该肽具有 SEQ ID NO: 1 中描述的氨基酸序列中 53 到 68 位氨基酸位置的连续的 8 到 16 个氨基酸残基。此外,优选使用肽作为抗原制备的抗体,该肽分别具有 SEQ ID NO: 2-4 中描述的氨基酸残基。SEQ ID NO: 5 描述了全长人 CD14 的氨基酸序列。SEQ ID NO: 1 中描述的氨基酸序列相应于 SEQ ID : 5 中描述的氨基酸序列的 1 到 68 位。此外,SEQ ID NO: 2、3 和 4 中描述的氨基酸序列分别相应于 SEQ ID NO: 5 中

描述的氨基酸序列的 53 到 68 位(16 个氨基酸残基)、1 到 17 位(17 个氨基酸残基), 和 14 到 32 位(19 个氨基酸残基)。即, SEQ ID NO: 2 到 4 中描述的每种氨基酸残基是包括在 SEQ ID NO: 1 中描述的氨基酸序列中的连续氨基酸残基。

更优选地, 其是使用一种肽作为抗原制备的抗体, 该肽具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基。

根据本发明的第一个方面的抗体的特征是结合人低分子量 CD14。该特征容许该抗体用于根据本发明的第四个方面的试剂盒或者根据本发明的第五个方面的测定法。

此外, 人低分子量 CD14 的分子量与高分子量 CD14 的不同, 并且前者的氨基酸序列短于后者的。为此, 血液中低分子量 CD14 的构象与高分子量 CD14 的构象不同, 从而它们与抗体的反应性可能相互不同。这样, 可想象根据本发明的第一方面的抗体强烈结合低分子量 CD14。

根据本发明的第二方面, 提供了结合具有 SEQ ID NO: 2 到 4 任一个中描述的氨基酸残基的肽的抗体。

根据本发明的第二方面的抗体可结合肽的任何区域, 只要其结合具有 SEQ ID NO: 2 到 4 任一个中描述的氨基酸残基的肽, 该区域不被特别限制。

优选地, 其是结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体。

根据本发明的第二方面的抗体的特征是结合人低分子量 CD14 抗体。该特征容许该抗体用于根据本发明的第四个方面的试剂盒或者根据本发明的第五个方面的测定法。

此外, 人低分子量 CD14 的分子量与高分子量 CD14 的不同, 并且前者的氨基酸序列短于后者的。为此, 血液中低分子量 CD14 的构象与高分子量 CD14 的构象不同, 从而它们与抗体的反应性可能相互不同。这样, 可想象根据本发明的第二方面的抗体强烈结合低分子量 CD14。

短语“结合具有 SEQ ID NO: 2 到 4 任一个中描述的氨基酸残基的肽”指抗体特异结合作为抗原的肽, 该肽具有每一个 SEQ ID 编号中描述的氨基酸残基并且显示出通常的抗原-抗体反应。例如, 短语“结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽”指抗体特异结合作为抗原的肽, 该肽具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基并且显

示出通常的抗原-抗体反应。抗体-抗原反应的表示可通过凝集方法、三明治方法、固相直接方法或固相结合方法、竞争方法等鉴定。

根据本发明的第二方面的抗体的解离常数(KD)为,当解离常数表达为对肽或低分子量 CD14 的亲合性时,优选小于 10^{-7} M,更优选 10^{-8} M 或更小,更优选 10^{-9} M 或更小。

在根据本发明的第二方面的抗体的制备中,用作抗原的肽是含有 SEQ ID NO: 2 到 4 任一个中描述的氨基酸残基的连续 8 个或更多氨基酸,优选连续 10 个或更多,更优选连续 12 个或更多,尤其优选连续 16 个或更多氨基酸的肽。此外,只要该肽含有 SEQ ID NO: 2 到 4 任一个中描述的氨基酸残基的连续 8 个或更多氨基酸,那么其他氨基酸序列不被限制。该肽的全部氨基酸序列优选来自 SEQ ID NO: 2 到 4 任一个中描述的氨基酸序列。

根据本发明的第二方面的抗体优选为使用一种肽作为抗原制备的抗体,该肽具有 SEQ ID NO: 2 中描述的氨基酸残基的连续 8 个或更多氨基酸。其是使用一种肽作为抗原制备的抗体,该肽具有优选连续 10 个或更多,更优选连续 12 个或更多,尤其优选连续 16 个或更多氨基酸。

根据本发明的第一方面的抗体和根据本发明的第二方面的抗体(此后,它们可被描述为本发明的抗体)可以是多克隆抗体或单克隆抗体。本发明的抗体所来源的动物的种类不被特别限制。根据方便该抗体的制备,优选兔、山羊,等。此外,免疫球蛋白种类可用于类、亚类和同种型的任一种。

制备将用作免疫原的方法的实例包括通常使用肽合成仪(433A 型肽合成仪,Perkin-Elmer,日本)等的方法和遗传重组方法(“新细胞工程化实验方案”,编者:Department of Carcinostatic Research, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Shujunsha)。

例如,通过 Fmoc 方法使用 433A 型肽合成仪可以合成具有 SEQ ID NO: 2 中描述的氨基酸残基的连续 8 个或更多氨基酸的肽。用 TFA 去保护并从树脂切掉后,所得产物通过使用 C18 HPLC 柱(Capcell-pak, Shiseido Co., Ltd.)纯化,从而制备靶标肽。

当抗原是蛋白质时,其可直接用作免疫原。然而,当肽具有 8 到

30 个氨基酸残基或更少残基时，该肽的分子量较小，通常不足以用作免疫原。在该情况下，通过将该肽结合到载体或者使用多抗原肽 (MAP) 方法可以提供该肽作为抗原。然后，制备 MAP 肽并且其提供了使得该抗原具有免疫原性的分子量。

将要结合到上述肽的载体包括载体蛋白和聚合物。所用载体蛋白可以是异种蛋白如牛血清白蛋白、匙孔血蓝蛋白 (KLH)、甲状腺球蛋白、和卵清蛋白。那些载体蛋白利用肽或载体蛋白氨基酸侧链的官能团或者导入马来酰亚胺基、N-羧基琥珀酰亚胺 (NHS) 基，或者醛基以容许该载体结合上面的肽。聚合物的实例包括糖如甘露聚糖和壳聚糖和聚乙烯吡咯烷酮 (PVA)。那些聚合物可通过吸附或者如上述的化学结合结合上面的肽。

本发明的抗体可以通过使用本领域中公知的技术 (见，例如，《免疫学实验方法》，日本免疫学协会编辑，日本免疫学协会出版) 制备。例如，通过下面的方法可制备多克隆抗体。

通过如上述制备的 20 到 1,000 μg 免疫原与佐剂如弗氏完全佐剂、RIBI 佐剂或 ALUM 的混合物可以免疫各种动物的任一种。可以使用的各种动物的实例包括马、绵羊、山羊、猪、兔、大鼠和小鼠。可以使用的免疫方法包括肌内施用、皮内施用、皮下施用、腹膜内施用、和淋巴结施用。可以进行加强免疫从而在第一次施用后每 1-4 周，类似施用与佐剂如弗氏不完全佐剂、RIBI 佐剂或 ALUM 混合的免疫原，或者该免疫原直接被静脉内施用。通过常规采血方法可以从被免疫的动物制备抗血清，该方法例如，包括：从颈动脉、耳静脉、心脏、腿静脉等收集血液，通过离心等方法从血液分离血清。将所得抗血清进行盐析方法，该方法包括加入硫酸铵、硫酸钠等沉淀 γ -球蛋白部分。然后，该部分在适宜的缓冲液中透析后，使用能够特异纯化 γ -球蛋白的蛋白质 A、蛋白质 G 等的亲和基质可以制备抗靶标肽的 IgG 部分的纯化的多克隆抗体。此外，通过选择结合上面的抗原的抗体可以进行特异纯化。

而且，通过下面的方法可以制备单克隆抗体。

通过下面的步骤可以制备本发明的抗体：将被免疫动物的免疫细胞与骨髓瘤细胞融合以制备杂交瘤；从杂交瘤选择产生能够结合上面的肽的抗体的克隆。优选地，免疫原是具有 53 到 68 位的连续 10 个或

更多氨基酸残基的肽。此外，免疫原更优选为具有连续 12 个或更多氨基酸的肽，尤其优选具有连续 16 个氨基酸的肽。

虽然所要免疫的哺乳动物不被特别限制，但是优选考虑与用于细胞融合的骨髓瘤细胞的相容性来选择哺乳动物，并且其优选为小鼠、大鼠、仓鼠，等。可以使用的骨髓瘤细胞是本领域中熟知的各种类型的细胞，包括骨髓瘤细胞 P3、P3U1、SP2/0、NS-1、YB2/0、和 Y3-Ag1、2 和 3。

可通过公知的方法实施免疫。例如，通过将抗原腹膜内、皮下、静脉内施用或者施用到爪垫中实施免疫。抗原可以与佐剂组合施用并且优选多次施用抗原。免疫细胞优选为抗原的最后一次施用后几天，例如，3 天后的脾细胞或者从分离的淋巴结得到的细胞。使用公知方法如 Milstein 等人 (Methods in Enzymol., 卷 73, 第 3 页) 的方法可以融合免疫细胞和骨髓瘤细胞。例如，可提及使用聚乙二醇 (PEG) 作为融合剂的方法、电场诱导的细胞融合方法等。只要其容许融合，那么免疫细胞和骨髓瘤细胞的混合比不被特别限制。然而，优选使得骨髓瘤细胞的量的 1/10 相当于免疫细胞的量。在使用 PEG (平均分子量: 1,000 到 4,000) 的细胞融合方法中，PEG 的浓度不被特别限制。然而，优选在 50% 的浓度实施融合。可加入助剂如二甲亚砜 (DMSO) 作为融合效率的增强剂。通过加入 37°C 保温的 PEG 溶液开始融合并在溶液和细胞反应 1 到 5 分钟后加入培养基结束融合。融合产生的杂交瘤在选择培养基如含有次黄嘌呤、胸腺嘧啶和氨基碟呤 (HAT 培养基) 的培养基孵育 1 到 7 天以将它们与未融合的细胞分离。

所得杂交瘤进一步通过它们所产生的抗体选择。通过公知的有限稀释方法将所选择的杂交瘤转化成单克隆的以建立产生单克隆抗体的杂交瘤。任一种公知的方法可用作检测杂交瘤产生的抗体的活性的方法。这些方法的实例包括 ELISA、凝集反应、放射免疫测定法。通过公知的方法可培养所建立的杂交瘤的实例并且可从培养上清液得到单克隆抗体。此外，将杂交瘤施用于与之有相容性的哺乳动物以允许增殖，并且从腹水得到增殖的杂交瘤。使用公知的纯化方法如盐析、凝胶过滤、离子交换层析、或者亲和层析可以进行抗体的纯化。

此外，如在下面的方面中描述的，本发明的抗体可用于本发明的人低分子量 CD14 的测定试剂盒，可以想象可以制备结合人低分子量

CD14 但是不结合人高分子量 CD14 的抗体。

还可以想象通过使用低分子量 CD14 作为抗原制备抗体并选择不结合高分子量 CD14 的抗体，可以得到结合人低分子量 CD14 但是不结合人高分子量 CD14 的抗体。

在 W0 01/72993 的实施例 16 中描述了制备低分子量 CD14 的方法。此外，使用本发明的抗体，通过从人血清，优选从脓毒症患者的血清特异纯化可以制备低分子量 CD14。

为了选择不结合高分子量 CD14 的抗体，可通过凝集方法、三明治方法、固相直接方法或固相结合方法、竞争方法等评估所得抗体和高分子量 CD14 之间的结合。那些方法将在后面描述。

使用对高分子量 CD14 特异的抗体可以制备高分子量 CD14，该抗体在 W0 01/22085 的实施例 5 中描述。

还可以想象通过如上述的相同方法使用一种肽作为抗原，该肽具有人 CD14 的氨基酸序列的一部分，制备并选择不结合高分子量 CD14 的抗体来制备该抗体。“具有人 CD14 的氨基酸序列的一部分的肽”指，例如，含有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸的序列中连续 8 个或更多氨基酸的每种肽。

根据本发明的第三方面，提供了人低分子量 CD14 的测定试剂盒，其含有结合至少一种人低分子量 CD14 的抗体或者该抗体的片段，并且其直接测定样品中的低分子量 CD14 而不检测人高分子量 CD14。

本发明的试剂盒含有结合至少一种人低分子量 CD14 的抗体或者该抗体的片段并且直接测定样品中的低分子量 CD14。此外，该试剂盒检测作为分析物的人低分子量 CD14 但是不检测人高分子量 CD14，从而人低分子量 CD14 可以直接测定。“抗体的片段”指抗体的 Fab、Fab'、或 F(ab')₂。

本发明的人低分子量 CD14 测定试剂盒不被特别限制，只要其含有结合至少一种人低分子量 CD14 的抗体或者该抗体的片段并且直接测定样品中的低分子量 CD14。优选地，其是含有本发明的抗体或者该抗体的片段作为结合人低分子量 CD14 的抗体或者该抗体的片段的人低分子量 CD14 的测定试剂盒。更优选地，其是包括使用一种肽作为抗原（该肽具有 SEQ ID NO: 2 到 4 任一个中描述的氨基酸残基）制备的抗体，或者该抗体的片段的人低分子量 CD14 的测定试剂盒。此外，优选地，

其是含有结合具有 SEQ ID NO: 2 到 4 任一个中描述的氨基酸残基的肽的抗体或者该抗体的片段, 作为结合人低分子量 CD14 的抗体或者该抗体的片段的人低分子量 CD14 的测定试剂盒。尤其优选地, 其是包括使用一种肽作为抗原 (该肽具有 SEQ ID NO: 2 中描述的氨基酸残基) 制备的抗体或者该抗体的片段, 或者结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体或者该抗体的片段, 作为结合人低分子量 CD14 的抗体或者该抗体的片段的人低分子量 CD14 的测定试剂盒。

而且, 该测定法的原理不被特别限制, 只要该测定法是使用该抗体或者其片段免疫测定人低分子量 CD14 的方法。

作为该测定法的原理的一个实例, 将具体描述人低分子量 CD14 的测定试剂盒 (此后, 其可被描述为三明治免疫测定试剂盒), 其通过使用 “结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体” 作为根据本发明的第二方面的优选实例确定人低分子量 CD14。

一种熟知的方法可用作三明治免疫测定法。该测定法的原理、应用和改良在例如 “超灵敏酶免疫测定法”, Eiji Ishikawa 编著, Center for Academic Publication 日本 (1993)、“诊断试剂的新应用实例和应用/免疫测定的药物开发”, Immunoassay Development Research Society, Keiei-Kyoiku Shuppan、和 “酶免疫测定法” (第三版), Eiji Ishikawa 编著, Igaku-Shoin Ltd. (1987) 中描述。

此外, 本发明的三明治免疫测定法含有结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体。结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体、制备这种抗体的方法等和根据本发明的第一方面的那些抗体和方法相同。该抗体可以是, 但不特别限于, 多克隆抗体或单克隆抗体。

三明治免疫测定法是使用识别通常将要测定的蛋白质上两个不同位点的两种或多种抗体的方法, 其中通过形成抗体-抗原-抗体复合体实施该测定法。

首先, 制备与第一抗体偶联的不可溶载体并将该载体作为固相或反应位置。将样品加到作为固相的不可溶载体然后让它们相互反应。它们反应预定时间段后, 洗涤固相以从其除去未结合的物质。随后, 加入标记的第二抗体。混合物反应预定时间后, 通过洗涤除去不形成复合体的标记抗体, 然后以特定方式基于标记产物定性或定量确定结

合于固相的复合体的量。三明治方法可使用包括如上述的两步的方法(两步方法)和包括同时加入抗原和标记抗体的步骤的方法(一步方法)之一。

在本发明的三明治免疫测定试剂盒中,通过形成“结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体”-人低分子量 CD14-“结合人低分子量 CD14 的第二结合物质”的复合体可以实施该测定法。

本发明的三明治免疫测定试剂盒的形式包括:与结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体结合的不可溶载体和结合标记的低分子量 CD14 的第二结合物质(此后,其可简单地被描述为第二结合物质);或者与第二结合物质结合的不溶载体和结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的标记肽的抗体。

第二结合物质的实例包括结合低分子量 CD14 的抗体。结合低分子量 CD14 的抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体并且不被特别限制。考虑到使用结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸的肽的抗体的三明治免疫测定法的亲和性,优选单克隆抗体。此外,第二结合物质可以是单克隆抗体的片段。抗体的片段为单克隆抗体的 Fab、Fab'、或 F(ab')₂。

结合低分子量 CD14 的抗体(此后,其可以被描述为第二抗体)可以是特异结合低分子量 CD14 的抗体或者结合高分子量 CD14 的抗体并且不被特别限制。优选地,其是结合与本发明抗体的结合位点不同位点的抗体。当结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体被用作本发明的抗体时,第二抗体是结合除了相应于低分子量 CD14 的 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸的区域之外的区域的抗体。更优选地,上述第二物质是:结合人高分子量 CD14 的 1 到 52 位氨基酸残基的任一区域的抗体或者该抗体的片段;或者与结合人高分子量 CD14 的 1 到 52 位氨基酸残基的任一区域的抗体或者该抗体的片段竞争或者与其显示出交叉反应性的抗体。尤其优选地,上述第二物质是:结合人低分子量 CD14 的 17 到 26 位任一氨基酸残基的抗体或者该抗体的片段;或者与结合人低分子量 CD14 的 17 到 26 位任一氨基酸残基的抗体或者该抗体的片段竞争(显示出交叉反应性)的抗体。

可以例如,使用高分子量 CD14、低分子量 CD14、高分子量 CD14 与低分子量 CD14 的混合物、或者重组 CD14 作为抗原,制备多克隆抗

体或单克隆抗体，如使用根据本发明的第一方面的方法中的情况。在下述实施例 3 中将描述使用高分子量 CD14 与低分子量 CD14 的混合物，和重组 CD14 作为抗原制备第二抗体的示例性方法。

此外，优选选择第二抗体从而，在实际实施测定法之前，就如在后面描述的实施例 3 中一样，预先构建三明治方法系统，该系统包括结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽和第二抗体的候选抗体，以证实该测定法的灵敏性。

另外，通过熟知的方法（“Hypersensitive Enzyme Immunoassay”，Eiji Ishikawa 撰写，25-40 页，Center for Academic Publication Japan(1993)）可以制备抗体片段：Fab、Fab'、和 F(ab')₂。

在三明治免疫测定法中，通过作为上面方法的备选方法的竞争方法实施测定法。该方法允许在抗体-抗原-抗体复合体的形成过程中，样品中的抗原与标记抗原或标记抗原类似物竞争。

在本发明的三明治免疫测定法试剂盒中，通过形成“结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体”-标记的人低分子量 CD14 (或者其类似物)-“结合人低分子量 CD14 的第二结合物质”的复合体实施该测定法。

本发明的三明治免疫测定试剂盒的竞争方法的形式包括：与结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体结合的不可溶载体；第二结合物质；被标记的人低分子量 CD14 或被标记的人低分子量 CD14 类似物，或者包括：结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体；与第二结合物质结合的不可溶载体；和被标记的人低分子量 CD14 或被标记的人低分子量 CD14 类似物。

人低分子量 CD14 类似物的实例包括具有人 CD14 的 N-末端 1 到 285 位上的氨基酸的可溶性多肽(此后，描述为 sCD14(1-285))和具有人 CD14 的 N-末端 1 到 307 位上的氨基酸的重组多肽，其中 286 位的丝氨酸被半胱氨酸置换(此后，描述为 sCD14(1-307)S286C)。然而，在该测定系统中，人低分子量 CD14 类似物不被特别限制，只要其是能够与样品中人低分子量 CD14 竞争的物质。在 WO 01/72993 中描述了制备 sCD14(1-285)和 sCD14(1-307)S286C 的方法。

此外，在三明治免疫测定法中，通过利用第二特异结合作为备选

方法可以实施测定法。该备选方法通过形成抗体-抗原-抗体-第二特异结合物质-第二特异结合物质的特异结合配偶体(此后,其可被描述为第二特异结合配偶体)的复合体实施测定。

在本发明的三明治免疫测定试剂盒中,通过形成“结合具有 SEQ ID NO:2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体”-人低分子量 CD14-“结合人低分子量 CD14 的第二结合物质”-第二特异结合物质-第二特异结合配偶体的复合体,或者形成“结合人低分子量 CD14 的第二结合物质”-人低分子量 CD14-“结合具有 SEQ ID NO:2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体”-第二特异结合物质-第二特异结合配偶体的复合体来实施测定。

利用本发明的三明治免疫测定试剂盒的第二特异结合的形式包括:用结合具有 SEQ ID NO:2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的第二特异结合物质标记的抗体;结合标记的低分子量 CD14 的第二特异结合物质、与第二特异结合配偶体结合的不可溶载体,或者包括:结合具有 SEQ ID NO:2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的标记抗体;结合用第二特异结合物质标记的低分子量 CD14 的第二结合物质;和与第二特异结合配偶体结合的不可溶载体。

第二特异结合物质和第二特异结合配偶体的组合的实例包括:抗原及其抗体、配体及其受体、含有某些糖和凝集素的物质、和生物素和抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白。

此外,三明治免疫测定法的实例包括:利用针对抗体的抗体,即,抗-免疫球蛋白抗体,形成抗体-抗原-抗体-抗免疫球蛋白抗体复合体的测定法;和利用抗-免疫球蛋白抗体和第二特异结合形成抗-免疫球蛋白抗体-抗体-抗原-抗体-第二特异结合物质-第二特异结合配偶体的测定法。

本发明的三明治免疫测定试剂盒通过以下进行测定:形成“结合具有 SEQ ID NO:2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体”-人低分子量 CD14-“结合人低分子量 CD14 的第二结合物质”-抗免疫球蛋白抗体的复合体;形成“结合具有 SEQ ID NO:2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体”-人低分子量 CD14-“结合人低分子量 CD14 的第二结合物质”-抗免疫球蛋白抗体的复合体;形成抗免疫球蛋白抗体-“结合具有 SEQ ID NO:2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体”-人低分子

量 CD14-“结合人低分子量 CD14 的第二结合物质”-第二特异结合物质-第二特异结合配偶体的复合体；形成抗免疫球蛋白抗体-“结合人低分子量 CD14 的第二结合物质”-人低分子量 CD14-“结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体”-第二特异结合物质-第二特异结合配偶体的复合体等等。

任何三明治免疫测定都位于本发明测定法的范围内，即使利用第二特异结合形成固相、标记物质等。只要其通过形成“结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体”-人低分子量 CD14-“结合人低分子量 CD14 的第二结合物质”复合体实施测定法。

换句话说，只要本发明的三明治免疫测定试剂盒包括结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体，那么本发明的三明治免疫测定试剂盒就在本发明的试剂盒范围内。

用于本发明的三明治免疫测定试剂盒中的不可溶载体可以是珠、乳胶颗粒、磁性颗粒、板、管、膜等。珠、板、或管的材料包括聚苯乙烯、尼龙、玻璃、硅酮橡胶、不锈钢，和塑料。该膜可以是纤维素、纤维素衍生物、硝基纤维素、多孔合成聚合物、玻璃纤维、布、非纺织织品、滤纸，等。珠子、乳胶颗粒、磁性颗粒等可以以球形使用。球形在节约存储空间方面是有利的。板或管可以以孔的形式使用。孔形式是有利的，因为其将被商业的自动化测量仪器、平板读数仪等接受。膜可用于后面描述的免疫层析方法或流通方法。

结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体、第二结合物质、第二特异结合物质或其配偶体、或者抗免疫球蛋白抗体可以通过热吸附方法、化学结合方法等结合到不可溶的载体。

此外，优选将没有上面物质的不可溶载体的非吸附表面实施封闭处理，该封闭处理使用不影响测定系统的物质，因为该处理将赋予该测定系统增强的特异性或灵敏性。不影响该测定系统的物质包括：蛋白质如 BSA 和酪蛋白；和如吐温 20 和 NP-40 的表面活性物质。

可用于本发明的三明治免疫测定试剂盒的标记物包括：酶，如过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -D-半乳糖苷酶、氧化酶、和尿激酶；化学发光物质如吖啶或其衍生物和水母发光蛋白或其修饰产物；荧光物质如 FITC；染料、金胶体、有色乳胶，和同位素。

例如，对于使用过氧化物酶作为酶的情况，3, 3', 5, 5'-四联苯胺或

1,2-苯二胺可以作为生色底物的实例。对于使用碱性磷酸酶的情况,4-硝基苯基磷酸盐可以作为生色底物的实例。对于使用 β -D-半乳糖苷酶的情况,2-硝基苯基 β -D-半乳糖苷可以作为生色底物的实例。

通过两步戊二醛方法、高碘酸方法、马来酰亚胺方法、二硫化吡啶方法等可以实施结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体、第二结合物质、第二特异结合物质或其配偶体,或者抗-免疫球蛋白抗体的酶-标记。

除了酶,在标记中可以使用一种熟知的技术如热吸附方法或化学结合方法。

优选酶标记,因为如果使用上面示例的生色底物,那么可以使用常规比色系统测定酶标记,还因为其灵敏性相对高。此外,优选用于简单试剂盒如使用免疫层析方法或流通方法的试剂盒的试剂盒的标记,因为可以在视觉上观察到染料、金胶体或者有色乳胶。

本发明的三明治免疫测定试剂盒的特征在于通过三明治免疫测定法实施测定并且包括结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体。三明治免疫测定法可使用如上述的熟知技术。除了上面的具体描述,基于三明治免疫测定的任何试剂盒都在本发明的三明治免疫测定试剂盒的范围内并且只要该试剂盒包括结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体,则该试剂盒不被特别限制。换句话说,试剂盒含有结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体和该三明治免疫测定所需要的试剂就足够了。此外,只要基于该测定法的原理,含量不抑制测定结果,则该含量不被限制。

例如,样品的缓冲剂或稀释剂、标记抗体等、当酶用于标记抗体时适于该酶的生色底物(见上面的描述)、封闭剂、中止试剂,或者洗涤溶液可以作为任选的组成成分的实例。此外,标准物质也可作为任选组成成分的实例。标准物质包括人低分子量 CD14 和人低分子量 CD14 类似物。

此外,利用基于三明治免疫测定法作为测定原理的免疫层析方法或流通方法也在本发明的三明治免疫测定试剂盒的范围内。

在免疫层析方法中,所提供的作为样品中的受试物质的抗原沿着试验条移动到固定有抗体的不可溶载体上,而该抗原与被安排在试验条中的标记抗体反应从而能够移动,然后在不可溶载体上形成抗体-抗

原-抗体复合物。通常，通过将样品滴在试验条上的单个步骤可以测定抗原。

例如，在 JP 01-063865A、WO 88/08534 和 WO 90/09592 中公开了免疫层析方法的设备。此外，在 WO 89/03993 和 WO 99/27364 中公开了具有具不同展开速度的流体通道的免疫层析方法的设备，并且例如，可以应用该设备从而通过容许被固定的抗体和抗原之间的反应形成复合体后标记抗体可以反应。

下面将描述使用本发明的三明治免疫测定的免疫层析方法。

例如，一种设备(例如，试剂盒)是试验条，其上面提供了样品加入部分、试剂部分、检测部分和吸收部分从而加到样品-加入部分上的液体样品被容许以此顺序沿着这些部分移动。标记的第二结合物质浸渗在试剂部分中和与结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体结合的不可溶载体被排列在检测部分是充分的。

加在样品加入部分的样品吸收试剂部分的被标记的第二结合物质。人低分子量 CD14 与被标记的第二结合物质反应形成复合体并移动到检测部分。在检测部分上，该复合体与具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽结合的抗原反应，导致在不可溶载体上形成“结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体”-人低分子量 CD14-“结合人低分子量 CD14 的第二结合物质”的复合体。不参与反应的样品中的任何物质和试剂都移动到吸收部分。可以确定，尤其可通过视觉确定检测部分上形成的复合体的标记。

多孔载体等可以用作试验条。多孔载体可以是，例如，硝酸纤维素、纤维素、纤维素衍生物、尼龙、尼龙纤维、玻璃纤维，或者多孔合成聚合物。

部分试验条可直接用作样品-加入部分或者试剂部分。备选地，根据样品的量或者试剂的剂量，可以使用例如，纤维素滤纸、玻璃纤维、布、非纺织织品、多孔合成聚合物，等等。

纤维素、纤维素衍生物、硝酸纤维素、多孔合成聚合物、玻璃纤维、布、非纺织织品、滤纸，等等可以用作如上述的检测部分。

可吸收水的材料可用作吸收部分。可吸收水的材料的实例包括：吸收剂聚合物如海绵、纤维素滤纸，和滤纸。

上面的是免疫层析方法的一个实例。可以加入证实反应进展的参

照部分，或者可以为试验条体提供载体或者将其用外部掩蔽物掩蔽。然而，本发明的试剂盒不限于它们。

此外，如在关于三明治免疫测定法的解释中描述的，免疫层析方法的试剂盒也在本发明的三明治免疫测定试剂盒的范围内，通过所述试剂盒，在不可溶载体上形成“结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体”-人低分子量 CD14-“结合人低分子量 CD14 的第二结合物质”的复合体，并通过利用抗免疫球蛋白抗体和第二特异结合形成复合体实施测定。

流通方法是通过一种方法，通过该方法，所提供的作为试验物质的抗原与样品中的溶液一起在所提供的作为不可溶载体的膜上形成抗体-抗原-抗体复合体。在此时，不能固定在膜上的物质通常通过垂直地从膜的前面穿过到达膜的背面而被除去。

WO 88/01603 公开了基于多个步骤的方法的设备，通过该设备，样品、试剂和清洁剂被滴到膜上。

JP 06-273419A 公开了被改良为一步方法的方法，其中形成多层膜并且其上提供了试剂部分以便通过仅仅滴一次样品实施测定。

此后，将描述使用流通方法的根据本发明的三明治免疫测定试剂盒的一个实例。

例如，设备(例如，试剂盒)为试剂盒，在试剂盒上面，样品加入部分、试剂部分、检测部分，和吸收部分一个叠在另一个上面，从而加到样品加入部分上面的液体样品可以以此顺序沿着那些部分移动。只要标记的第二结合物质浸渗在试剂部分中并且与结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体结合的不可溶载体被排列在检测部分便足够。

加在样品加入部分上的样品垂直地从膜的顶部到膜的背面通过样品加入部分(此后，样品移动也是这样的)，然后吸收试剂部分的第二结合物质。人低分子量 CD14 与被标记的第二结合物质反应形成复合物并迁移到检测部分。在检测部分上，该复合物与结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗原反应，导致在不可溶载体上形成“结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体”-人低分子量 CD14-“结合人低分子量 CD14 的第二结合物质”的复合体。不参与反应的样品中的任何物质和试剂都移动到吸收部分。可以确

定, 尤其可通过视觉确定检测部分上形成的复合体的标记。如果设计设备使得检测部分可以与样品加入部分和试剂部分或者吸收部分分离, 那么可以以简单的方式通过视觉观察标记。此外, 如果每个样品加入部分和试剂部分由半透明材料制成, 那么可以通过视觉从样品加入部分观察标记, 或者如果如 JP 06-0273419A 中的情形, 吸收部分被排列在检测部分上面(样品加入部分), 那么可通过视觉从较低侧观察标记。

可以应用与免疫层析方法的成员相同的成员并且每个成员可以形成容许样品中的溶液移动的膜。

上面是流通方法的实例之一。可以加入证实反应进展的参比部分, 或者可以为每个成员提供载体或者用外部掩蔽物掩蔽。然而, 本发明的三明治免疫测定试剂盒不限于它们。

此外, 如在三明治免疫测定法的解释中描述的, 除了在不可溶载体上形成“结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体”-人低分子量 CD14-“结合人低分子量 CD14 的第二结合物质”的复合体, 通过利用抗免疫球蛋白抗体和第二特异结合形成复合体实施测定法的流通方法试剂盒也在本发明的三明治免疫测定试剂盒的范围内。

此外, 本发明的三明治免疫测定试剂盒可用于通过电化学测量来自标记物的信号的基于 MEDIA 的方法(JP 05-264552A)的测定法和使用微芯片的免疫测定方法的测定法(“Bioscience and Industry”, 卷 61, 449-454 页, 2003)。只要使用那些原理的测定试剂盒的特征是它们的测定法基于三明治免疫测定法并且包括结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体, 那么这些测定试剂盒就在本发明的三明治免疫测定试剂盒的范围内。

本发明的三明治免疫测定试剂盒的特征是包括结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体并且能够特异测定低分子量 CD14。用于本发明的三明治免疫测定试剂盒的样品优选为水性样品。该样品的尤其优选的实例包括血液、血液组分如血清或血浆、尿或其他体液、细胞培养上清液, 和柱洗脱液, 它们用于测定它们中的低分子量 C14。然而, 也可以从除了人血液组分的样品, 如人尿或其他体液、血液组分、尿、或者除人之外种类的其他体液形式、细胞培养

上清液,和柱洗脱液,测定类似于低分子量 CD14 的蛋白质、多肽等以及低分子量 CD14。只要是类似于低分子量 CD14 的上面的多肽等的任何测定试剂盒,每种都包括结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体,那么这些试剂盒也在本发明的三明治免疫测定试剂盒的范围内。

此外,在上面的说明中,可以用“结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体”的片段 Fab、Fab'、或 F(ab')₂ 代替“结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体”。

在上面的描述中,使用“结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体”的具体实例已经被描述为根据本发明的第二方面的抗体的优选实例。然而,也可以使用根据本发明的第一方面的抗体、除了“结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体”之外的根据本发明的第二方面的抗体、或者那些抗体的片段 Fab、Fab'、或 F(ab')₂。

优选为使用根据本发明的第二方面的抗体的三明治免疫测定试剂盒。更优选的是使用“结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体”的三明治免疫测定试剂盒。

此外,该测定法的原理除了三明治免疫测定法之外还包括凝集方法、固相结合方法,和溶液反应方法。根据那些方法,可以构建各自的试剂盒从而每种试剂盒含有结合至少一种人低分子量 CD14 的抗体或者该抗体的片段,优选本发明的抗体或该抗体的片段。

在凝集方法中,抗体结合到微粒表面并且抗原的存在导致微粒凝集,从而可以参考微粒的凝集程度,以特定方法定性或定量测定抗原。

本发明的凝集免疫测定试剂盒通过形成“本发明的抗体”-人低分子量 CD14 并导致其凝集来实施该测定法。

本发明的凝集免疫测定试剂盒的形式包括微粒,本发明的抗体结合到该微粒的表面。

所用微粒可以是通常使用的微粒,包括乳胶、血红细胞(例如,绵羊血红细胞)、明胶、微珠、碳微粒,等。

固相结合方法是通过在固相上形成抗体和抗原复合体实施测定法的一种方法。含有抗原的样品被吸附在不可溶载体(即,固相,同样应用于后面)中。然后,加入标记抗体并让混合物反应以根据标记产物以

特异方式定性或定量地确定结合在固相上的复合体的量。

此外，作为竞争方法，抗原类似物被吸附在不可溶载体上以容许标记抗原与样品中的抗原竞争反应，从而确定结合到抗原类似物的标记抗体的量。此外，作为竞争方法的备选方法，抗体被吸附在不可溶载体中并且使用样品中抗原的反应与标记的抗原类似物竞争以测定结合到抗体的标记抗原类似物的量。

在本发明的固相结合免疫测定试剂盒中，通过形成“本发明的抗体”-人低分子量 CD14 复合体、“本发明的抗体”-标记的人低分子量 CD14 (或者其类似物) 复合体、或者“本发明的标记抗体”-人低分子量 CD14 (或者其类似物) 复合体实施测定。

本发明的固相结合免疫测定试剂盒的形式实例：包括本发明的抗体、不可溶载体，和用于将样品吸附在不可溶载体上的试剂；或

包括本发明的抗体和与标记的人低分子量 CD14 (或者其类似物) 结合的不可溶载体；或者

包括与本发明的标记抗体结合的不可溶载体和与标记的人低分子量 CD14 (或者其类似物) 结合的不可溶载体。

不可溶载体、人低分子量 CD14 类似物，和标记和吸附剂与三明治免疫测定试剂盒的解释中描述的相同。

溶液-反应方法可以是通过：在液相中进行抗原和标记抗体之间的反应；然后通过使用抗体的凝集方法或者通过物理和化学方法从抗原和抗体分离抗原-抗体复合物，以特异方式定性或定量确定低分子量 CD14 的方法。

溶液-反应免疫测定试剂盒的形式实例实施测定法使得在液相中形成“本发明的标记抗体”-人低分子量 CD14 复合体，然后从液相中除去未结合的标记抗体。

本发明的溶液-反应免疫测定试剂盒的形式实例包括本发明的标记抗体。

此外，在上面的说明中，可以用“本发明抗体的片段 Fab、Fab'、或 F(ab')₂”代替本发明的“抗体”。

上面已经基于它们的测定原理描述了本发明的测定试剂盒的实例。然而，本发明的试剂盒不限于那些原理。只要测定试剂盒含有结合至少一种人低分子量 CD14 或者该抗原的片段的抗体，那么该测定试

试剂盒就在本发明的测定试剂盒的范围内。对于免疫测定法的原理，可以得到本领域中熟知的技术。可以参考上面提到的“超灵敏酶免疫测定法”，Eiji Ishikawa 编者，Center for Academic Publications 日本(1993)、“免疫测定法的新应用实例和诊断试剂/药物开发的应用”，Immunoassay Development Research Society, Keiei-Kyoiku Shuppan, 和“酶免疫测定法(第三版)，Eiji Ishikawa 编著，Igaku Shoin Ltd.(1987)。

通过本发明的试剂盒可特异测定的低分子量CD14的水平在脓毒症患者中增加。因而，将提供低分子量CD14的测定作为脓毒症的诊断指数，并且本发明的试剂盒可用于脓毒症的诊断。

根据本发明的第四方面，提供了低分子量CD14的测定方法，使用该测定法，用结合至少一种人低分子量CD14的抗体直接进行样品中人低分子量CD14的测定，以检测人低分子量CD14而不检测人高分子量CD14。

本发明的测定方法是检测人低分子量CD14而不检测人高分子量CD14的测定方法并且使用结合至少一种人低分子量CD14的抗体以直接确定样品中人低分子量CD14。优选地，它是使用本发明的抗体测定低分子量CD14的方法。更优选地，它是使用一种肽作为抗原制备的抗体(该肽具有SEQ ID NO: 2到4任一个中描述的氨基酸残基)，来测定低分子量CD14的方法。此外，它是使用结合具有SEQ ID NO: 2到4任一个中描述的氨基酸残基的肽测定低分子量CD14的优选方法。它是使用一种肽作为抗原制备的抗体，该肽具有SEQ ID NO: 2中描述的氨基酸残基，或者使用结合具有SEQ ID NO: 2中描述的16个氨基酸序列的肽的抗体，测定低分子量CD14的尤其优选的方法。此外，在上面的说明中，可以使用“抗体片段，Fab、Fab’、或F(ab’)₂”代替“抗体”。

此外，优选地，它是低分子量CD14测定的方法，使用该方法，通过三明治免疫测定确定人低分子量CD14。

本发明的抗体可用作固定化抗体、标记抗体，等。此外，还包括使用第二特异结合和抗-免疫球蛋白抗体的测定方法。在该情况中，本发明的第一方面的抗体可用作游离抗体、结合第二特异结合物质或者第二特异结合配偶体等的抗体。

本发明的测定方法可以是三明治免疫测定的非竞争性或竞争性方

法,并且可以包括使用免疫层析方法或者流通方法测量。

此外,本发明的测定方法的原理不限于三明治免疫测定法,其他实例包括凝集方法、固相结合方法,和溶液反应方法。

细节在本发明的第三方面中描述。

根据本发明的第五方面,提供了脓毒症的诊断方法,通过该方法直接测定人低分子量 CD14。

脓毒症的诊断方法直接测定低分子量 CD14。

直接测定低分子量 CD14 的方法在本发明的第四方面中描述。此外,使用本发明的第三方面中描述的试剂盒可以实施诊断。

如在下面的实施例 3、10 和 11 中描述的,来自每个正常个体和各种患者的血液中的低分子量 CD14 的测定证实脓毒症患者特异显示出高水平的低分子量 CD14。该事实表明通过使用上面的试剂盒得到的结果可用作脓毒症的诊断中的指数。例如,测定患者血液中低分子量 CD14 水平并将其与正常个体的标准水平比较,该标准水平是例如通过这些个体的测量值平均,或者使用正常个体的水平范围所得。例如,正常个体的平均值+2SD 或 3SD 被用作取舍点水平并且,当低分子量 CD14 的水平高于这一水平时,其被定义为正指数。此外,通过将每个个体的低分子量 CD14 的测量水平与正常个体和脓毒症患者的低分子量 CD14 水平或者通过提前将那些水平标准化所得标准水平比较,也可以提供诊断指数。例如,正常个体的低分子量 CD14 水平被定义为 0 到 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 并且脓毒症患者的水平被定义为 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 或以上,然后通过与测量水平比较以提供阴性、假阳性、或阳性指数。

根据本发明的第六个方面,提供了具有 SEQ ID NO: 2 到 4 中任一个中描述的氨基酸残基的肽。本发明的肽由 SEQ ID NO: 2 到 4 中任一个中描述的氨基酸残基。本发明的肽用于制备本发明的抗体的抗原。

根据本发明的第七方面,提供了制备本发明抗体的方法,其中抗原为具有选自 SEQ ID NO. 1 中描述的氨基酸序列的连续 8 到 30 个氨基酸残基的肽。用作抗原的肽的优选实例包括本发明的第六方面的肽和具有 SEQ ID NO: 2 中描述的氨基酸残基的连续 8 个或更多氨基酸的肽。

“具有 SEQ ID NO: 2 中描述的氨基酸的连续 8 个或更多和 16 个或更少的肽”指含有下面的 (1) 到 (9) 任一个的肽,其是 SEQ ID NO: 2 中描述

序列后（上游和/或下游侧）的序列并且优选由共 10 个或更多、12 个或更多，或者 16 个或更多氨基酸组成。

- 1) Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro (SEQ ID NO: 6)
- 2) Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg (SEQ ID NO: 7)
- 3) Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln (SEQ ID NO: 8)
- 4) Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr (SEQ ID NO: 9)
- 5) Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala (SEQ ID NO: 10)
- 6) Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala Asp (SEQ ID NO: 11)
- 7) Asp Pro Arg Gln Tyr Ala Asp Thr (SEQ ID NO: 12)
- 8) Pro Arg Gln Tyr Ala Asp Thr Val (SEQ ID NO: 13)
- 9) Arg Gln Tyr Ala Asp Thr Val Lys (SEQ ID NO: 14)

本发明方法的细节如在本发明的抗体方面部分中描述的。

通过本发明的抗体方面部分中描述的方法可以制备本发明的抗体。

实施例

此后，将通过实施例更具体地描述本发明。然而，这些实施例只是代表性的并且本发明将决不被理解为被这些实施例所限制。此外，用于下面描述中的符号是基于本领域惯例的符号。

在下面的实施例中使用用作正常个体的血清的从生产商 PromedDx 和 Sera Care Life Science 购买的血清和脓毒症患者的血清。

实施例 1 使用合成肽作为抗原制备多克隆抗体

1- (1) 作为抗原的肽的制备<1>

为了将具有 SEQ ID NO: 2 中描述的序列（相应于 SEQ ID NO: 5 中描述的 53 到 68 位的序列）的肽（此后，描述为 S68 肽）通过 SH 基团结合到载体蛋白的 N 末端，通过将半胱氨酸插入到 N-末端合成肽。即，使用肽合成仪 ABI433A (Applied)，氨基酸柱根据氨基酸序列排列，并将半胱氨酸的氨基酸柱置于 N-末端上，然后实施自动合成。通过常规方法将合成的肽从树脂切下，然后将该肽用乙醚沉淀，回收，并再次溶于蒸馏水，然后冰冻干燥。所得粗肽被溶解后，使用 C18 反相 HPLC (CAPCELL-PAK, Shiseido Corp.)，将肽用 5-70% 乙腈浓度的线性梯度洗脱，然后收集含有靶标肽的部分。将所收集的部分冰冻干燥，得到 2 到 3 mg 纯化的肽。

1-(2) 使用合成肽制备肽载体抗原<1>

将 1-(1) 中制备的两种肽的每一种都溶于蒸馏水至 10 mg/mL 并将溶液与等量的 10 mg/mL 马来酰亚胺活化的匙孔血蓝蛋白 (Imject 马来酰亚胺活化的海水养殖匙孔血蓝蛋白 (KLH) (PIERCE) 混合. 混合物在室温反应 2 小时后, 通过用生理盐水平衡的 NAP-10 柱 (Amersham Bioscience) 对反应混合物脱盐得到 1 mg S68-肽载体抗原 (此后, 描述为 S68 肽-KLH). 通过将所用 KLH 的量与液体的量相除得到在下面实施例中描述的蛋白质的浓度.

1-(3) 作为抗原的肽的制备<2>

通过和 1-(1) 中相同的方法使用肽合成仪 (PSSH-8, Shimadzu Corporation) 分别合成表 1 中给出的两种肽序列并将它们纯化. 所得肽的每一种的量为约 5 mg. 另外, 表中的“编号”代表下面解释的肽的名称, “位置”代表在 SEQ ID NO: 5 中描述的氨基酸序列中发现的肽的位置.

表 1

编号	位置	氨基酸序列	SEQ ID NO
P001	1-17	Thr Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu Asp Phe Arg Cys Val Cys	3
P002	14-32	Arg Cys Val Cys Asn Phe Ser Glu Pro Gln Pro Asp Trp Ser Glu Ala Phe Gln Cys	4

1-(4) 使用合成肽制备肽载体抗原<2>

将 1-(3) 中制备的每种肽溶于含有 0.1M EDTA 的 PBS (pH 7.2) 中, 并且如 1-(2) 的情形, 得到了 3 mg 每种肽载体抗原, 其中 KLH 结合到各自的肽.

1-(5) 使用合成肽制备多克隆抗体<1>

为了制备针对 1-(2) 中制备的 S68 肽-KLH 的多克隆抗体, 用 S68 肽-KLH 免疫兔. 即, 将 100 μ g 每种 S68 肽-KLH 用 500 μ L 生理盐水稀释并将溶液与 500 μ L 弗氏完全佐剂 (DIFCO) 等量混合, 然后将混合物皮下施用于 2.1 到 2.2 kg 重的新西兰白色雌兔 (Kitayama Labes) 的背部. 2 周后, 将 100 μ g 每种 S68 肽-KLH 用 500 μ L 生理盐水稀释并

将溶液与 500 μ L 弗氏不完全佐剂 (DIFCO) 等量混合, 然后将混合物皮下施用于背部。再过 2 周后, 将 100 μ g S68 肽-KLH 用 1mL 生理盐水稀释并将该溶液施用于耳静脉。

施用完成 1 周后, 从耳静脉收集血液并通过常规方法从血液分离抗血清, 并纯化抗体。首先, 向抗血清中加入硫酸铵直到最终饱和浓度为 33%。4℃下搅拌混合物 1 小时后, 离心所分离的沉淀。然后, 将沉淀溶解于 76mM 磷酸缓冲液(此后, 描述为 PBS (pH 6.4)) 并将溶液过夜透析。过滤透析物后, 将滤液应用于蛋白质 A 柱 (Prosep-A, Millipore)。然后, 用 0.1M 甘氨酸盐酸缓冲液 (pH 3.0) 洗脱结合 IgG 部分得到纯化的抗体。用 PBS (pH 6.4) 透析后, 从 280 nm 波长(吸收系数: 0.533 mg/ml) 的吸收度计算蛋白质浓度。此后, 所得抗体将被描述为 S68 肽多克隆抗体。

1-(6) 使用合成肽作为抗原制备多克隆抗体<2>

使用 1-(4) 中制备的肽载体抗原的每一种, 如 1-(3) 中的情况, 实施免疫和抗血清的纯化以制备肽多克隆抗体的每一种 (P001 和 P002 多克隆抗体)。此外, 实施免疫使得肽载体抗原 (0.5 mg/只兔) 在 2 个月内被施用 5 次。收集全血后, 得到每种抗血清 (抗血清 P001 和 P002)。

1-(7) 特异纯化的多克隆抗体的制备

为了从 S68-肽多克隆抗体仅纯化针对 S68 肽的抗体, 通过下面的方法实施特异纯化。首先, 为了将插入半胱氨酸的 S68 肽(此后, 描述为 C-S68 肽)通过 SH 基结合到载体, 将 200 μ g C-S68 肽与 1 mL SufoLink Coupling Gel (PIERCE) 混合并根据其使用手册反应。反应完成后, 封闭剩余的活性基团并制备 S68 肽-结合亲和柱。其次, 应用 1-(3) 中描述的 7.92 mg 纯化的 IgG 部分, 然后将柱用磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) (Dulbecco, 此后, 描述为 D-PBS (pH 7.4)) 洗涤, 然后用 0.1M 甘氨酸盐酸缓冲液 (pH 3.0) 洗脱抗-S68-肽抗体。洗脱后, 将 pH 重新调节到中性, 然后用 PBS 进行透析, 之后从 280 nm 的吸收度计算蛋白质浓度(吸收系数: 0.533 mg/mL)。结果, 得到 0.52mg 抗-S68-肽抗体(此后, 描述为 S68 抗体)。

实施例 2 使用合成肽作为抗原制备单克隆抗体

将 20 μ g 实施例 1-(2) 中制备的 S68 肽-KLH 溶解于 100 μ L 生理盐水中并与等量弗氏完全佐剂 (DIFCO) 混合, 之后将 100 μ L 混合物施用

于 8 周龄的雌性 Wister 大鼠的每个后爪垫。2 周后，手术切除髂淋巴结并实施细胞融合。根据 Tamie Ando 和 Takeshi Chiba: “单克隆抗体实验操作介绍”，83 页，1991 (Kodansha) 进行细胞融合。换句话说，使用细胞渗滤器 (Falcon) 从淋巴结分离淋巴细胞并将淋巴细胞与骨髓瘤细胞 (Sp2/0-Ag14) 以 5: 1 的比例混合，然后使用聚乙二醇进行细胞融合。将融合的细胞悬浮于 HAT 培养基中并选择杂交瘤，接着筛选产生靶抗体的杂交瘤。

通过 ELISA 方法实施筛选，其中 sCD14 (1-307) S286C 被直接固定在平板上。即，将用 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 稀释到 $1\mu\text{g/mL}$ 的 $50\mu\text{L}$ sCD14 (1-307) S286C 加到免疫板 (Maxisorb, NUNC) 的每孔中并在 37°C 静置 1 小时。之后，将平板用离子交换水洗涤 5 次，然后向每孔中加入 $100\mu\text{L}$ 含有 0.1% BSA 的 PBS (pH 6.4)，接着让平板在室温静置 1 小时以实施封闭。然后，将从所选杂交瘤取样的培养上清液加到每孔并容许在 37°C 反应 1 小时。此后，用含有 0.05% 吐温 20 的生理盐水洗涤平板 3 次。接着，向每孔加入通过用含有 10% 兔血清的 PBS 将过氧化物酶标记的抗-大鼠免疫球蛋白抗体 (DAKO) 稀释 1000 倍得到的 $50\mu\text{L}$ 溶液。 37°C 下反应 1 小时后，将平板以和上面相同的方式洗涤 5 次并向每孔加入四甲基联苯胺溶液 (TMB, BioFix)。室温下反应 10 分钟后，用 0.5 M 硫酸溶液中止反应并使用平板分光光度计 (NJ-2100, 日本 Intermed) 测量 450 nm 的吸收。结果，筛选出含有能够产生结合 sCD14 (1-307) S286C 的抗体的杂交瘤的孔。

接着，从所选择的孔，通过根据 Tamie Ando 和 Takeshi Chiba: “单克隆抗体实验操作介绍”，83 页，1991 (Kodansha) 的有限稀释方法实施克隆。10 天后，同样，使用与 sCD14 (1-307) S286C 的反应性作为指数实施筛选并选择了 6 种杂交瘤。将所选杂交瘤培养于 10% FCS/RPMI 1640 培养基 (Sigma) 中然后培养于杂交瘤-SFM 培养基 (Invitrogen) 中以产生抗体。使用蛋白质 G 柱 (Prosep-G 柱, Millipore) 纯化抗体。使用大鼠分型试剂盒 (ZYMED) 确定所纯化的 F1146-17-2 抗体的亚型是大鼠 IgG2b. κ 。

此外，用 WO 01/72993 的实施例 9 中描述的方法制备 sCD14 (1-307) S286C。

实施例 3 人低分子量 CD14 的测定系统研究

使用实施例 1 和 2 中描述的抗体, 用三明治 EIA 方法研究了人低分子量 CD14 的测定系统。

3-(1) 重组人 CD14 的制备

首先, 为了制备将用作三明治 ELISA 方法中的第二抗体的针对 sCD14 (1-285) 的单克隆抗体, 在大肠杆菌中制备了作为免疫原的 sCD14 (1-285)。为了在大肠杆菌中表达 sCD14 (1-285), 通过下面的方法构建了表达质粒 pTrp1659。

首先, 合成了寡聚体 8, linkS (5'-agc tta gga att t-3') (SEQ ID NO:15) 和寡聚体 8, linkA (5'-cta gaa att cct a-3') (SEQ ID NO:16)。

那些寡聚体以等量混合并在 99℃ 加热 1 分钟, 然后将混合逐渐冷却到室温使其退火。此外, 通过 T4 多核苷酸激酶将寡聚体的 5' 末端磷酸化以制备接头。

接着, 合成有义引物 (5'-aca tct aga tga cca cgc cag aac ct-3') (SEQ ID NO:17) 和反义引物 (5'-ttt gga tcc tta cta gag atc gag cac tct-3') (SEQ ID NO:18) 并使用 Pyrobest DNA 聚合酶和 WO 01/72933 的实施例 8 中描述的质粒 pM1659 作为模板实施 PCR。

反应溶液在 90℃ 被加热 2 分钟后, 重复 30 次 98℃ 10 秒, 55℃ 30 秒, 和 72℃ 1 分钟的循环。

将所得约 900 bp 的扩增产物用 XbaI 和 BamHI 双消化以收集 DNA 片段。JP 06-025289 A 的实施例 10 中描述的载体 pM710 被 HindIII 和 BamHI 双消化, 然后置于琼脂糖凝胶电泳并收集。经过已经磷酸化的接头与上述 PCR-扩增的 DNA 片段/XbaI+BamHI 消化的片段, 和载体/HindIII+BamHI 片段的三次连接后, 将产物转化到大肠杆菌感受态细胞 (JM109 (TOYOBO)) 以得到含有靶质粒的克隆。通过常规方法制备质粒 DNA。

随后, 使用电穿孔方法制备用于产生 sCD14 (1-285) 的 JE7924 转化菌株。

首先从甘油原种恢复大肠杆菌 JE7924 (J. Bacteriol 173, p. 4799, (1991)) 并将其在 LB 培养基中 37℃ 过夜孵育。此外, 将该细菌接种到 50 ml 新鲜 LB 培养基中并连续孵育直到 600 nm 的吸光度达到 0.5 到 0.6, 然后直接冰-冷却培养瓶 30 分钟。接着, 收集大肠杆菌细胞并用冰-冷却的无菌蒸馏水洗涤 2 次并用冰-冷却的 10% 甘油溶液洗

涂 1 次,然后将细胞悬浮在 100 μ L 冰-冷却的 10%甘油溶液中。将悬浮物分散到 50 μ L 等分试样的两管中并快速在液氮中冷冻以制备感受态细胞(JE7924),将其保存在-80℃待用。

接着,通过电穿孔设备——BIO-RAD 有限公司的 Gene Pulser——用 30 ng 转化 50 μ L JE7924 感受态细胞。此外,此时的设置为 2.5 kV 的电压和 200 欧姆的电阻,和 25 μ F 的电容。此后,将所得产物在含有 50 μ L/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂板中过夜孵育以得到用 pTrp1659 转化的克隆。该克隆在 LB 培养基中 37℃ 下过夜孵育并接种到新鲜培养基中,然后被孵育额外的 5 小时。培养悬浮物的 600 nm OD 达到 2 到 3,加入 3 β -吡啶丙烯酸(Sigma Co., Ltd.)至终浓度 100 μ g/mL 并将混合物在 37℃ 孵育 4 小时,导致 sCD14(1-285)的诱导表达。接着,收集大肠杆菌并使用 Bug Buster 蛋白质提取试剂(Novagen, Co., Ltd.)制备包涵体。之后,将包涵体溶于 SDS-PAGE 缓冲液并实施 SDS-PAGE 以通过蛋白质印迹通过抗-CD14 抗体鉴定 sCD14(1-285)的表达。

类似地,通过在 1L LB 培养基中接种 JE7924 转化株制备将用作免疫原的 sCD14(1-285)。首先,离心培养液。收集大肠杆菌细胞后,将细菌细胞用 D-PBS 洗涤并将 50 mL Bug Buster 蛋白质提取试剂(Novagen, Co., Ltd.)加到所收集的细菌细胞中。悬浮细菌细胞并让其在室温静置 30 分钟。裂解后,将细菌细胞进行 10 分钟的超声处理(US-3, Iuchi Seieido)并在 4℃ 以 10000 $\times$ g 离心 20 分钟以除去上清液。同样,对细胞进行额外的超声处理并将所得沉淀悬浮在 50 mL Bug Buster 中。将 1mL 10mg/mL 溶菌酶(Seikagaku 公司)加入悬浮物,并将全部的轻微搅拌并在室温静置 10 分钟。随后,将 200 mL 1/10 体积分高浓度 Bug Buster 加入混合物中并将全部进行搅拌,然后进行类似离心以除去上清液。通过加入 200 mL 1/10 浓度的 Bug Buster 悬浮所得沉淀并将悬浮物类似地离心,然后重复这种操作几次。将 100 mL D-PBS 加入最终得到的沉淀,得到包含体。

为了制备 sCD14(1-285),将包含体溶于含有 1% Triton-X100 的 TE 缓冲液(pH 8.0, Nippon Gene)并将溶液进行冻融 3 次,然后通过离心收集沉淀。将沉淀再次溶于含有 1% Triton-X100 的 TE 缓冲液(pH 8.0, Nippon Gene),将溶液冰-冷却并进行 250 μ A 间隔 10 秒的 12 分钟超声处理并离心,然后收集沉淀。将沉淀溶于含有 1% Triton-X100

和 0.2M NaOH 的 TE 缓冲液(pH 8.0, Nippon Gene), 然后在 37℃ 处理 10 分钟, 离心, 并再溶解 3 次, 然后收集沉淀。将所得沉淀溶解于含有 6 M 盐酸胍的水性溶液中以制备纯化的 sCD14(1-285)。通过 Bradford 的蛋白质测定法使用标准制剂计算 sCD14(1-285) 的浓度。

3-(2) 抗-CD14 单克隆抗体的制备

[1] F1106-13-3 抗体的制备

使用来自上述大肠杆菌的 sCD14(1-285) 作为将要施用的抗原, 制备单克隆抗体。首先, 将 20 μg 纯化的 sCD14(1-285) 与弗氏完全佐剂(DIFCO) 以等量混合, 然后将 200 μl 混合物腹腔内施用于 6 周龄雌性 ddy 小鼠。2 周后, 将 20 μg 纯化的 sCD14(1-285) 与弗氏不完全佐剂(DIFCO) 以等量混合, 然后腹腔内使用 200 μL 混合物。细胞融合前 3 天将 50 μL 抗原腹腔内施用于小鼠。3 天后, 无菌切除脾脏。从脾脏分离淋巴细胞并将其与骨髓瘤细胞(P3x63-Ag. 8.U.1) 以 10: 1 的比例混合并根据 Tamie Ando 和 Takeshi Chiba: “单克隆抗体实验操作介绍”, 83 页, 1991(Kodansha) 描述的方法用聚乙二醇进行细胞融合。使用 HAT 培养基选择杂交瘤后, 通过 ELISA 方法对产生结合 sCD14(1-285) 的抗体的杂交瘤进行筛选。

首先, 将 sCD14(1-285) 用 PBS(pH 6.4) 稀释到 0.4 μg/mL 并将 50 μL 所得溶液加到免疫板(Maxisorb, NUNC) 的每孔中并在 4℃ 过夜反应。之后, 将平板用离子交换水洗涤 5 次, 然后向每孔中加入含有 0.5%BSA 的 100 μL PBS(pH 6.4) 进行封闭。然后, 将取样的培养上清液加到每孔中并容许在 37℃ 反应 1 小时。此后, 用含有 0.05%吐温 20 的生理盐水洗涤平板 3 次。随后, 向每孔加入通过用含有 10%兔血清的 PBS 将过氧化物酶标记的抗-小鼠免疫球蛋白抗体(DAKO) 稀释 1000 倍得到的 50 μL 溶液。37℃ 下反应 1 小时后, 将平板以和上面相同的方式洗涤 5 次并向每孔加入四甲基联苯胺溶液(TMB, BioFix)。室温下反应 10 分钟后, 用 0.5 M 硫酸溶液中止反应并使用平板分光光度计(NJ-2100, 日本 Intermed) 测量 450 nm 的吸光度。根据结果, 选择了含有能够产生结合 sCD14(1-285) 的抗体的杂交瘤的孔。接着, 从所选择的孔, 通过根据 Tamie Ando 和 Takeshi Chiba: “单克隆抗体实验操作介绍”, 83 页, 1991(Kodansha) 的有限稀释方法进行克隆。10 天后, 同样, 使用与 sCD14(1-285) 的反应性作为指数实施筛选。结果,

选择了 12 种产生抗-sCD14 (1-285) 单克隆抗体的杂交瘤。

将所选杂交瘤培养于 10% FCS/RPMI 1640 培养基 (Sigma) 中然后培养于杂交瘤-SFM 培养基 (Invitrogen) 中以产生抗体。使用蛋白质 A 柱 (Prosep-A 柱, Millipore) 纯化抗体。

使用 IsoStrip 小鼠单克隆抗体同种型试剂盒 (Roche) 确定 F1106-13-3 抗体 (其是具有尤其高的灵敏性的抗体) 的亚型为 IgG2b. κ 。

[2] F1031-8-3 抗体的制备

使用 W0 01/22085 中描述的方法制备 F1031-8-3 抗体。简述如下, 将来自人血液的 20 μ g CD14 蛋白溶解于生理盐水中, 并将溶液与弗氏完全佐剂 (DIFCO) 以等量混合。然后, 每种最初的腹内施用 1 周后和最初施用 2 周后, 如 W0 01/22085 的实施例 5 中的情况, 通过关于与重组人 CD14 蛋白的反应性的 ELISA 方法证实血清中抗体效价的增加的水平。将 100 μ g 抗原作为最终施用腹内施用于小鼠, 3 天后从小鼠手术切除脾脏。从脾脏分离淋巴细胞并将其与骨髓瘤细胞 (P3x63-Ag. 8. U. 1) 以 10: 1 的比例混合用聚乙二醇进行细胞融合。使用 HAT 培养基选择杂交瘤, 一周后, 通过上述 ELISA 方法实施产生抗体的杂交瘤的筛选。通过有限稀释方法克隆已经与固定的可溶性 CD14 蛋白质反应的杂交瘤。10 天后, 类似地, 进行筛选得到抗-CD14 单克隆抗体。使用 IsoStrip 小鼠单克隆抗体同种型试剂盒 (Roche) 确定 F1031-8-3 抗体的亚型为 IgG2b. κ , 该抗体为典型抗体。

3-(3) 人低分子量 CD14 测定系统的研究

为了制备能够特异检测人低分子量 CD14 的系统, 使用实施例 1、2 和 3-(2) 中描述的抗体制备三明治 EIA 系统。

[1] 过氧化物酶-标记的抗体的制备

根据 Nakane 等 (J. histochem. Cytochemn., 22 卷, 1084 页, 1974) 的方法制备过氧化物酶-标记的抗体。即, 将 4 mg 过氧化物酶 (Toyobo) 溶于蒸馏水并通过加入 100 mM 高碘酸使溶液在 25℃ 反应 20 分钟。反应完成后, 将 1.5% 乙二醇加入反应产物并将全部在 25℃ 反应 10 分钟, 然后对 1 mM 乙酸缓冲液 (pH 4.4) 透析。每种纯化的 F1031-8-3 抗体和 F1106-13-3 抗体用 10 mM 碳酸氢盐缓冲液 (pH 9.5) 透析, 然后将通过加入 70 μ L 0.2 M 碳酸氢盐缓冲液 (pH 9.5) / 4 mg 活化的 4 mg

过氧化物酶与抗原以等量混合以容许在 25℃反应 2 小时。接着, 加入 4 mg/mL 硼氢化钠并让反应在 4℃再继续 2 小时。反应液用 PBS 透析, 产生过氧化物酶-标记的 F1031-8-3 抗体(此后, 其可被描述为 F1031-8-3-HRP)和过氧化物酶-标记的 F1106-13-3 抗体(此后, 其可被描述为 F1106-13-3-HRP)。从所用的抗体的量和标记抗体溶液的体积计算抗体的浓度。

[2] 三明治 EIA 系统的制备<1>

使用所制备的 S68 抗体作为实施例 1 中的固定化抗体和实施例 3-(2) [1]和[2]中制备的抗体作为标记抗体制备两步三明治 EIA 系统。即, 将 S68 抗体用 D-PBS (pH 7.4) 稀释到 10 μg/mL 然后将 50 μL 所得溶液加到免疫板 (Maxisorb, NUNC) 的每孔中并在 4℃过夜反应。此后, 将平板用离子交换水洗涤 5 次, 然后向每孔中加入含有 0.1% StabilGuard (SurModics, Inc) 和 0.1%吐温 10 的 D-PBS 100 μL 以实现封闭。使用含有 1%正常个体血清(使用 3C10 除去可溶性 CD14 的血清, 此后, 描述为 CD14-吸收血清)和 0.1%BSA 的 PBS (pH 7.4) 作为稀释剂, 通过稀释血清 20 倍分别制备正常个体的人血清和脓毒症患者的人血清的稀释样品。以每孔 50 μL 的浓度加入稀释样品并在 37℃反应 2 小时。

反应完成后, 将样品用含有 0.05%吐温 20 的生理盐水洗涤 3 次, 并将含有 5%大鼠血清、1%小鼠血清和 0.1%吐温 20, 用 76 mM PBS (pH 8.0) 稀释到 0.6 μg/mL 的 50 μL F1031-8-3-HRP 或者 F1106-13-3-HRP 加到每个孔中。37℃下反应 2 小时后, 将平板以和上面相同的方式洗涤 5 次并向每孔加入四甲基联苯胺溶液 (TMB, BioFix)。室温下反应 20 分钟后, 用 0.5 M 硫酸溶液中止反应并使用平板分光光度计 (NJ-2100, 日本 Intermed) 测量 450 nm 的吸光度。结果, 如表 2 中所示, 能够测定血液中的可溶蛋白, 即, 本发明中定义的低分子量 CD14, 在使用来自 S68 肽的抗体的系统中, 该蛋白不能在正常个体中增加但是在脓毒症患者中增加。

[3] 三明治 EIA 系统的制备<2>

1) 使用所制备的 F1146-17-2 抗体作为实施例 2 中的固定化抗体和实施例 3-(2) 和 [2] 中制备的抗体作为标记抗体制备两步三明治 EIA 系统。将 F1146-17-2 抗体用 PBS (pH 6.4) 稀释到 120 μg/mL 并将 50 μL

所得溶液加到免疫板(Maxisorb, NUNC)的每孔中并在 56℃反应 30 分钟。此后,将平板用离子交换水洗涤 5 次,然后向每孔中加入含有 0.1% StabilGuard(SurModics, Inc)和 0.1%吐温 20(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)的 PBS 100 μ L 以实现封闭。使用含有 1% BSA 的 PBS(pH 6.4)作为稀释剂,通过将血清稀释 10 倍分别制备人正常个体的血清和人脓毒症患者的血清的稀释样品。将稀释的样品以 50 μ L/孔的浓度加入并在 25℃反应 2 小时。

反应完成后,将平板用含有 0.05%吐温 20 的生理盐水洗涤 3 次,并将含有 5%大鼠血清、1%小鼠血清和 0.1%吐温 20,用 76 mM PBS(pH 8.0)稀释到 0.5 μ g/mL 的 50 μ L 过氧化物酶标记的 F1031-8-3 抗体加到每个孔中。25℃下反应 2 小时后,将平板以和上面相同的方式洗涤 5 次并向每孔加入四甲基联苯胺溶液(TMB, BioFix)。室温下反应 20 分钟后,用 0.5 M 硫酸溶液终止反应并使用平板分光光度计(NJ-2100, 日本 Intermed)测量 450 nm 的吸光度。结果,类似于 S68 抗体,在如表 2 中所示的 S68-肽特异的单克隆抗体的情况中,能够测定低分子量 CD14,其几乎不能在正常个体中发现但是在脓毒症患者中以高水平被发现。即,该结果证实结合 S68 肽的抗体可以制备三明治系统,而不管该抗体是多克隆还是单克隆的。

2)制备了两步三明治 EIA 系统,其中所用的固定化抗体是实施例 1-(6)中使用合成肽作为抗原制备的多克隆抗体。通过和 3-[2]相同的方法使用人类正常个体和人类脓毒症患者的血清作为样品实施测定法,但是使用 P001 多克隆抗体、P002 多克隆抗体或 P012 多克隆抗体代替 S68 抗体。结果,如表 2 所示,类似于 S68 抗体,在使用合成肽作为抗原的多克隆抗体情况中,能够测定低分子量 CD14,其几乎不能在正常个体中发现但是在脓毒症患者中以高水平被发现。该结果证实甚至在使用一种肽作为抗原(肽具有选自人高分子量 CD14 的 1 到 285 位氨基酸序列的 8 到 16 个氨基酸残基)的系统中,也可以实施三明治系统。

在表 2 中,“++”代表与稀释液自身的吸光度相比在 450nm 处 4 倍或更高的吸光度,“+”代表 2 倍或更高的吸光度,“-”代表等于稀释液的吸光度的吸光度。

表 2

抗体的组合		测量水平	
固定化侧	标记侧	脓毒症患者	正常个体
S68 抗体	F1031-8-3 抗体	++	-
S68 抗体	F1106-13-3 抗体	++	-
F1146-17-2 抗体	F1031-8-3 抗体	+	-
P001 多克隆抗体	F1031-8-3 抗体	+	-
P002 多克隆抗体	F1031-8-3 抗体	+	-

(4) 三明治 EIA 系统的制备<3>

使用 F-1031-8-3 抗体作为固定化抗体和 S68 抗体作为标记的抗体制备了三步三明治 EIA 系统。通过如下生物素化 S68 抗体实施该 EIA 系统。即，将 50 μ L 通过溶于 DMSO 得到的 300 μ g/mL 的 D-生物素化- ϵ -氨基己酸 N-羧基琥珀酰亚胺酯 (Roche) 加到通过用含有 0.15M NaCl 的 0.05 M 磷酸盐缓冲液 (pH 8.0) 置换制备的 0.93 mg/mL 的 S68 抗体 0.5 mL 中混合并且混合物在室温搅拌下反应 2 小时。反应完成后，通过脱盐柱 (NAP-5, Amersham Bioscience) 用 PBS (pH 7.4) 置换反应产物。基于 280 nm 处的吸光度使用 1.4 的吸收系数计算所制备的生物素化 S68 抗体 (此后，其被描述为 Bio-S68 抗体) 的浓度。

三明治 EIA 系统将 F1031-8-3 抗体固定在免疫板 (NUNC) 上并封闭。除去封闭溶液。然后，将溶于 0.1% BSA/PBS 中的 500 ng/mL sCD14 (1-307) s268c (此后，其可被描述为标准制剂) 和没有加入标准制剂的溶液分别加入孔中作为阴性对照。37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时后洗涤板，并随后向板中加入通过用含有 2% 大鼠血清、1% 小鼠血清、1% 兔血清和 0.1% 吐温 20 的 PBS (pH 7.4) 稀释制备的 1 μ g/mL 生物素化 S68 抗体 50 μ L 并在 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。反应完成后，洗涤板并加入稀释 10,000 倍的过氧化物酶-标记的链霉抗生物素蛋白 (其被描述为 SA-HRP, Invitrogen)。反应 1 小时后洗涤板。用 TMB 溶液 (BioFix) 显色后，通过终止液终止反应，并使用平板分光光度计 E-Max (Molecular Device, Co., Ltd.) 测量 450 nm 处的吸光度。

如在表 3 中所示的，在该系统中，可以制备三明治 EIA 系统。换句话说，本发明人证实即使结合 S68 的抗体被用作固定化抗体或者用

作游离抗体或标记抗体,也可以制备三明治测定系统。在表3中,“++”代表与0到500 ng/mL的标准制剂的吸光度差异是0.5 Abs或更多,“+”代表0.1或更多,“-”代表小于0.1。

[5] 三明治 EIA 系统的制备<4>

制备了一步EIA系统使得固定化和被标记抗体和[2]的系统的固定化和被标记抗体相同,并同时加入样品和被标记抗体。即,将25 μ L的0 ng/mL和500 ng/mL标准制剂加到S68-抗体-固定化板中,然后加入通过用含有2%大鼠血清、1%小鼠血清、1%兔血清和0.1%吐温20的PBS(pH 7.4)稀释制备的1 μ g/mL F1031-8-3-HRP 25 μ L。37℃下反应1小时。反应完成后,洗涤板并通过TMB溶液(BioFix)显色。然后通过终止液终止反应,使用平板分光光度计E-Max(Molecular Device, Co., Ltd.)测量450 nm处的吸光度。如表3中所示,还在本系统中制备了三明治EIA系统。即,本发明人证实使用结合S68肽的抗体的三明治测定系统可以实施测定而与反应顺序无关。

[6] 三明治 EIA 系统的制备<5>

固定化和被标记抗体和[2]的系统的固定化和被标记抗体相同,并且样品和被标记抗体同时反应。然后,制备了与固定化抗体反应的两步EIA系统。即,将25 μ L的0 ng/mL和500 ng/mL标准制剂与25 μ L通过用含有2%大鼠血清、1%小鼠血清、1%兔血清和0.1%吐温20的PBS(pH 7.4)制备的2 μ g/mL F1031-8-3-HRP混合。反应完成后,将反应液加到S68-抗体-固定化板,并将全部在37℃反应1小时。洗涤板并通过TMB溶液(BioFix)显色,然后通过终止液终止反应,接着使用平板分光光度计E-Max(Molecular Device, Co., Ltd.)测量450 nm处的吸光度。如表3中所示,还在本系统中制备了三明治EIA系统。即,本发明人证实使用结合S68肽的抗体的三明治测定系统可以实施测定而与反应顺序无关。

[7] 三明治 EIA 系统的制备<6>

使用生物素-链霉抗生物素蛋白的特异结合制备了三明治EIA系统。

1) 在固定化侧使用链霉抗生物素蛋白的测定系统

将用PBS(pH 7.4)稀释到10 μ g/mL的链霉抗生物素蛋白(PIERCE)以50 μ L等分试样分散到免疫板(NUNC)并通过将其在4℃过夜处理固

定化。封闭后，将免疫板中的液体弃去并加入通过用含有 2%大鼠血清、1%小鼠血清、1%兔血清和 0.1%吐温 20 的 PBS (pH 7.4) 制备的 $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的生物素化 S68 抗体和溶于 0.1% BSA/PBS 的 0 ng/mL 和 500 ng/mL 标准制剂各 $25\text{ }\mu\text{L}$ 。37℃反应 1 小时后，洗涤板并随后加入稀释到 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的 F1031-8-3-HRP $50\text{ }\mu\text{L}$ 中，接着在 37℃反应 1 小时。反应完成后，洗涤板并通过 TMB 溶液 (BioFix) 显色，然后通过终止液终止反应，使用平板分光光度计 E-Max (Molecular Device, Co., Ltd.) 测量 450 nm 处的吸光度。即使标准制剂、生物素化 S68 抗体，和过氧化物酶-标记的 F1031-8-3 抗体同时加入，也类似地试验本系统。如表 3 中所示，三明治 EIA 系统能够在两种系统中制备。

2) 使用过氧化物酶-标记的链霉抗生物素蛋白的测定系统

通过 [4] 中所示方法制备了本发明系统。此外，研究了两步方法，其中同时加入标准制剂和根据 [4] 制备的生物素化 F1031-8-3 抗体 (其可被描述为 Bio-F1031-8-3) 后在 37℃实施反应 1 小时并且洗涤后加入稀释约 10,000 倍的过氧化物酶-标记的链霉抗生物素蛋白 (Invitrogen)。反应完成后，洗涤板并通过 TMB 溶液 (BioFix) 显色，然后通过终止液终止反应，使用平板分光光度计 E-Max (Molecular Device, Co., Ltd.) 测量 450 nm 处的吸光度。如表 3 中所示，在本系统中，也能够制备三明治 EIA 系统。即，本发明人证实即使使用另一特异结合如生物素和链霉抗生物素蛋白的结合制备固相化或标记的物质，也可以得到测定，只要低分子量 CD14 被夹在结合 S68 肽的抗体和结合分析物的抗体之间。另外，“Str”代表链霉抗生物素蛋白，“Bio”代表生物素化。

表 3

实施例	板	步骤			反应性
		1	2	3	
[4]	F1031-8-3 抗体	标准制剂	Bio-S68 抗体	SA- HRP	+
[5]	S68 抗体	标准制剂 F1031-8-3-HRP	-	-	++
[6]	S68 抗体	标准制剂 F1031-8-3-HRP	S68 抗体 板	-	++
[7] (1)	Str	Bio-S68 抗体 标准制剂	F1031-8-3 -HRP	-	+
[7] (1)	Str	Bio-S68 抗体 标准制剂 F1031-8-3-HRP	-	-	++
[7] (2)	S68 抗体	标准制剂 Bio-F1031-8-3	SA-HRP	-	++

实施例 4 免疫层析测定系统的制备

4-(1) 使用金-胶体标记的抗体的免疫层析方法<1>

制备了易于在实验室或床边使用的测定系统。该测定系统的略图在图 1(A)中显示。首先,通过将 1 mL 金胶体(微粒直径 40 nm, B. B. International)与 9 μ g F1106-13-3 抗体混合制备金胶体-标记的 F1106-13-3 抗体。然后,制备了偶联垫。即,将金胶体-标记的 F1106-13-3 抗体用偶联-应用缓冲液稀释从而 520 nm 处的吸光度将为约 1.5,然后将 1 mL 所得溶液应用于 10 $\times$ 150 nm 的 33-玻璃条上,接着减压下过夜干燥。此时,每次试验中试剂中金胶体-标记的 F1106-13-3 抗体的抗体效价为约 50 单位(1 单位等于 1 μ L OD₅₂₀=1.0 的金胶体-标记的 F1106-13-3 抗体)。如下制备抗体-固定化膜。将 S68 抗体用 PBS (pH7.4)稀释到 1 mg/mL 并使用 BioDot 有限公司生产的喷墨包被机将溶液以 0.75 μ L/cm 线性应用于硝酸纤维素膜 (FF85/100, Schleicher & Schuell)上。此时,同时应用对照线(抗小鼠多克隆抗体, DAKO)。干燥后,将膜浸入含有 0.5%酪蛋白的封闭液中 30 分钟,

然后除去液体的过量部分，接着再次干燥。然后，使用每种所备的物质配制免疫层析试剂。即，将偶联垫、固定化膜上-吸附垫（#900 滤纸，Schleicher & Schuell），或者样品-滴入垫（33-Glass 玻璃纤维滤器，Schleicher & Schuell）附着在 PB020 塑料-支持片（BioDot）上然后通过 BioDot 有限公司生产的条带切割机以 5 mm 宽度切割。所切割的带用装装载盒（NIPPN Technocluster, Inc.）放置并作为免疫层析试剂提供。

使用所制备的试剂如下面描述的实施测定。提供用 1%BSA-PBS 稀释 10^6 倍，浓度为 10,000 到 1 ng/mL 的标准制剂作为样品。然后，将 100 μ L 样品滴到试剂中以确定混合物在室温静置 20 分钟后线的存在或不存在。判断标准如下：

(++)：在该水平产生浓线从而该线可被清楚地判断为阳性；

(+)：在该水平显色可被判断为线，尽管颜色显现黯淡；

(±)：在该水平隐约观察到看起来像显色，但是难以识别为线；

和

(-)：在该水平没有观察到显色。

结果，如图 2 和表 4 中所示，在 10 ng/mL 或更高的样品浓度得到“+”或以上的灵敏性。因此，该结果证实通过免疫层析系统可以简单而快速地实施测定。

4-(2) 使用金胶体标记的抗体的免疫层析方法<2>

4-(1) 中制备的免疫测定系统固定化抗原和金胶体-标记的抗体反向排列实施测定法。通过和 4-(1) 相同的方法能够制备 S68 抗体的金胶体标记物和免疫层析系统。结果，如表 4 中所示，在 100 ng/mL 或更高的样品浓度得到“+”或以上的灵敏性。

表 4

金胶体标记的	固定化	样品浓度 (ng/mL)					
		10000	1000	100	10	1	0
F1106-13-3	S68	++	++	+	+	±	-
S68	F1106-13-3	++	+	+	±	±	-

4-(3) 使用链霉抗生物素蛋白-生物素系统制备免疫层析方法

此外, 使用链霉抗生物素蛋白-生物素系统制备了免疫层析测定法。该测定法的略图在图 1 (B) 中显示。首先, 根据实施例 3-2 [4], 将 F1031-8-3 抗体生物素化。然后, 将 1 mL 金胶体 (微粒直径 40 nm, B. B. International) 与 10 μ g 链霉抗生物素混合制备金胶体-标记的链霉抗生物素。将金胶体-标记的链霉抗生物素用偶联-应用缓冲液稀释从而 520 nm 处的吸光度将为约 1.5, 然后将 1 mL 所得溶液应用于 10 $\times$ 150 nm 的 33-Glass 条上, 接着减压下过夜干燥。此时, 每次试验中试剂中金胶体-标记的链霉抗生物素的抗体效价为约 50 单位 (1 单位等于 1 μ L OD₅₂₀=1.0 的金胶体-标记的链霉抗生物素)。如下制备抗体-固定化膜。将 S68 抗体用 PBS (pH7.4) 稀释到 1 mg/mL 并使用 BioDot 有限公司生产的喷墨包被机将溶液以 0.75 μ L/cm 线性应用于硝酸纤维素膜 (FF85/100, Schleicher & Schuell) 上。此时, 同时应用对照线 (抗小鼠多克隆抗体, DAKO)。干燥后, 将膜浸入含有 0.5% 酪蛋白的封闭液中 30 分钟, 然后除去液体的过量部分, 接着再次干燥。然后, 使用每种所备的物质配制免疫层析试剂。

即, 将偶联垫、固定化膜上-吸附垫 (#900 滤纸, Schleicher & Schuell), 或者样品-滴入垫 (33-Glass 玻璃纤维滤器, Schleicher & Schuell) 附着在 PB020 塑料-支持片 (BioDot) 上然后通过 BioDot 有限公司生产的条带切割机以 5 mm 宽度切割。所切割的带用装载盒 (NIPPN Technocluster, Inc.) 放置并作为免疫层析试剂提供。使用所制备的试剂如下面描述的实施测定。提供用 1%BSA-PBS 稀释 10⁶ 倍, 浓度为 10,000 到 1 ng/mL 的标准制剂作为样品。然后, 将 100 μ L 样品滴到含有 0.1 μ g 生物素化 F1031-8-3 的 100 μ L 试剂中, 并将全部混合。

然后,将 100 μ L 混合物滴到装载盒的样品滴入垫以确定混合物在室温静置 20 分钟后线的存在或不存在。因此,在本系统中,就像(1)中的情形,在 100 ng/mL 或以上的浓度下也得到“+”或以上的灵敏性。

实施例 5 流通测定系统的制备

根据 JP 06-273419A 制备流通测定系统。即,将 1g 分散染料(Red Violet, Kayaron, Co., Ltd.)悬浮在 10 mL 蒸馏水中,用蒸馏水洗涤后重悬在 5 mL 蒸馏水中。将用生理盐水稀释的 0.2 mL 的 0.5 mg/mL F1031-8-3 抗体加到 0.2 mL 分散染料中并将全部的在 45℃温育 30 分钟。产物在冰上冷却后,进行离心分离。将所得沉淀重悬在含有 0.5% BSA 和 10%乳糖的 PBS (pH 7.4) 中以制备分散染料-标记的 F1031-8-3 抗体。接着,将分散染料-标记的 F1031-8-3 抗体以 0.1 mL 等分试样分配并浸入切成直径为 14 mm 的滤纸(No. 63, Advantec Toyo)中,然后冰冻-干燥以制备粘附可溶试剂的有孔体。

如下实施膜上的固定化。首先,将用生理盐水稀释的 2 mg/mL S68 抗体应用于孔径 5 微米的硝酸纤维素膜(Advantec Toyo)上并在 37℃干燥。然后,使用含有 1%BSA 的 PBS (pH 7.4) 进行封闭以制备抗体-固定化膜。将所制备的物质以下面的顺序装配在装载盒中。通过按顺序装配粘附可溶试剂的有孔体、抗体-固定化膜、聚丙烯-层叠的滤纸(No. 28, Advantec Toyo),和厚为 0.5 mm、由聚碳酸酯制造的透明板,制备测定试剂。将 0.5 mL 样品加入测定试剂启动测定,样品被完全吸收后通过肉眼从背侧观测颜色进行判断。

实施例 6 S68 抗体的特异性

为了证实实施例 1 中制备的 S68 抗体的特异性,本发明人研究了通过肽通过和实施例 3-(3)的相同的测定法是否发生封闭。即,将 S68 肽(53 到 68 位的氨基酸序列)、通过和实施例 1 相同的方法制备的合成肽(53 到 58 位的氨基酸序列、57 到 62 位的氨基酸序列、59 到 64 位的氨基酸序列)、或者阴性对照肽(Cys Glu Gly Asn Gly Asn Asn Phe Glu Ser Arg Glu Ala Cys)稀释到 0、0.1、1 和 10 μ g/mL 并将 25 μ L 每种稀释液加到从脓毒症患者所得血清和正常个体的血清的稀释 50 倍的溶液各 25 μ L 以通过与 S68 抗体混合启动竞争性反应。此后,确定未被任何肽抑制的结合 S68 抗体的低分子量 CD14 的水平。结果,如图 3 所示,在显示出低水平的正常个体血清和显示出高水平的脓毒症

患者的血清中，S68抗体和血液中低分子量蛋白之间的结合在S68肽的情况下被抑制但是在其他部分肽(每种含有6个氨基酸)和阴性对照肽的情况下不被抑制。上面的结果证实在血液中被S68抗体检测到的蛋白质被S68抗体特异识别。此外，该结果还证实被该抗体识别的序列需要至少7个氨基酸的长度，因为通过相应于S68肽的部分肽的三种合成肽(氨基酸数目：6)不能达到抑制。

实施例7 所制备抗体的反应速度常数

使用Biacore 3000(Biacore)分别分析了实施例1中制备的S68抗体和实施例2中制备的F1146-17-2抗体的特异性和反应速度常数。首先，使用马来酰亚胺化BSA(Imject Maleimide活化的BSA, PIERCE)通过和实施例1中描述的相同的方法制备将要被固定的S68肽-BSA。接着，使用胺-偶联试剂盒(Biacore)将S68肽-BSA固定在传感头(Biacore)上。实施测定从而HBS-EP(Biacore)被用作流动缓冲液并将F1146-17-2抗体的稀释系列(50、100、150、200，和300 nM)注射到流槽中。使用Biaevaluation软件版本3.0(Biacore)，通过从S68肽-BSA的流槽测量数据减去对照-槽数据进行数据分析。作为分析解离常数(KD)的结果，F1146-17-2抗体显示出高为 4.8×10^{-9} M的亲合性。另外，类似测量的特异纯化的兔S68肽多克隆抗体的KD值为 2.2×10^{-10} M。

实施例8 人低分子量CD14的测定试剂盒

8-(1) 三明治EIA系统的测定试剂盒的典型形式

下面将描述可溶蛋白质试剂盒的典型形式，该试剂盒使用在实施例3-(3)中在脓毒症患者样品中显示出高水平的人低分子量CD14并且在正常个体的样品中显示出低水平的人低分子量CD14固定化和被标记抗体的组合。

<1>固定化抗体：板上固定S68抗体

<2>被标记抗体：过氧化物酶-标记的F1031-8-3抗体

<3>底物溶液(四甲基联苯胺溶液)

其他附属物

平板系统的配置实施例

<4>板-洗涤液(0.9% NaCl, 0.05%吐温20溶液)

<5> 样品-稀释液(含有0.1%BSA的PBS溶液)

<6> 反应-终止液(0.5 M H_2SO_4 溶液)

<7> 标准制剂(CD14(1-307)S286C)

使用上面的测定试剂盒进行测定的测量仪器<实施例>

<8> 平板分光光度计 (例如, E-Max (Molecular Device, Co., Ltd.))

8-(2)到(11) 三明治 EIA 系统的测定试剂盒的配置实例

除了 8-(1), 还在表 7 中显示了三明治 EIA 系统的测定试剂盒的实例。<1>代表固定在板上的结合物质。<2>代表被标记的结合物质。作为参比实例的<3>到<7>的组成要素和测量仪器<8>与 8-(1)相同。<9>代表结合第二特异结合物质的抗体。

表 7

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

8-(12) 三明治 EIA 系统的测定试剂盒的标准曲线

使用(1)的测定试剂盒, 通过和实施例 3-(3) [2]相同的方法实施测定。即, 用 D-PBS (pH 7.4)将 S68 抗体稀释到 10 $\mu\text{g/mL}$, 然后将 50 μL 所得溶液加到免疫板 (Maxisorb, NUNC) 的每孔中。4℃过夜反应后, 将板用离子交换水洗涤并通过向每孔中加入含有 0.1% StabilGuard (SurModics, Inc.) 和 0.1%吐温 20 的 100 μL PBS 封闭。接着将含有 1%CD14-吸收血清和 0.1%BSA 的 76 mM PBS (pH 7.4)用作稀释剂以制备 CD14 (1-307) S286C 蛋白质标准制剂的 0、3、25、60、100 和 150 ng/mL 的稀释系列。以每孔 50 μL 的量加入标准制剂的稀释系列并在 37℃反应 2 小时。反应完成后, 用含有 0.05%吐温 20 的生理盐水洗涤板 3 次。然后, 向每孔加入通过用含有 0.1%吐温 20 的 76 mM

PBS (pH 8.0) 将 5% 大鼠血清、1% 小鼠血清和过氧化物酶-标记的 F1031-8-3 抗体制备的被稀释的标记抗体 50 μ L。37℃ 下反应 2 小时后，以和上面相同的方法洗涤板 5 次，并向每孔加入四甲基联苯胺溶液 (TMB, BioFix)。室温下反应 20 分钟后，用 0.5 M 硫酸溶液终止反应并使用平板分光光度计 (NJ-2100, 日本 Intermed) 测量 450 nm 的吸光度。所制备的标准曲线在图 4 中显示。实现了测量灵敏度为 0.6 ng/mL (空白+3SD) 的高灵敏性简单测定系统。

8-(13) 三明治 EIA 系统的特异性

为了研究人血清中存在的高分子量 CD14 对所制备的测定系统的影响，将浓度为 0 到 4 μ g/mL 来自正常个体的可溶性 CD14 加入 CD14 (1-307) S286C 的标准制剂中以实施和 (12) 相同的测定。结果，即使来自正常个体的血清的可溶性 CD14 的浓度为 4 μ g/mL，对所测水平也没有影响。该结果发现本三明治 EIA 系统与高分子量 CD14 的交叉反应性为 0.3% 或更低。换句话说，该结果证实本系统不检测人血清高分子量 CD14 并且对在脓毒症患者的血清中显示出高水平的可溶性蛋白质是特异的。

8-(14) 对三明治 EIA 系统的测定试剂盒的评价

评价了 (1) 的试剂盒的测定结果的再现性。使用如 (12) 中的 3 种样品的组内再现性的变异系数 (CV) 分别为 5.8、3.6 和 3.5%，测量值之间的再现性分别为 6.2、5.2 和 5.1%。从而，得到良好结果，而没有观察到抗凝剂 (肝素、柠檬酸，或 EDTA) 的影响。上面描述的结果表明本试剂盒具有测定人低分子量 CD14 的足够能力。

8-(15) 免疫层析测定试剂盒的实例

<1> 被标记抗体：用金胶体标记的 F1031-8-3 抗体

<2> 偶联垫：玻璃纤维滤器 (33-Glass 条, Schleicher & Schuell 生产)，其中应用 <1>

<3> 固定抗体的膜：硝酸纤维素膜 (FF85/100, Schleicher & Schuell 生产)，其被 0.5% 酪蛋白封闭，并且具有 S68 抗体的固定化线和该固定化线下游的对照线 (抗-小鼠多克隆抗体的固定化线)。

<4> 样品-滴入垫：33-Glass 玻璃纤维滤器 (Schleicher & Schuell 生产)

<5> 吸收垫 (#900 滤纸 (Schleicher & Schuell 生产))

<6>片: PB020 塑料支持片 (BioDot 生产); <2>到<5>被装配在<6>上从而<4>中滴入的液体可以按照<2>、<3>和<5>的顺序流过。

<7> 装载盒(可从 NIPPON Technocluster, Inc 得到的 OEM 盒)

另外, 在图 1(A) 中给出了<1>到<5>的略图。

8-(16)到(19) 免疫层析测定试剂盒的实例

表 8 显示了, 除了 8-(15)之外, 利用生物素和链霉抗生物素蛋白之间的结合的第二特异结合的三明治 EIA 系统的测定试剂盒的实例, 和利用结合具有 SEQ ID NO: 2 中描述的 16 个氨基酸残基的肽的抗体的片段的三明治 EIA 系统的测定试剂盒的实例。<1>代表被标记的结合物质。组成元件<2>到<7>是相同的。作为应用于<3>上的物质, <3>-(i) 代表将固定在固定化膜上的结合物质, <3>-(ii) 代表将固定在对照线上的结合物质。<8>代表与第二特异结合物质结合的抗体, 该物质为将应用在<2>或<4>上的试剂, 如<1>中的情形, 或者将被加到样品或者与该样品一起同时加入的试剂。

另外, 在图 1(B) 中显示了(16)<1>到<5>的略图, 类似地理解(17)到(20)。

表 8

	<1>	<3>-(i)	<3>-(ii)	<8>
(16)	金胶体标记的 Str	S68 抗体	抗-小鼠 多克隆抗体	Bio- F1031-8- 3 抗体
(17)	金胶体标记的 Bio	S68 抗体	Str	Str- F1031-8- 3 抗体
(18)	金胶体标记的 F1031-8-3 抗体	Str	抗-小鼠 多克隆抗体	Bio-S68 抗体
(19)	金胶体标记的 S68 抗体	Str	抗-兔 多克隆抗体	Bio- F1031-8- 3 抗体
(20)	金胶体标记的 S68 抗体的 F(ab') ₂	F1103-13-3 抗体	抗-兔 多克隆抗体	

另外, 如下制备用(20)<1>的金胶体标记的 S68 抗体的 F(ab')₂。使用固定化胃蛋白酶(PIERCE)如下实施从 S68 抗体制备 F(ab')₂。即,

将 S68 抗体溶解于 20 mM 乙酸缓冲液 (pH 4.5) 以制备成 5 mg/mL。根据 PIERCE 的方案通过悬浮制备 0.25 mL 固定化胃蛋白酶并与 1mL 上面的抗体混合。接着, 将混合物在培养箱中 37℃ 下搅拌 4 小时, 然后, 通过加入 1.5 mL 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 终止反应。将反应溶液离心 (1000 × g) 以分离凝胶和上清液。然后, 将分离的上清液加到 1 mL prosep-A (Millipore) 以容许包括 Fc 部分的肽 (如 Fc 片段及未被消化的肽) 的结合, 然后将上清液对 PBS (pH 6.4) 透析。测量 280 nm 处 $F(ab')_2$ 的吸光度, 然后从吸光度常数 ($0.533 \text{ mg/mL/cm}^{-1}$) 计算 $F(ab')_2$ 的浓度。所得 $F(ab')_2$ 如实施例中的情形用金胶体标记, 得到金胶体标记的 S68 抗体的 $F(ab')_2$ 。

8-(21) 流通系统的配置实例

<1> 染料-标记的抗体: RED VIOLET 染料-标记的 S68 抗体

<2> 偶联垫: 用上面的 (1) 浸渗的滤纸 (No. 63, Advantec Toyo Co., Ltd. 生产)

<3> 固定抗体的膜: 硝酸纤维素膜 (Advantec Toyo), 其上固定 S68 抗体

<4> 吸收垫: 用聚丙烯层压的滤纸 (No. 28, Advantec Toyo)

<5> 装载盒: JP 06-273419A 中描述的盒子 (Mochida Pharmaceutical 生产); <2> 到 <4> 在 <5> 中装配从而滴入 <2> 中的液体可以按顺序流经 <2>、<3> 和 <4>。

实施例 9 人低分子量 CD14 的检测

(1) 凝胶过滤层析 <1>

为了分析通过实施例 8-(1) 中描述的测定试剂盒检测的脓毒症患者血清中的物质, 使用 SMART SYSTEM (Amersham Biosciences), 使脓毒症患者的血清通过凝胶过滤层析柱 Superdex 200PC 3.2/30 (Amersham Biosciences) 分级, 用 D-PBS 作为洗脱缓冲液。然后, 用实施例 8-(1) 中描述的测定试剂盒和通过商业途径可得到的 CD14-EIA 试剂盒 (IBL-Hamburg) 测定每个级分。通过用来自 LMW 校准试剂盒和 HMW 校准试剂盒 (Amersham Biosciences) 的醛缩酶 (158 kDa)、BSA (67 kDa)、卵清蛋白 (43 kDa) 和胰凝乳蛋白酶 (25 kDa) 校准层析柱计算各级分的分子量。

结果, 如图 6 中所示, 该商业途径可得到的 CD14-EIA 试剂盒检

测到分子量为约 57kDa 的可溶性 CD14, 其被定义为通常报导的 49 到 55 kDa 的高分子量可溶性 CD14。另一方面, 在实施例 8-(1) 中描述的试剂盒中, 检测到来自脓毒症患者中检测到的人低分子量 CD14 分子量约为 35 到 45kDa 的峰, 但是没有检测到约 57 kDa 的峰。从而, 该结果证实实施例 8-(1) 中描述的试剂盒特异检测血液中的仅一种可溶蛋白。

(2) 凝胶过滤层析<2>

如(2)-<1>的情况, 来自脓毒症患者的血清 50 μ L 通过凝胶过滤层析柱 Superdex 75 10/300 GL (Amersham Bioscience) 分级, 使用 200 mM 乙酸铵 (pH 6.8) 作为洗脱缓冲液并使用每种试剂盒测定。通过用来自 LMW 校准试剂盒和 HMW 校准试剂盒 (Amersham Biosciences) 的 BSA (67 kDa)、卵清蛋白 (43 kDa) 和胰凝乳蛋白酶 (25 kDa) 和核糖核酸酶 A (13.7 kDa) 校准层析柱计算各级分的分子量。

结果在图 7 中显示。在实施例 8-(1) 中描述的试剂盒中, 检测到分子量约 25 到 35 kDa 来自人低分子量 CD14 的峰。

(3) F1025-3-1 抗体亲和柱层析

当来自(2)-<2>中得到的人低分子量 CD14 的峰级分(例如级分 12)被应用于 F1025-3-1 抗体亲和柱层析时, 在亲和柱非吸附部分洗脱出来自人低分子量 CD14 的峰。另外, 可以基于 WO 01/22085 的实施例 10 中描述的方法实施 F1025-3-1 抗体亲和柱的调节和操作。

这些结果表明人低分子量 CD14 是血液中的一种可溶蛋白, 其特异结合针对 SEQ ID NO: 2 中描述的特定肽的抗体, 该特定肽具有仅在人 CD14 中检测到的序列, 该可溶蛋白还结合识别人 CD14 从 N-末端开始的 17 到 26 位氨基酸序列的抗-CD14 抗体。凝胶过滤测定该可溶蛋白的分子量为 25 到 45kDa。从而, 可定义人低分子量 CD14 的分子量小于人高分子量 CD14 (常规的天然 CD14)。此外, 人低分子量 CD14 不结合特异结合高分子量 CD14 的 F1025-3-1 抗体。

实施例 10 各种疾病患者的血清中低分子量 CD14 的测定

10 个病例(从中鉴定了分离物)被用作(表 9)脓毒症患者的血清。此外, 使用实施例 8-(1) 中描述的测定试剂盒对 52 例正常个体(男性 31 例, 女性 21 例)和各种疾病的患者(20 种疾病, 60 例)实施了测定。

表 9

编号	性别	年龄	细菌
1	男性	41	凝固酶-阴性细菌
2	女性	44	凝固酶-阴性细菌
3	女性	61	Faecium 细菌
4	男性	52	沙雷氏菌属细菌
5	男性	37	大肠杆菌
6	女性	67	大肠杆菌
7	男性	70	金黄色葡萄球菌
8	男性	51	pantoea agglomerans
9	女性	81	大肠杆菌
10	男性	77	大肠杆菌

正常个体血清中低分子量 CD14 的水平为 0.008 到 0.100 $\mu\text{g/mL}$ ，其平均值为 0.04 $\mu\text{g/mL}$ 。对于脓毒症患者，低分子量 CD14 的水平为 0.190 到 7.260 $\mu\text{g/mL}$ ，其平均值为 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 。脓毒症患者的低分子量 CD14 水平高于正常个体和其他各种疾病患者的低分子量 CD14 水平。在其他各种疾病患者中，与正常个体相比，没有患者表现出高水平。

实施例 11 与关于血液中可溶性 CD14 的通过商业途径可得到的 ELISA 试剂盒的比较

11-(1) 各种疾病患者的血液中可溶性 CD14 的测定

使用通过商业途径可得到的 CD14-ELISA 试剂盒 (IBL-Hamburg) 测定了实施例 10 的样品。正常个体的血液中可溶性 CD14 的水平 (估计为低分子量 CD14 和高分子量 CD14 的总和) 为 5.6 到 11.2 $\mu\text{g/mL}$ ，但是观察到脓毒症患者的一例高水平。然而，在各种疾病患者的血清中发现显示可溶性 CD14 的高水平的许多病例，从而与脓毒症患者之间没有差异。

11-(2) 与使用 S68 抗体的试剂盒的比较

实施了实施例 10 中确定的低分子量 CD14 的测量水平的比较和研究。如表 10 中所示，商业途径可得到的 CD14-EIA 试剂盒在正常、各种疾病和脓毒症之间显示出最大几乎 1.7 倍的差异，而实施例 8-(1)

中的试剂盒在正常个体和脓毒症患者之间显示出 50 倍差异, 尽管正常个体和各种疾病之间没有差异。因此, 结果很明显, 实施例 8-(1) 的测定试剂盒的测量水平在脓毒症中特异增加。

表 10

	血液中 CD14 水平 ($\mu\text{g/mL}$)			比例 脓毒症/正常
	正常	各种疾病	脓毒症	
实施例 8-(1) 的 测定试剂盒	0.04	0.06	2.0	50.0
商业途径可得到的 CD14-EIA	7.6	9.0	13.2	1.7

将受试的正常个体的平均水平+3S.D. 作为截断水平 (低分子量 CD14-EIA: $0.134 \mu\text{g/mL}$, 商业途径可得到的 CD14-EIA: $11.14 \mu\text{g/mL}$), 然后将分析分成阳性样品 (脓毒症) 和阴性样品 (正常的+各种疾病)。结果在表 11 中显示。根据结果, 计算了两种试剂盒之间的同一率 ((EIA 阳性相同数+EIA 阴性相同数)/总数 $\times 100$)、灵敏度 (EIA 阳性相同数/阳性病例 $\times 100$) 和特异性 (对 EIA 阳性相同数/阴性病例 $\times 100$)。结果, 如表 12 中所示, 对于低分子量 CD14-EIA, 同一率为 94.3%, 灵敏度为 100.0%, 特异性为 93.8%。从而, 发现低分子量 CD14-EIA 可用于通过限定截断水平对脓毒症的差别诊断。另一方面, 对于商业途径可得到的 CD14-EIA, 没有特异容许脓毒症诊断的灵敏度和特异性。

表 11

分类	阳性样品	阴性样品		总数
疾病	脓毒症	正常的	各种类型的疾病	
实施例 8-(1) 的 测定试剂盒	10	51	54	115
商业途径可得到的 CD14-EIA	6	51	45	102
总数	10	52	60	122

表 12

	实施例 8 的测定试剂盒	商业途径可得到的 CD14-EIA
同一率 (%)	94.3%	83.6%
灵敏度 (%)	100.0%	60.0%
特异性 (%)	93.8%	85.7%

实施例 12 抗-CD14 单克隆抗体的特异性

12-(1) F1106-13-3 抗体的分析

为了阐明 F1106-13-3 抗体的结合区(表位)，将一种肽文库膜 (Custom SPOTs, Sigma Genosys) 用于分析，该肽文库膜上，从其 N-末端 10 个氨基酸一次合成 CD14 的氨基酸序列。即，基于其使用手册将膜封闭，然后与 F1106-13-3 抗体反应，洗涤，然后与结合 β -半乳糖苷酶的抗小鼠抗体反应。膜被洗涤后，使用 X-gal 检测结合该抗体的肽序列。另外，使用 19 种肽分析肽文库膜上的肽序列，合成这 19 种肽使得 10 个氨基酸被一次合成从 1 到 54 位氨基酸序列的各自 C 末端的两个氨基酸重叠。通过和实施例 1-(1) 相同的方法制备肽。

结果发现 F1106-13-3 抗体结合高分子量 CD14 的从 N-末端开始的 17 到 26 位 (CNFSEPQPDW) 氨基酸序列的区域。

12-(2) F1031-8-3 抗体的分析<1>

为了证实 F1031-8-3 抗体的特异性，使用实施例 3-(1) 中描述的来自大肠杆菌的 sCD14(1-285) 和从 COS 细胞制备的 sCD14(1-356) 和 sCD14(1-307)，使用 W001/72993 的实施例 8 和 9 中描述的方法，测定了结合活性。

首先，将 sCD14(1-356)、sCD14(1-307) S286C、sCD14(1-285)，或者 BSA 以 250 ng/点固定在膜 Hybond-C extra (Amersham Bioscience) 上，干燥后，将其通过含有 0.05 g/mL 脱脂乳 (Meiji Milk Products) 和 0.05% 吐温 20 的 PBS (pH 6.4) 封闭。所得物在室温静置 1 小时后，将 F1031-8-3 抗体用含有 0.5% BSA 的 0.05% 吐温 20 稀释到 3 μ g/mL，加入 PBS (pH 6.4) 并在室温反应 1 小时，然后用 0.05% 吐温 20 的 PBS (pH 6.4) 洗涤。

接着，加入用含有 10% 兔血清的 0.05% 吐温 20% PBS (pH 6.4) 将过

氧化物酶-标记的抗-小鼠免疫球蛋白抗体 (DAKO) 稀释 500 倍并在 37℃ 反应 30 分钟。然后, 类似地洗涤膜, 然后用 ECL 试剂盒 (Amersham Bioscience) 证实抗体的结合活性。结果, 如表 5 中所示, F1031-8-3 抗体结合来自大肠杆菌的 sCD14 (1-285)、sCD14 (1-307) S286C、和 sCD14 (1-356), 但是不结合 BSA。从而, 该结果发现 F1031-8-3 抗体特异识别所有类型的 CD14 蛋白。在表 5 中, “+” 代表其中在膜上检测到点的情形, “-” 代表其中没有检测到点的情形。

表 5

	sCD14 (1-356)	sCD14 (1-307) S286C	sCD14 (1-285)	BSA
结合活性	+	+	+	-

12-(3) F1031-8-3 抗体的分析<2>

为了阐明 F1031-8-3 抗体的结合区域(表位), 如 8-(1) 中的情形进行了斑点分析。然而, 在斑点方法中, 不能指定 F1031-8-3 抗体的识别区域。为了分析两种抗体的识别区域的相似性, 在实施例 3-(3) [2] 的三明治 EIA 系统中, 其中 S68 抗体被用作固定化抗体, F1031-8-3-HRP 被用作被标记抗体, 使用 F1106-1-3 抗体进行了抑制试验。

首先, 如实施例 3-(3) [2] 中的情况, 将 100 ng/mL 标准制剂加入固定 S68-抗体的板并与该板反应。洗涤板后, 加入 F1031-8-3-HRP 抗体之前, 加入含有 6 μ g/mL F1106-13-3 抗体、小鼠 IgG 抗体, 或者无抗体的 25 μ L 缓冲液。然后, 加入 25 μ L F1031-8-3-HRP 抗体, 然后通过和实施例 3-(3)-[2] 相同的方法进行测定。

如表 6 中所示, 在小鼠 IgG 抗体加入系统中没有发生抑制, 而发生了 F1106-13-3 抗体对 F1031-8-3 和标准制剂之间结合的抑制。该事实指出 F1106-13-3 抗体可以结合将被 F1031-8-3 抗体识别的至少一个区域。另外, 从在将仅缓冲液的吸光度定义为 100% 的时候降低的每种吸光度计算“抑制率”。

表 6

加入的物质	抑制率 (%)
小鼠 IgG 抗体	2
F1106-13-3 抗体	70

工业实用性

根据本发明，提供了使用一种肽作为抗原制备的抗体，该肽具有选自人高分子量 CD14 的 1 到 68 位氨基酸序列的 8 到 30 个氨基酸残基，还提供了结合具有 SEQ ID NO: 2 到 4 中描述的氨基酸残基的肽的抗体。

那些抗体可用于人低分子量 CD14 测定试剂盒，并且该试剂盒能够以简单的方式高度灵敏地定量或定性确定人低分子量 CD14，从而该试剂盒可用于脓毒症患者的诊断。在本发明中，提供了含有上面抗体的人低分子量 CD14 测定试剂盒和测定方法。此外，提供了新的脓毒症诊断方法，其中直接测定人低分子量 CD14。此外，提供了用于制备上面的抗体的肽和制备该抗体的方法。

序列表

<110> Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> 测量低分子人 CD14 蛋白的试剂盒和结合所述蛋白的抗体

<130> MD0688

<150> JP2002/328866

<151> 2002-11-12

<150> JP2003/330775

<151> 2003-09-22

<160> 18

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 68

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

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

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

Val	Ser	Ala	Val	Glu	Val	Glu	Ile	His	Ala	Gly	Gly	Leu	Asn	Leu	Glu
			35				40					45			

Pro	Phe	Leu	Lys	Arg	Val	Asp	Ala	Asp	Ala	Asp	Pro	Arg	Gln	Tyr	Ala
			50				55				60				

Asp	Thr	Val	Lys
65			

<210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人

<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> 17
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 3

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

Cys

<210> 4
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 4

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

Phe Gln Cys

<210> 5
 <211> 356
 <212> PRT

<213> 人

<400> 5

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

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

Val Ser Ala Val Glu Val Glu Ile His Ala Gly Gly Leu Asn Leu Glu
35 40 45

Pro Phe Leu Lys Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala
50 55 60

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

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

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

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

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

Leu Gln Gln Trp Leu Lys Pro Gly Leu Lys Val Leu Ser Ile Ala Gln
145 150 155 160

Ala His Ser Pro Ala Phe Ser Cys Glu Gln Val Arg Ala Phe Pro Ala
165 170 175

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

Leu Met Ala Ala Leu Cys Pro His Lys Phe Pro Ala Ile Gln Asn Leu
195 200 205

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

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

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

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

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

Arg Leu Asn Arg Ala Pro Gln Pro Asp Glu Leu Pro Glu Val Asp Asn
290 295 300

Leu Thr Leu Asp Gly Asn Pro Phe Leu Val Pro Gly Thr Ala Leu Pro
305 310 315 320

His Glu Gly Ser Met Asn Ser Gly Val Val Pro Ala Cys Ala Arg Ser
325 330 335

Thr Leu Ser Val Gly Val Ser Gly Thr Leu Val Leu Leu Gln Gly Ala
340 345 350

Arg Gly Phe Ala
355

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 6

Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro
1 5

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 7

Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg
1 5

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 8

Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln
1 5

<210> 9
<211> 8
<212> PRT

<213> 人

<400> 9

Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr
1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 10

Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala
1 5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 11

Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala Asp
1 5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 12

Asp Pro Arg Gln Tyr Ala Asp Thr
1 5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 13

Pro Arg Gln Tyr Ala Asp Thr Val
1 5

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 14

Arg Gln Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5

<210> 15

<211> 13

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡聚体:8 linkS

<400> 15

agcttaggaa ttt

13

<210> 16

<211> 13

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡聚体:8 linkA

<400> 16

ctagaaattc cta

13

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 有义引物

<400> 17

acatctagat gaccacgcca gaacct

26

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义引物

<400> 18

tttggatcct tactagagat cgagcaatct

30

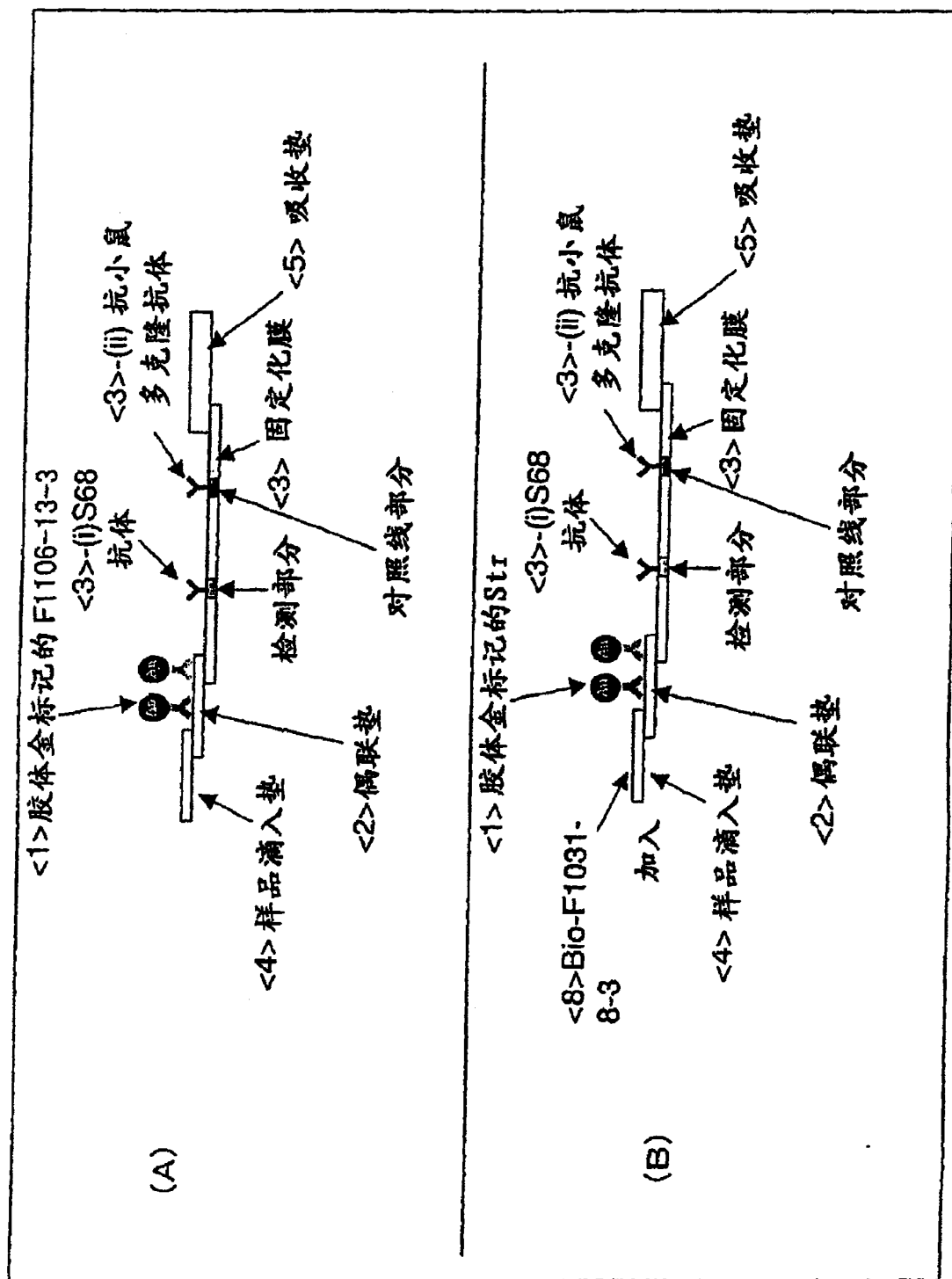


图 1

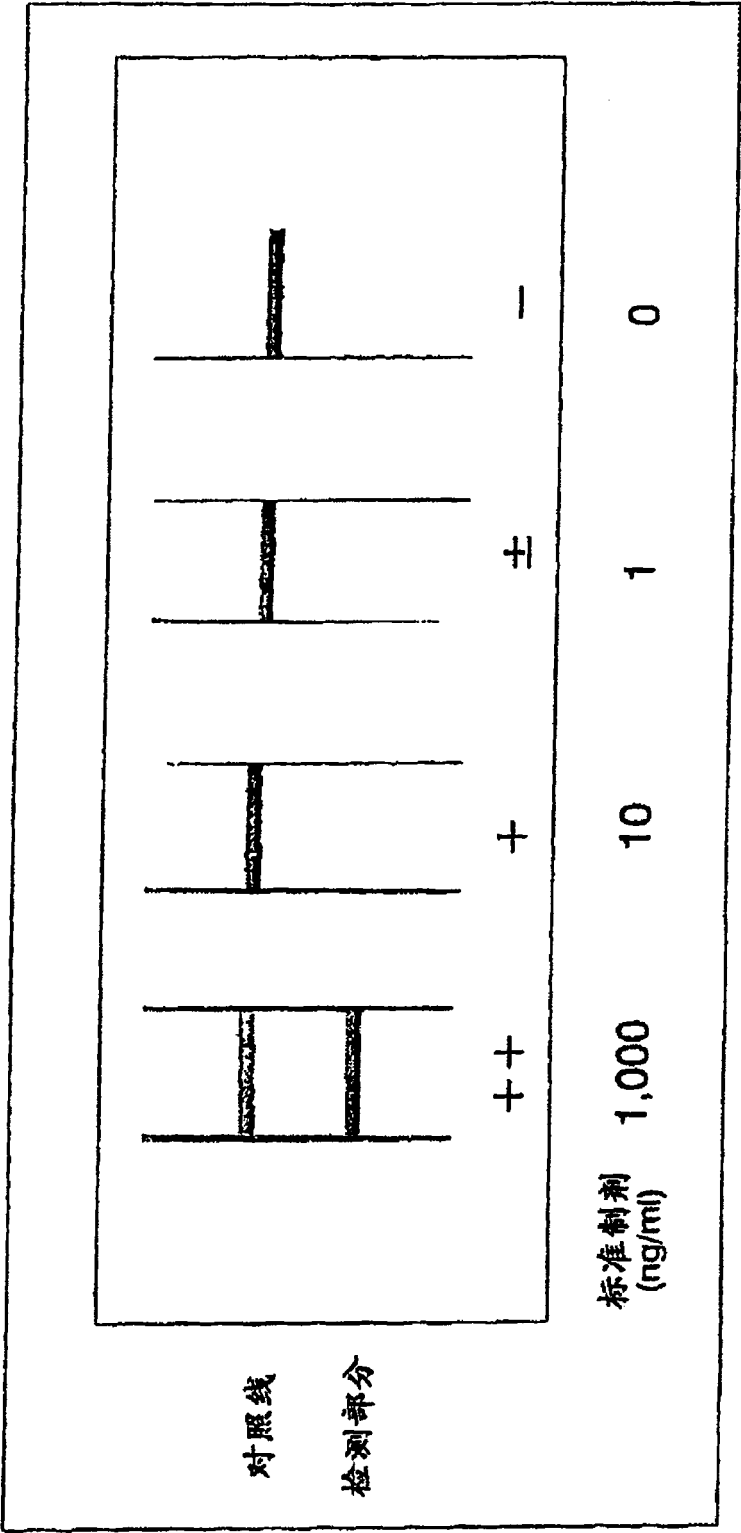


图 2

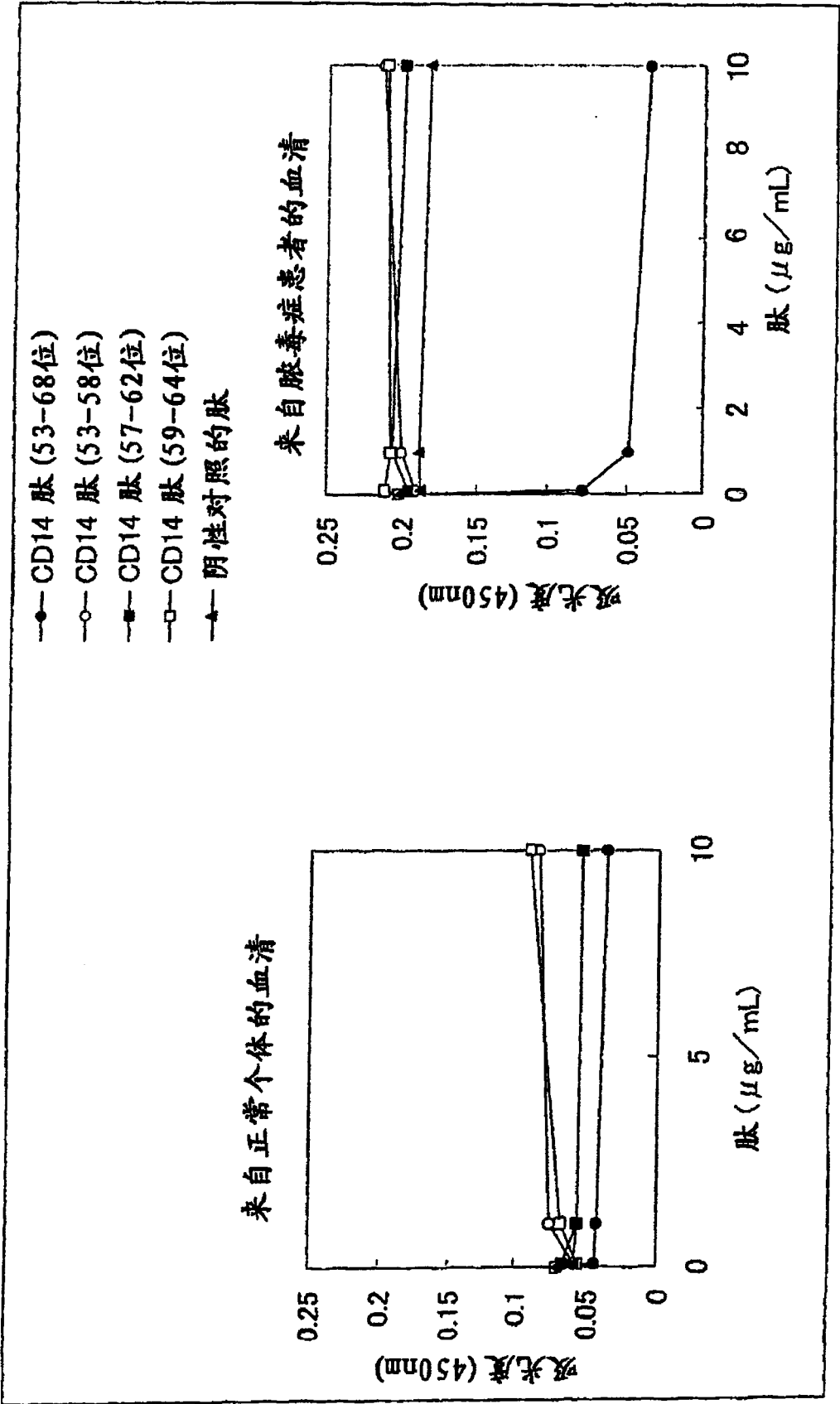


图 3

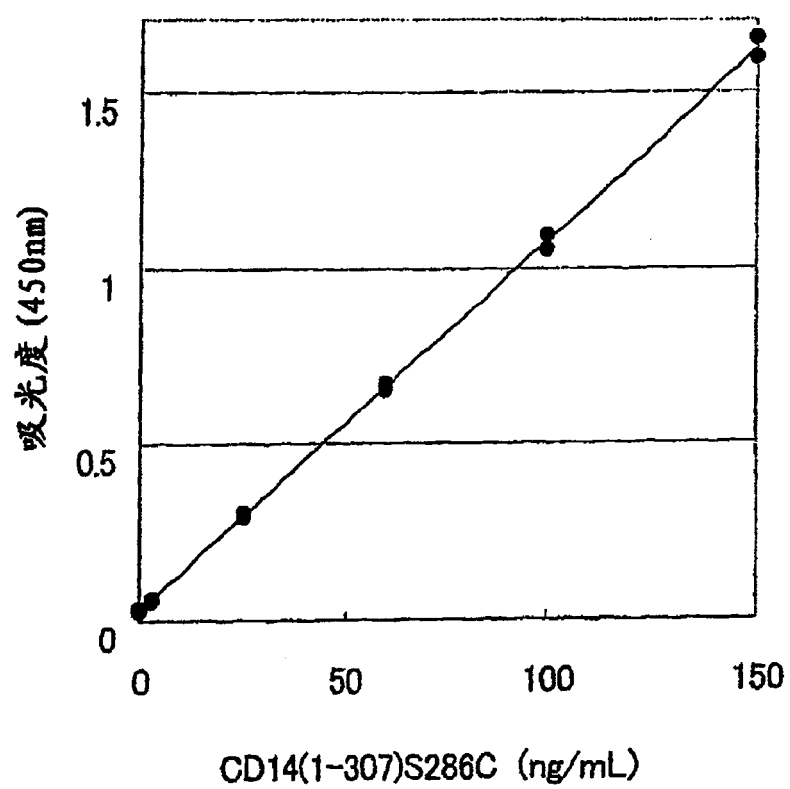


图 4

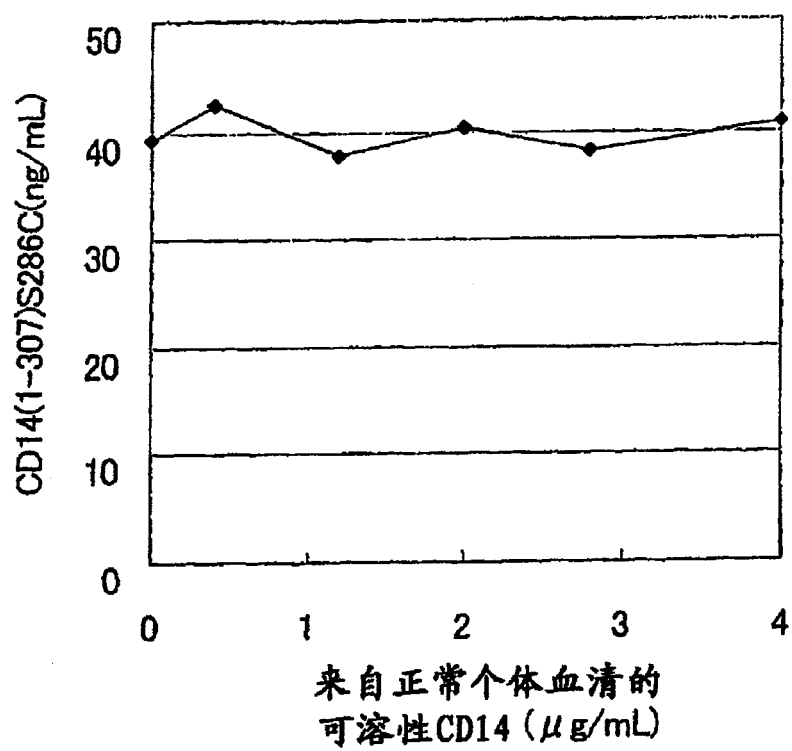


图 5

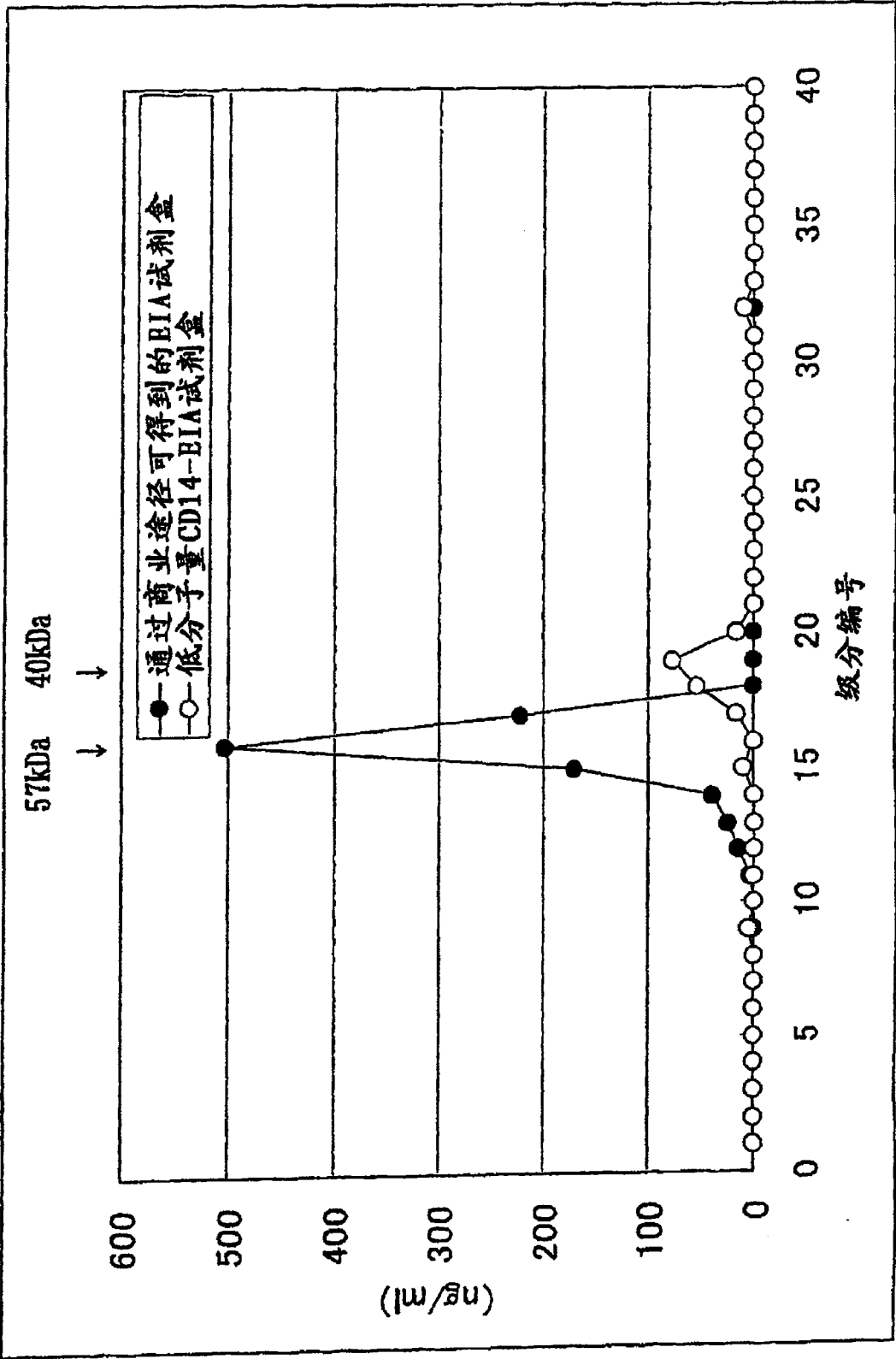


图 6

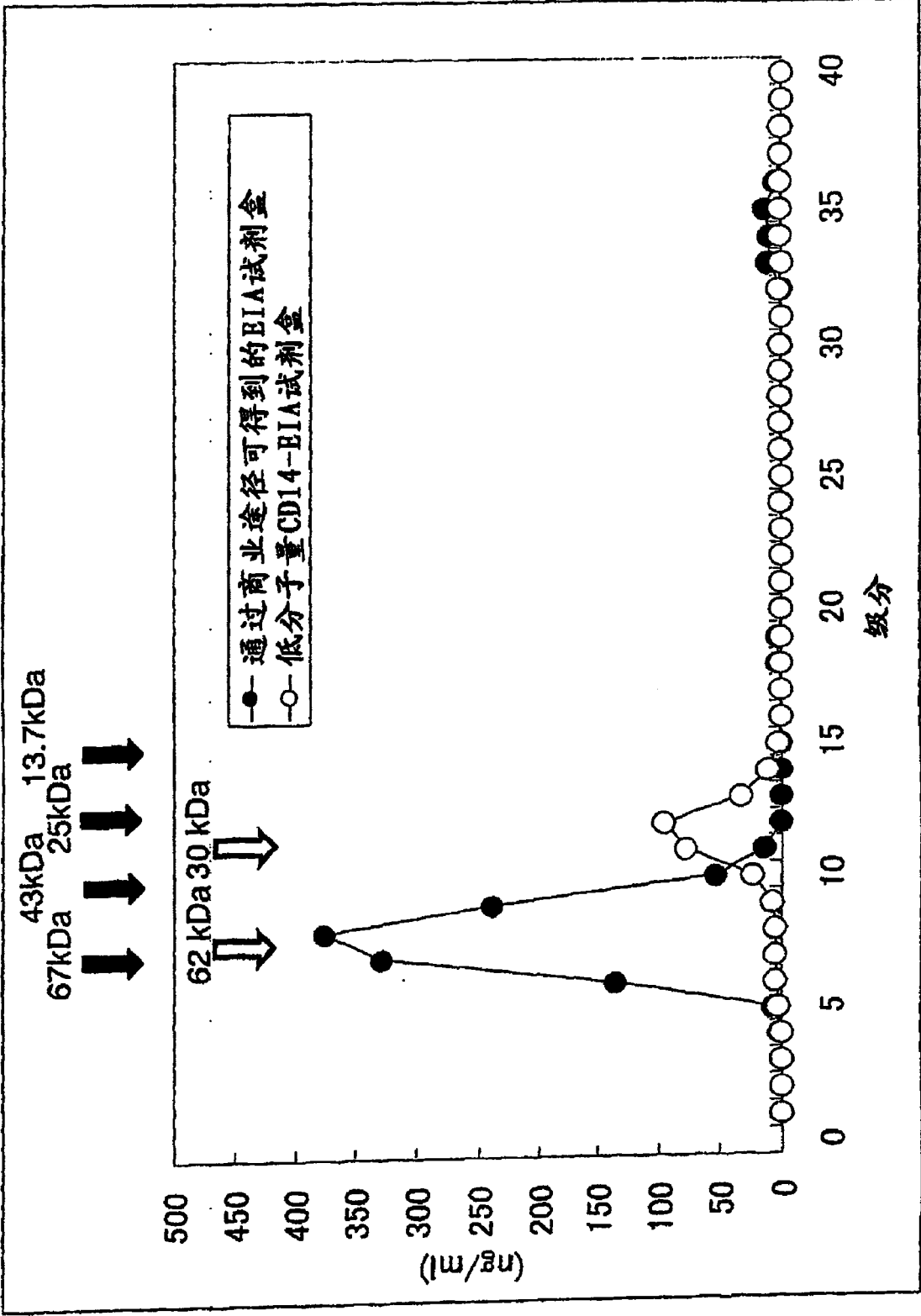


图 7

专利名称(译)	人低分子量CD14测定试剂盒和抗体		
公开(公告)号	CN100558746C	公开(公告)日	2009-11-11
申请号	CN200380103145.4	申请日	2003-11-12
申请(专利权)人(译)	持田制药株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	持田制药株式会社		
[标]发明人	古迫正司 白川嘉门		
发明人	古迫正司 白川嘉门		
IPC分类号	C07K16/28 C07K7/00 G01N33/53 C12P21/08 A61P37/02 C12N15/06 C07K14/705		
CPC分类号	C07K2317/34 C07K16/2896 G01N2800/26 C07K14/70596		
代理人(译)	王景朝		
审查员(译)	周霞		
优先权	2003330775 2003-09-22 JP 2002328866 2002-11-12 JP		
其他公开文献	CN1711283A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了使用一种肽作为抗原制备的抗体，该肽具有选自人高分子量CD14的1到68位的氨基酸序列的8到30个氨基酸残基，或者结合包括1到68位特定氨基酸序列的肽的抗体。使用该抗体的人低分子量CD14的测定试剂盒和本发明的测定方法，优选三明治方法，能够以简单方式高度灵敏和特异地定性或定量确定人低分子量CD14，从而它们可用于脓毒症患者的诊断。

抗体的组合		测量水平	
固定化侧	标记侧	脓毒症患者	正常个体
S68 抗体	F1031-8-3 抗体	++	-
S68 抗体	F1106-13-3 抗体	++	-
F1146-17-2 抗体	F1031-8-3 抗体	+	-
P001 多克隆抗体	F1031-8-3 抗体	+	-
P002 多克隆抗体	F1031-8-3 抗体	+	-