



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102257387 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 23

(21) 申请号 200980151844. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 10. 27

G01N 33/50(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

(30) 优先权数据

12/259, 596 2008. 10. 28 US

61/158, 520 2009. 03. 09 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 06. 17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2009/007493 2009. 10. 27

(87) PCT申请的公布数据

W02010/049818 EN 2010. 05. 06

(71) 申请人 巴黎公众助理医院

地址 法国巴黎

(72) 发明人 D·帕扬·德拉加朗代里

A·C·卢卡谢维奇

(74) 专利代理机构 上海市华诚律师事务所

31210

代理人 傅强国 贾师英

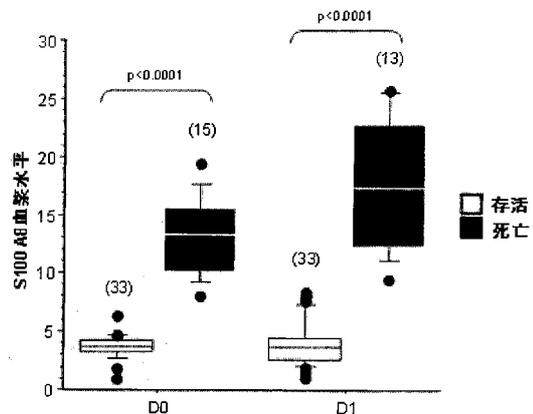
权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 5 页

(54) 发明名称

严重脓毒病和败血性休克期间用于快速确定死亡高风险病人的方法和试剂盒

(57) 摘要

本发明提供了方法和试剂盒,以便得到用于有两个器官衰竭的严重脓毒病病人比如用于败血性休克病人的致死性风险的早期评估和辅助性治疗决定。本发明是基于血浆中的 S100A8/A9 复合物水平的测定,因为 S100A8/A9 水平超过预定阈值就表明预后不良,而 S100A8/A9 水平低于所述预定阈值则表明预后良好。



1. 一种用于为个体体外建立预后的方法,所述个体患有严重脓毒病并至少有两个器官衰竭或者患有败血性休克并至少有两个器官衰竭,所述方法包括下述步骤:

(i) 从来自于所述个体的生物样品中,测定 S100A8/A9 复合物的水平,

(ii) 将所述水平与预定阈值进行比较,

其中,所述 S100A8/A9 复合物的水平超过所述预定阈值的,则表明预后不良,而所述 S100A8/A9 复合物的水平低于所述预定阈值的,则表明预后良好。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,在第二个器官衰竭开始后的第 0 天、第 1 天或者第 2 天收集所述生物样品。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述预定阈值的范围是 7-9  $\mu\text{g/ml}$ 。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述预定阈值的范围是 7.8-8.3  $\mu\text{g/ml}$ 。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述预定阈值的范围是 8.1  $\mu\text{g/ml}$ 。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述生物样品选自血浆、唾液、尿液、脑脊液、胸膜液和腹膜液。

7. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,通过免疫测定进行步骤 (i) 中的所述测定。

8. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述免疫测定是通过使用与所述 S100A8/A9 复合物特异性地结合的抗体而进行的。

9. 如权利要求 8 所述的方法,其特征在于,所述抗体被荧光标记。

10. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述免疫测定是 ELISA。

11. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,进一步包括测定所述生物样品中至少一种其它种类的水平的步骤和将所述水平与预定阈值进行比较的步骤,其中所述其它种类选自降钙素原 (PCT)、N 末端脑钠肽前体 (BNP)、可溶性髓系细胞触发受体 (sTREM)、IL-6 和 sRAGE。

12. 一种用于对患有严重脓毒病并至少有两个器官衰竭或者患有败血性休克并至少有两个器官衰竭的病人进行跟踪的方法,其通过测定所述病人的 S100A8/A9 复合物的血浆水平的变化而进行,其中所述水平减少表明所述病人正在恢复。

13. 一种用于对患有严重脓毒病并至少有两个器官衰竭或者患有败血性休克并至少有两个器官衰竭的病人进行跟踪的方法,其通过测定所述病人的 S100A8 和 / 或 S100A9 的表达水平的变化而进行,其中所述水平减少表明所述病人正在恢复。

14. 如权利要求 13 所述的方法,其特征在于,通过定量扩增法测定所述表达水平。

15. 如权利要求 12 或者 13 所述的方法,其特征在于,所述测定是在收纳病人后的几个时间点上取自于所述病人的生物样品上进行的。

16. 一种用于帮助决定病人退出治疗的方法,所述病人患有严重脓毒病并至少有两个器官衰竭或者患有败血性休克并至少有两个器官衰竭,所述方法包括下述步骤:

(i) 通过如权利要求 1 所述的方法建立用于所述病人的预后;

(ii) 测定来自于治疗数天后的所述病人的生物样品中的 S100A8/A9 复合物的水平;

其中,如果观察到 S100A8/A9 复合物的水平没有下降且临床现状仍然严重,则决定停止治疗。

17. 一种用于确定是否将患有严重脓毒病并至少有两个器官衰竭或者患有败血性休克并至少有两个器官衰竭的个体招入临床试验的方法,用以评估用于缩减这种病人的加强

支持需要的药物治疗的有效性,所述方法包括通过如权利要求 1 所述的方法为所述个体建立预后的步骤,其中,如果测定的 S100A8/A9 复合物水平低于所述预定阈值,则招募所述个体。

18. 一种用于确定是否将患有严重脓毒病并至少有两个器官衰竭或者患有败血性休克并至少有两个器官衰竭的个体招入临床试验的方法,用以评估用于改善这种病人的结局的药物治疗的有效性,所述方法包括通过如权利要求 1 所述的方法为所述个体建立预后的步骤,其中,如果测定的 S100A8/A9 复合物水平超过所述预定阈值,则招募所述个体。

19. 一种用于检测用于改善至少有两个器官衰竭的严重综合症结局的药物治疗的有效性的方法,包括下述步骤:

(i) 选择患有严重脓毒病并至少有两个器官衰竭或者患有败血性休克并至少有两个器官衰竭的病人,在所述药物治疗开始之前,确定来自于所述病人生物样品中的 S100A8/A9 复合物水平;

(ii) 从来自于所述药物治疗开始之后的所述病人的至少另一个样品中,确定 S100A8/A9 复合物的水平;

(iii) 比较所述得到的数值;

其中,S100A8/A9 复合物水平随着药物治疗开始而减少,则表明所述治疗对病人是有益的,并有可能改善伴有至少有两个器官衰竭的严重综合症的结局。

20. 一种用于进行如权利要求 1 所述的方法的试剂盒,其包含:对 S100A8/A9 复合物特异的抗体;和使用注意事项,其用来说明 S100A8/A9 复合物的血浆水平在败血性休克结局上的预测值。

21. 如权利要求 20 所述的试剂盒,其特征在于,进一步包含用于进行免疫测定的试剂。

## 严重脓毒病和败血性休克期间用于快速确定死亡高风险病人的方法和试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及严重的医学综合症例如严重脓毒病或者败血性休克治疗领域。尤其是,本发明提供方法和试剂盒以便得到用于有两个器官衰竭的严重脓毒病病人、比如用于败血性休克病人的致死性风险的早期评估和辅助性治疗决定。

### 背景技术

[0002] 败血性休克是脓毒病最严重的临床表现,尽管有强烈的治疗支持和抗感染的策略来根除感染病灶,但败血性休克还是具有较差的预后。脓毒病综合症被定义为与对微生物(细菌、病毒或者寄生物)的异常存在或者它们的抗原组分的寄主反应相关的症状。局部感染可能由于不同的原因扩散至全身,伴随有早期阶段控制先天免疫性的血液免疫细胞的特定活化和第二时间的适应性免疫的活化。血液中这样一种强烈的免疫活化可能反过来靶向那些最初与初始感染无关的器官,导致免疫毒性和这些器官的功能障碍。败血性休克的高死亡率(大约 50%)来自于器官衰竭、并存疾病和微生物致病性的组合。死亡可能发生在发展的不同时期,最常发生在第一个星期内,尽管有强烈的复苏。

[0003] 许多检定治疗性干预的研究已经产生重要的但是有争议的结果,例如皮质甾类(Annane 等人,2002;Sprung 等人,2008)、被活化的蛋白质 C(Bernard 等人,2001)的使用和严格的血糖控制(van den Berghe 等人,2001)。由于缺少一种用于确定预后的早期的、特异性的和敏感的标记物,因此不仅在昂贵的药物处方和无用的维持生命支持方面给临床医生造成困难,而且在研究项目入选的病人选择方面也给试验研究员造成困难。已经试验了一些有希望的标记物,例如降钙素原(Clec'h 等人,2004)、HLA-DR(Monneret 等人,2006)、IL-6(Abraham 等人,2001)以及可溶性髓系细胞触发受体(sTREM)(Gibot 等人,2005);但是结果是相冲突的。

[0004] 最近,已近研究了一组新的不同的分子如“内动素(endokines)”、“警报素(alarmins)”或者“损伤相关分子模式蛋白质(DAMPs)”,即在细胞应激条件下被活化或者损害的细胞所释放的这些分子(Oppenheim 等人,2007)。在这些分子之中,吞噬细胞 S100 蛋白质、调节炎症反应(Vogl 等人,2007)和器官功能(Boyd 等人,2008)的钙粒蛋白家族成员在脓毒病中显得很重要。模式识别的显著概念包括在感觉中用于高糖化最终产品的多配体受体和 Toll 样受体(TLRs),它们不仅是与病原体相关的分子模式(PAMPs)而且是内源的 DAMP,包括 S100 蛋白质(Brunn and Platt,2006;Foell 等人,2007)。

[0005] S100A8 和 S100A9 基因的过表达已经在接受脂多糖(LPS)或盲肠结扎穿孔术(CLP)挑战实验的老鼠中(Vogl 等人,2007年)、在与 LPS 一起温育的心肌细胞中(Boyd 等人,2008年)、在局部缺血/再灌注之后的肾组织中(Grigoryev 等人,2008年)、在 LPS 注射后的健康志愿者的白细胞中(Talwar 等人,2006年)、以及在某些败血性休克的病人中显现出来。自从 S100A8 和 S100A9 蛋白在细胞内和细胞外空间都被发现后,它们很可能既在细胞内起作用,也以自分泌或旁分泌的方式起作用。在患败血性休克的老鼠中,基因表达和

蛋白的水平都很高 (Vogl 等人, 2007 年)。很少有研究已经检查过人类败血性休克中这些蛋白在细胞内和细胞外的水平。

### 发明内容

[0006] 最近, 发明人发现, 在人类败血性休克的恢复期, S100A8 与 S100A9 基因表达的发展过程与 S100A8/A9 复合物的血浆水平之间有一个紧密相关性 (Payen 等人, 2008 年), 故将其并入此文以供参考。

[0007] 以下的实验部分报道了在败血性休克病人中进一步的研究结果, 在发生第二器官衰竭后的第 0 天, 检测 S100A8 与 S100A9 的基因表达和 S100A8/A9 复合物的血浆水平。在这个多中心的研究中, 发明人发现, 在那些最终存活者与未存活者之间, S100A8/A9 复合物的血浆水平存在巨大差异, 特异性和灵敏度达 100%。这个死亡风险的阈值被确定为 8.1  $\mu\text{g/ml}$ 。

### 附图说明

[0008] 图 1: 败血性休克存活者 (白方框) 和未存活者 (黑方框) 在发生第二器官衰竭后的第 0 天和第 1 天 S100A8/A9 复合物的血浆水平的箱形图。采用曼惠特尼非参数检验进行统计。

[0009] 图 2: 在存活者 (白方框) 和未存活者 (黑方框) 的循环白细胞中用 RT-PCR 检测的 S100A8 (左) 和 S100A9 (右) 基因表达的箱形图。采用曼惠特尼非参数检验进行统计。

[0010] 图 3: 用 RT-PCR 检测的 S100A8 和 S100A9 基因表达之间的相关性。采用斯皮尔曼检验进行统计。

[0011] 图 4: 总人数 ( $n = 111$ ) 中的 28 天死亡率预测的受试者工作特征曲线 (ROC)。曲线下面积: 0.99。

[0012] 图 5: 血浆中根据结局的 S100A8/A9 复合物的时间趋势图。结果表示为  $\mu\text{g/ml}$ 。括号中是有效人数。\*: " $p \leq 0.0001$ ", 用曼惠特尼检验。

[0013] 图 6: 循环单核细胞中根据结局的 S100A8 基因表达的时间趋势图。结果表示为荧光单位。Affymetrix HG-U133 Plus 2.0array:202917\_s\_at 上的探针组 ID。括号中是有效人数。

[0014] 图 7: 根据结局循环单核细胞的 S100A9 基因表达的时间趋势图。结果表示为荧光单位。Affymetrix HG-U133 Plus 2.0array:203535\_at 上的探针组 ID。括号中是有效人数。

[0015] 图 8: 第 0 天没有休克的病人的 S100A8/A9

[0016]  $N = 8$  存活者

[0017]  $N = 8$  未存活者

### 具体实施方式

[0018] 本文中, 术语“脓毒病”、“严重脓毒病”和“败血性休克”应根据 1991 年被美国胸科医师协会 (ACCP) 和危重病医学学会 (SCCM) 建立的以及 2001 年被确定的定义来理解 (levy 等人于 2003 年)。以下概括了本文的 these 和其它的定义:

- [0019] - “脓毒病”是对感染作出反应的系统性炎症。
- [0020] - “严重脓毒病”被定义为至少有一种器官功能障碍的脓毒病。
- [0021] - 在严重脓毒病综合症中,最严重的情况会出现两个器官衰竭,甚至更多。虽然并不是很普遍,一些不同于急性循环衰竭的且有两个器官功能障碍的严重脓毒病病例也被观察到:这类病例就是被定义为“至少有两个器官衰竭的严重脓毒病”,同时也区别于败血性休克。
- [0022] - “败血性休克”被定义为伴有急性循环衰竭的脓毒病。
- [0023] - “急性循环衰竭”是持久性的低动脉压(动脉收缩压 $< 90\text{mm Hg}$ ,MAP 小 $< 60\text{mmHg}$ 或收缩压从基线下降 $> 40$ 毫米汞柱),尽管有足够的容量复苏,排除了引起低血压的其它因素。
- [0024] - “至少有两个器官衰竭的败血性休克”是除了急性循环衰竭之外还至少有一个器官(如肾、肝等)衰竭的败血性休克。
- [0025] - 本文中,被考虑的病人或者患有严重脓毒病,或者患有败血性休克,但这两种情况都至少有两个器官衰竭。对这些病人来说,“第0天”是指第二器官衰竭开始后24小时的这段时间。
- [0026] 如上所述,脓毒病是微生物异常存在的后果。能引起脓毒病的非限制性的微生物的例子有:
- [0027] 1- 细菌:
- [0028] 革兰氏阳性杆菌:棒状杆菌
- [0029] 梭状芽胞杆菌
- [0030] 李斯特菌
- [0031] 芽孢杆菌
- [0032] 革兰氏阴性球菌:奈瑟菌
- [0033] 革兰氏阴性杆菌:肠杆菌:大肠杆菌、志贺杆菌、克雷伯杆菌、沙门菌、沙雷菌、变形杆菌、假单胞菌、耶尔森菌
- [0034] 立克次体
- [0035] 嗜血杆菌
- [0036] 军团杆菌
- [0037] 普罗维登斯菌
- [0038] 类杆菌
- [0039] 革兰氏阳性球菌:链球菌
- [0040] 葡萄球菌
- [0041] 2- 病毒:疱疹病毒(疱疹病毒科):单纯疱疹、巨细胞病毒、水痘、带状疱疹……
- [0042] 流感病毒
- [0043] 副粘病毒
- [0044] 冠状病毒
- [0045] 副流感病毒
- [0046] 呼吸道合胞病毒
- [0047] 虫媒病毒

[0048] 3- 寄生虫 : 疟原虫

[0049] 弓形虫

[0050] 当必要时,其他的定义列于下文中。

[0051] 本发明的第一个方面是一种用于为患有严重脓毒病并至少有两个器官衰竭的个体、或者患有败血性休克并至少有两个器官衰竭的个体体外建立预后的方法,包含下述步骤:

[0052] (i) 从来自于所述个体的生物样品中,测定 S100A8 和 / 或 S100A9 和 / 或 S100A8/A9 复合物的水平,

[0053] (ii) 将所述水平和预定阈值进行比较,

[0054] 其中 S100A8 和 / 或 S100A9 和 / 或 S100A8/A9 复合物的水平超过所述预定阈值表明预后不良,而 S100A8 和 / 或 S100A9 和 / 或 S100A8/A9 复合物水平低于所述预定阈值则表明预后良好。

[0055] 当然,取决于被测定对象的种类 (S100A8 和 / 或 S100A9 和 / 或 S100A8/A9 复合物), 阈值将被预定为相同。在一个优选的实施方式中, S100A8/A9 复合物的水平被单独地测定、或者和游离的 S100A8 一起测定。可供选择地,测定总的 S100A9 (游离的 S100A9 和在 S100A8/A9 复合物中的 S100A9) 水平。在下文中,“S100A8/A9” 将被用于代表 S100A8、S100A9、S100A8/A9 复合物或者它们的组合中的一个种类。

[0056] 根据这个方法中一个特定的实施方式,在第二器官衰竭开始后的第 0 天、第 1 天或者第 2 天收集在步骤 (i) 中使用的生物样品,以便建立一种早期预后。在建立早期预后的一个优选实施方式中,在第 0 天收集所述生物样品。然而,本发明人证明,在第二器官衰竭开始后的四个星期期间的任何日子, S100A8/A9 保持可靠的预后症状 (实施例 2)。因此,本发明的方法也可以用在第二器官衰竭开始后第 2 天和第 28 天之间的任何日期收集的样品进行试验。

[0057] 所述生物样品可以是比如选自血浆、唾液、尿液、脑脊液、胸膜液和腹膜液。

[0058] 当进行上述方法时,通过测定患有严重脓毒病并至少有两个器官衰竭或者患有败血性休克并至少有两个器官衰竭的个体代表组中的 S100A8/A9 水平,预先确定所认为的阈值,并且对于这些个体结局是已知的。计算阈值以便获得死亡风险的最佳预见性 (灵敏性和特异性)。比如,当使用与试验部分所描述的技术相似的技术来测定血浆中的 S100A8/A9 水平时,可以认为预定阈值是 7-9  $\mu\text{g/ml}$ , 优选 7.8-8.3  $\mu\text{g/ml}$  和例如 8.1  $\mu\text{g/ml}$ 。在用于本研究的第一组中,导致第 0 天和第 1 天预后 (死亡风险) 灵敏性和特异性的 S100A8/A9 复合物水平是 100%, 被认为是阈值 (实施例 1)。然后确定阈值的相关性,用于建立在第二器官衰竭开始后的预后后期 (实施例 2)。当然,本领域的技术人员能够自由地在较大群的病人上重新评估这个阈值,并且通过使用任何种类的技术来测定 S100A8/A9 水平。本领域的技术人员也可以细化阈值用于特定的亚群,这取决于脓毒病的类型 (器官衰竭的数目和类型、脓毒病的来源 (肺、腹部等)、病因 (病原体等)、或者任何其它关于病人或者他们病理的参数 (病人的年龄、相关的治疗、具体的免疫抑制药物、并发症类型等)。实际上,在没有休克的严重脓毒病病人的小组中得到的数据 (参见下面实施例 4) 建议,根据本发明实施该方法用于这类病人的合适阈值可以稍微超过 8.1  $\mu\text{g/l}$ , 比如 8.4 和 9.5 或者 10  $\mu\text{g/l}$  之间。

[0059] 在一个特定的实施方式中,通过免疫测定,比如通过使用可特异性地结合 S100A8/A9 复合物的抗体,完成了步骤 (i) 中进行的测定。特异性地结合 S100A8/A9 复合物 (也称为 MRP8/14 复合物) 的抗体的一些例子已经在文献比如 Ikemoto 等人 (Ikemoto 等人, 2003) 中有描述。当然,可供选择的技术可以被用于定量所述生物样品中的 S100A8/A9 复合物,比如通过 Roth 等人所描述的技术 (Roth 等人, 1993)。本领域的技术人员也可以使用任何可与 S100A8/A9 复合物特异性结合的分子代替与 S100A8/A9 复合物特异性结合的抗体,比如抗体片段或者特定设计的适配体。适配体是单链核酸分子 (DNA 或者 RNA), 由于它们与靶分子结合的能力而被体外选择; 这种选择可以通过如 US 5270163 所描述的 SELEX 方法 (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, 指数级富集的配体系统进化) 进行。此外,本领域的技术人员可以使用人的 S100A8/A9 复合物的晶体结构来得到可与所述复合物特异性结合的分子 (Korndorfer 等人, 2007)。在本发明的上下文中,可以使用可识别除 S100A8/A9 复合物之外的游离 S100A8 或者游离 S100A9 的抗体或者其他结合分子、或者可特异性地识别 S100A8 或者 S100A9 的游离形式的抗体或者其他结合分子,如果这些分子使得根据它们的结果能够确定区分病人的阈值的话。

[0060] 根据本发明实施方法的特定的免疫测定是酶联免疫吸附 (ELISA) 测定,例如下面实验部分所描述的测定法。可供选择地,可以使用荧光标记抗体,比如用于进行流量血细胞计数。当然,本领域的技术人员可以根据本发明选择任何其它免疫测定用于实施该方法。

[0061] 可供选择地,可使用不同于免疫测定法的技术来实施根据本发明的方法。尤其是,优选地可以使用质谱分析来达到该目的。

[0062] 如果必要,本领域的技术人员可以结合一些标记物用于建立至少有两个器官衰竭的脓毒病或者败血性休克情况下的预后。在可以与 S100A8/A9 富集物组合使用的标记物当中,可以引用降钙素原 (PCT)、N 末端脑钠肽前体 (BNP)、可溶性髓系细胞触发受体 -1 (sTREM)、IL-6 和 sRAGE, 并且可以引用与脓毒病相关的器官衰竭 (SOFA) 分数、循环单核细胞上的 HLA-DR 水平、SAPS II 分数等等。因此,本发明也涉及如上所述的方法,其进一步包含测定来自于所述病人的生物样品 (该生物样品与其中测定 S100A8/A9 浓度的生物样品相同,或者另一个适当的生物样品) 中至少一个其它种类水平的步骤,和比较所述水平和预定阈值的步骤。此处,应理解术语“种类”是指任何可以被作为标记物使用的成分、分子或者复合物。在一个特定的实施方式中,在相同生物样品中如同测定 S100A8/A9 那样来测定所述其它种类,并且所述其它种类从降钙素原 (PCT)、N 末端脑钠肽前体 (BNP)、可溶性髓系细胞触发受体 -1 (sTREM)、IL-6 和 sRAGE 中选择。

[0063] 根据本发明的另一方面,本发明涉及一种用于对患有严重脓毒病并至少有两个器官衰竭或者患有败血性休克并至少有两个器官衰竭的病人进行跟踪的方法,其通过测定所述病人的 S100A8/A9 复合物的血浆水平的发展而进行,其中所述水平减少表明所述病人正在恢复。根据这个方法,如果病人在第 0 天的 S100A8/A9 水平超出上述的预定阈值,并且如果所述水平仍然超出阈值,则表明该病人有很大的死亡可能性。

[0064] 根据本发明的另一个方法的目的在于对患有严重脓毒病并至少有两个器官衰竭或者患有败血性休克并至少有两个器官衰竭的病人进行跟踪,其通过测定所述病人的 S100A8 和 / 或 S100A9 的表达水平的发展而进行,其中所述水平减少表明所述病人正在恢复。这个方法已经被 D. Payen 等人的出版物说明,该出版物并入此文以供参考 (Payen 等人,

2008)。当实施这个方法时，S100A8 和 / 或 S100A9 的表达水平优选定量扩增法进行测定，比如上述 Payen 等人所描述的定量 RT-PCR。

[0065] 在上述跟踪方法中，(S100A8/A9 复合物的或者 S100A8 或 S100A9 表达的) 测定是在收纳病人后的几个时间点比如第一个星期期间的每一天，然后在来自所述病人的生物样品上以相同的频率或者较低的频率进行的，这取决于临床背景。

[0066] 根据另一个方面，本发明涉及一种用于帮助决定病人退出治疗的方法，所述病人患有严重脓毒病并至少有两个器官衰竭、或者患有败血性休克并至少有两个器官衰竭，所述方法包括下述步骤：

[0067] (i) 通过如权利要求 1 所述的方法，建立所述病人的预后（在第二器官衰竭开始之后尽可能快）；

[0068] (ii) 在数天（比如 2 周）治疗后测定来自于所述病人的生物样品中的 S100A8/A9 水平；

[0069] 其中如果观察到 S100A8/A9 的水平没有减少，以及如果所述临床状况仍然严重，则可决定停止治疗。当实施这个方法时，如果病人仍然有两个以上的器官衰竭，医生将会认为临床状况仍然严重。如果步骤 (i) 中测定的 S100A8/A9 水平超出上述阈值、并且在数天治疗之后仍然超出这个阈值，尤其可决定停止治疗。

[0070] 因为本发明提供可靠的预后标记物用于非常严重的情况（即至少有两个器官衰竭的严重脓毒病或者至少有两个器官衰竭的败血性休克）的病人，这个预后标记物可用于更好地选择被招募进入临床试验的个体，用于试验新的治疗方法，目的在于或者提高在病人离开重病监护室前加强支持的持续时间、或者改进这些病理学结果。

[0071] 在第一个情况中，被招募的病人是那些具有预后良好的病人，以便避免涉及“绝望”病人的噪音。因此，本发明也涉及用于确定是否将至少有两个器官衰竭的非常严重状况中的个体招募进入临床试验的方法，该临床试验用于评估为这种病人缩减加强支持需要的药物治疗的有效性，其中所述方法包含通过上述方法建立所述个体预后的步骤，并且其中如果 S100A8/A9 的测定水平低于预定阈值，则招募所述病人。

[0072] 相反，具有不良预后的病人将被招募进入试验中，该试验用于评估新的用于改善至少有两个器官衰竭的非常严重状况的结局的治疗手段，以便使得可能具有严重副作用的药物不会被给予假设通过“经典的”复苏方案就能恢复的病人，并且使得该结果不包含噪音，所述噪音与即使没有这个新的药物或者治疗手段也能恢复的病人有关。因此，本发明也涉及一种用于确定是否将患有严重脓毒病并至少有两个器官衰竭或者患有败血性休克并至少有两个器官衰竭的个体招募进入临床试验的方法，该临床试验用于评估用于改善这种病人结局的药物治疗的有效性，包含通过上述方法建立用于所述个体预后的步骤，其中如果测定的 S100A8/A9 水平超出预定阈值，则所述个体入选。

[0073] 作为上述方法的必然结果，本发明也涉及一种用于检测用于改善至少有两个器官衰竭的严重综合症结局的药物治疗有效性的方法，包括下述步骤：

[0074] (i) 选择患有严重脓毒病并至少有两个器官衰竭或者患有败血性休克并至少有两个器官衰竭的病人，并且在开始所述药物治疗之前，测定来自于所述病人的生物样品中的 S100A8/A9 水平；

[0075] (ii) 从来自于开始所述药物治疗之后的所述病人的至少另一个样品中，测定

S100A8/A9 的水平；

[0076] (iii) 比较所述得到的数值；

[0077] 其中药物治疗开始后 S100A8/A9 水平的减少表明所述治疗对病人是有益的，并且有可能改善至少有两个器官衰竭的严重综合症的结局。

[0078] 在上述方法的一个优选实施方式中，在第二器官衰竭开始后的第 0 天实施步骤 (i)，并且入选的病人具有的 S100A8/A9 水平优选超出上述预定阈值。在后来的情况中，如果 S100A8/A9 复合物水平降低至低于所述阈值，则新的创新治疗被认为是有益于病人，并且很可能改善了至少有两个器官衰竭的严重的综合症的结局。

[0079] 在测定 S100A8 和 / 或 S100A9 的表达水平、而不是测定 S100A8/A9 复合物水平（或者除 S100A8/A9 复合物水平之外还进行前述测定）的基础上，本领域的技术人员可以随着对病人的跟踪而改变这个方法用于实施。如同下面实施例 3 中所描述的那样，S100A9 表达水平比 S100A8 表达水平更适合实现这个目的。

[0080] 本发明的另一个方面是一种以 S100A8/A9 测定为基础的用于实施上述任何方法的试剂盒，包含：可与 S100A8/A9 特异性地结合的分子和 / 或可与 S100A8 或者 S100A9（或者具体是它们的游离形式，或者它们两者呈游离形式、以及呈 S100A8/A9 复合物形式）特异性地结合的分子，以及解释关于严重脓毒病和败血性休克（特别是具有两个器官衰竭）结果的 S100A8/A9 血浆水平预测值的使用注意事项。在所述试剂盒的一个优选实施方式中，所述分子可与 S100A8/A9 复合物结合。本领域的技术人员可以选择任何种类的特异性结合物，例如抗体、抗体片段、适配体、糖类等等，如果这个结合物可用于测定来自病人的适当生物样品中的 S100A8/A9 水平，则可将其放入此试剂盒中。在一个优选的实施方式中，注意事项也提供用于测定生物样品（比如血浆样品）中 S100A8/A9 水平的方案说明书、以及水平超出可指示病人不良预后的阈值指征。在进一步优选的实施方式中，在注意事项中显示与阈值有关的关于用试剂盒进行的试验灵敏性和特异性的信息。

[0081] 当然，根据本发明，试剂盒也可以包含在用于进行免疫测定的试剂（缓冲剂、酶、标记分子等等）中选择的其它成分、质量对照、一种以上校准品等等。

[0082] 在本发明的范围内，在说明书中和随后已经进行的生物实验中，提供了所需的实验支持，本发明的其它特征将会很明显，并且没有限制其范围。

## 实施例

[0083] 实施例 1：血浆 S100A8/A9 复合物作为败血性休克的早期预后标志物的多中心评价

[0084] 材料和方法

[0085] 以下报道的所有实验都是使用下述材料和方法完成的。

[0086] 病人

[0087] 这项多中心研究经过 Cochin 医院伦理委员会 (#CCPPRB 2061) 的批准，病人从 4 个加护病房中招募（两个内科，两个外科）。只有符合 ACCP/SCCM 共同会议 (Bone 等人, 1992 年) 所定义的败血性休克标准的病人才会被选中。入选标准要求败血性休克的病人至少有两个 SOFA 所定义的器官衰竭 (Vincent 等人, 1998 年)。第一份血样在第 0 天 (D0) 被采集，第 0 天的定义就是发生第二器官衰竭后的 24 小时内。

[0088] 训练组招募的这些人满足入选标准,从这些人中取得血样用于测定 S100A8/A9 复合物的基因表达和血浆水平。人数由计算得到的统计功效而定。在第 1 天 (D1) 采集第二样品以检测标记物的稳定性。

[0089] 实验组的样品是在伦理委员会批准后从满足相同入选标准的病人中获得的,这些病人是在相同时期 (2004 年 2 月到 2005 年 11 月) 被入选进入严重脓毒病多中心研究中 (Programme Hospitalier de Recherche Clinique n° AOR 02006)。这个组是用来验证在第 0 天从训练组采集的 S100A8/A9 的血浆复合物的预测能力。

[0090] 流式细胞仪用于单核细胞 HLA-DR 表达测定:

[0091] 全血与连接了荧光染料 (异硫氰酸荧光素 (FITC) 或藻红蛋白 (PE)) 的下述合适抗体一起温育:抗 CD14-FITC (克隆 RM052, 贝克曼考尔特, 马赛, 法国) 并且连结了不相关的同型对照抗体的 PE (Simultest 对照, BD Biosciences, 圣何塞, 加州, 美国) 或抗 HLA-DR-PE (克隆 L243, BD Biosciences)。通过使用 QFCM (定量流式细胞术), 将平均荧光强度转换成每个细胞连接的抗体 (AB/C) 数。

[0092] 血浆细胞因子测定:

[0093] 血浆 IL-10 (optEIA™ set; PharMingen, 圣地亚哥, 加州, 美国)、IL-12p40 和 MIF (R&D Systems, Abingdon, Oxon, 英国) 的浓度是根据厂商说明书通过免疫酶法 (ELISA) 测定的。标准样品的范围对于 IL-10 是 7.8-500pg/ml, 对于 IL-12p40 和 MIF 是 31.2-2000pg/ml。检测阈值: 对于 IL-10 是  $2.7 \pm 3.1$  pg/ml, 对于 IL-12p40 是  $25.8 \pm 33.3$  pg/ml, 对于 MIF 是  $25.7 \pm 34.6$  pg/ml。

[0094] 血浆 S100A8/A9 复合物水平

[0095] 该技术是从以前的公布 (Ikemoto 等人, 2003) 中改编的: 使用从 34 名健康个体身上采集的血样, 个体以年龄和性别配对。平均  $0.26 \mu\text{g/ml}$  的水平, 其范围在  $0.052-0.468 \mu\text{g/ml}$ 。简单地说, 将  $100 \mu\text{l}$  的稀释液加入到覆盖有第一抗体的 96 孔聚碳酸酯板的每一个孔中 (Mo2B9;  $0.166\text{mg/L}$ )。血浆样品先用工作 Block-Ace™ (大日本医药有限公司) 溶液或 MRP8/14 复合物校准溶液稀释, 再被加入并混合 15 秒。然后板子温育 1 小时使得免疫反应进行。经过 5 次洗涤, 加入  $100 \mu\text{l}$  的 F(ab')<sub>2</sub>-生物素结合物 (含  $0.5\text{g/L}$  硫柳汞的工作 Block-Ace™ 溶液中的第二抗体 Mo3D2), 孔板再温育 1 小时。经过上述的重复洗涤, 将  $100 \mu\text{l}$  用工作 Block-Ace 液稀释了 1500 倍的链亲合素-HRP 结合物加入其中, 孔板进一步温育 30 分钟。通过比色法测定 HRP 活性。批内变异系数 (CVs) 是 3.9-5.6%, 日间变异系数是 5.9-7.6%, 平均恢复率为 98% (范围是 85-103%)。试验是由不知情临床结局的研究员进行的。

[0096] 通过定量 RT-PCR 测定 S100A8-A9 的基因表达

[0097] RNA 样品是在第 0 天 (D0) 和第 1 天 (D1) 通过 Ficoll 梯度离心法将成熟的 PMN 除去后得到的。为了评估未成熟细胞 (粒细胞系) 的比例, 细胞分析包括了通过光散射和 CD66 表达 (流式细胞分析仪) 得到的形态特征 (Payen 等人, 2008)。在第 0 天和第 1 天, 外周血单核细胞 (PBMC) 的比例大约是 50%。用 Rneasy 试剂盒 (Qiagen) 提取总的 RNA, 样品用无 RNA 酶的 DNA 酶 I 处理。在安捷伦的生物分析仪上估计质量和数量, 并且在 Nanodrop 分光光度计上确认总的 RNA 数量。根据厂商 (应用生物系统公司, Foster City, 加州, 美国, 表 1) 说明书, 对 S100A8 (Hs00374264\_g1) 和 S100A9 (Hs00610058\_ml) 进行 qRT-PCR,

并与内部对照真核 18S rRNA(Hs99999901\_s1) 进行比较。结果用  $\Delta Ct$  (浓度阈值) 表示: CtS100Ax-Ct18S。

[0098] 表 1:用于实时 PCR 的基因表达试验的特征。

[0099]

| 基因符号          | 基因名称          | NCBI 基因号    | 试验 ID         |
|---------------|---------------|-------------|---------------|
| 18S           | 真核 18S rRNA   | X03205.1    | Hs99999901_s1 |
| S100A8, MRP8  | S100 钙结合蛋白 A8 | NM_002964.3 | Hs00374264_g1 |
| S100A9, MRP14 | S100 钙结合蛋白 A9 | NM_002965.3 | Hs00610058_m1 |

[0100] 试验由应用生物系统公司设计并分配。

[0101] 统计

[0102] 定量的结果表示为中值和第 25- 第 75 百分位数。用曼惠特尼检验进行数量变量的比较,用卡方检验进行定性变量。用斯皮尔曼相关性检验进行相关性研究。P 值 < 0.05 在统计学上被认为是显著的。基于以前在人类败血性休克上公布的数据 (Payen 等人, 2008 年), 发明人假定败血性休克病人的死亡率为 40% (Annane 等人, 2007 年; Sprung 等人, 2008 年), S100A8/A9 复合物在存活者和未存活者之间的差异为  $2 \mu\text{g/ml}$ , 标准误差为 2.35 (payen 等人, 2008 年)。因此, 训练组需要招募 47 个病人的样品规模, 控制 I 型误差概率为 0.05, 把握度 (power) 为 0.80。

[0103] S100A8/A9 复合物血浆水平的预后性能是通过计算 ROC 曲线下的面积 (AUC) 确定的。因为训练组中观察到的灵敏度和特异性数值, 并且考虑到相对较小的样本规模, 发明人给出了基于拉普拉斯方法 (Agresti and Coull, 1998) 的对灵敏性和特异性的评估。为了验证这些结果, 研究了使用同样的入选标准的第二独立组的病人 (实验组)。对两个组的主要特征进行了比较, 进行了 S100A8/A9 复合物的预后分析, 包括对 AUC 的估计和基于训练组 S100A8/A9 阈值的灵敏度和特异性。

[0104] 在 SAS9.1 (SAS Inc, Cary, NC) 及 R2.8.0 (<http://www.R-project.org>) 软件包上进行数据分析。

[0105] 结果

[0106] 训练组

[0107] 有 49 位病人入选, 他们的临床特征被总结在下面表 2 中, 其下面是脓毒病救治指南 (Dellinger 等人, 2004 年)。9 位病人 (18%) 接受了活化蛋白 C 治疗, 同时 35 位病人 (71%) 用氢化可的松治疗。31 位病人在前两天内接受了手术。15 位病人在 28 天的研究期间内死亡, 有 12 位在第一个 7 天内死亡。3 位病人在 7 天后死亡 (一个在第 24 天, 两个在第 26 天), 这的确是由于不可治疗的呼吸衰竭和严重血氧过少、延迟的多个器官衰竭以及垂死状况的强制治疗限制。在第 0 天, 在存活者和未存活者之间, SAPSII 的临床严重度评分标准不同, 而 SOFA 分数则是相似的 (表 2)。

[0108] 表 2:训练组第 0 天的临床特征、脓毒病类型、心血管支持

[0109]

| 中值 (第 25-第 75 百分位数)                          | 总人数 n=49       | 存活者 n=34      | 未存活者 n=15     | P       |
|--|----------------|---------------|---------------|---------|
| 年龄 (年轻/年长 y/o)                               | 64 (51-75)     | 62 (50-68)    | 75 (67-84)    | 0.0040  |
| 性别 男/女                                       | 34/15          | 24/10         | 10/5          | 不显著     |
| SAPSI  | 57 (43-63)     | 52 (42-60)    | 70 (62-81)    | <0.0001 |
| SOFA 第 0 天                                   | 10 (8-12)      | 10 (8-11)     | 11 (9-13)     | 不显著     |
| 器官衰竭数  | 3 (3-4)        | 3 (3-4)       | 4 (3-5)       | 0.0215  |
| 手术后  | 31/18          | 21/13         | 10/5          | 不显著     |
| 感染位置:  |                |               |               |         |
| 胸部   | 10             | 7             | 3             |         |
| 腹部   | 24             | 15            | 9             |         |
| 泌尿道  | 7              | 6             | 1             |         |
| 中枢神经系统 CNS                                   | 1              | 0             | 1             |         |
| 边缘神经系统                                       | 7              | 6             | 1             |         |
| 治疗:  |                |               |               |         |
| 儿茶酚胺类( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ): |                |               |               |         |
| •去甲肾上腺素 (n=46)                               | 0.4 (0.2-0.6)  | 0.3 (0.1-0.5) | 0.6 (0.4-1.3) | 0.0051  |
| •肾上腺素 (n=9)                                  | 0.2 (0.1-0.9)  | 0.4 (0.1-0.8) | 0.2 (0.1-1.0) | 不显著     |
| •多巴酚丁胺 (n=7)                                 | 10.0(6.3-18.8) | 5 (5-5)       | 15 (10-20)    | 0.0528  |
| •多巴胺 (n=1)                                   | 10 (0)         | 10 (0)        | -             | -       |
| 用氢化可的松治疗 (n)                                 | 35             | 21            | 14            |         |
| 用活化蛋白 C 治疗 (n)                               | 9              | 4             | 5             |         |

[0110] 血液炎症介质的结果总结在表 3 中。在第 0 天存活者和未存活者之间的 IL-12p40 血浆水平或者 HLA-DR 单核细胞的表达都没有差异。在最终死亡的病人中血浆 IL-10 和 MIF 水平显著地较高 (分别是:  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ), 然而两组之间的值有较大的重叠。

[0111] 表 3: 训练组中第 0 天血浆细胞因子和 MIF 水平, 以及 HLA-DR 单核细胞的表达。

[0112]

| 中值 (第 25-第 75 百分位数) | 总人数 n=49         | 存活者 n=34         | 未存活者 n=15         | p      |
|---------------------|------------------|------------------|-------------------|--------|
| HLA-DR (AB/C)       | 2797 (1441-4538) | 2826 (1410-5093) | 2762 (1485-4307)  | 不显著    |
| IL-10 (pg/ml)       | 150 (66-478)     | 128 (40-269)     | 326 (133-653)     | 0.0156 |
| IL-12p40 (pg/ml)    | 15 (0-43)        | 20 (0-50)        | 12 (0-34)         | 不显著    |
| MIF (pg/ml)         | 2118 (955-9163)  | 1460 (713-3746)  | 9049 (2795-20284) | 0.0055 |

[0113] MIF: 巨噬细胞移动抑制因子。

[0114] S100A8/A9 复合物血浆蛋白和 mRNA 水平

[0115] 在第 0 天, S100A8/A9 复合物血浆水平在最终存活者和未存活者之间有显著性差异 ( $3.7 \mu\text{g}/\text{ml}$  (3.2-4.2) 对比  $13.3 \mu\text{g}/\text{ml}$  (10.1-15.6),  $p < 0.0001$ )。两组之间无重叠。在第 1 天也观察到相似的结果 (图 1)。结果是, 得到特异性和灵敏度为 100%, 有死亡风险的阈值血浆水平为  $8.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。对一个特异性为 97.2% (95% 置信区间: 92.6% - 100%) 的

值,拉普拉斯估计其灵敏度为 94.1% (95%置信区间:84.7% -100%)。重要的是,这并不受在第 0 天测定的器官衰竭数目的影响。相似的血浆水平在那些有两个器官衰竭 [3.5  $\mu$ g/ml, IQ 1.4(n = 8)] 或两个以上器官衰竭 [3.7  $\mu$ g/ml, IQ 0.9(n = 25)] 的病人中可以看到。

[0116] 第 0 天以后在接受 aPC(活化蛋白 C) 的 9 位病人 (18%) 中,5 位存活(第 0 天水平:3.4g/ml;IQR 1.1),4 位死亡(第 0 天水平:15.7g/ml;IQR 3.6)。同样,在随后使用皮质甾类治疗的病人 (35 位) 中,存活者第 0 天的水平为 3.7g/ml (IQR 1.0) 相对最终未存活者的水平为 13.8g/ml (IQR 5.6)。在最终未存活者中,对儿茶酚胺类(去甲肾上腺素和多巴酚丁胺)的剂量要求更高 ( $p < 0.01$ ) (表 1)。

[0117] S100A8 和 S100A9 基因在 PBMC 和未成熟细胞中的 mRNA 水平,在第 0 天或第 1 天,在存活者和未存活者之间没有区别。(图 2A 和 2B)。S100A8 和 S100A9 的基因表达相关性很好(第 0 天  $r = 0.81$ ,第 1 天  $r = 0.87$ , $p < 0.0001$ ,图 3),然而并没有看到血浆 S100A8/A9 复合物水平在第 0 天和第 1 天的相关性(没有显示数据)。

[0118] 试验组

[0119] 满足相同入选标准的 62 位病人的样品被研究。根据结局,临床特征和炎症变量表示在表 4 和表 5 中。临床的变量与训练组是可比的,除了到 28 天明显高很多 (56.5% 比上 30.6%; $p = 0.01$ ) 的死亡率(表 6) 以外。在试验组中,HLA-DR 的表达和血浆 MIF 的水平相似,但 IL-10 值要低一些 ( $p < 0.05$ )。与第一个组一样,S100A8/A9 复合物血浆水平在最终存活者 [5.3  $\mu$ g/ml (4.43-6.43)] 和未存活者 [12.5  $\mu$ g/ml (10.23-14.08)]  $p < 0.0001$  之间存在明显差异。AUC 值为 0.99,血浆阈值为 8.1  $\mu$ g/ml,它是由训练组区分存活者和未存活者的灵敏性和特异性(分别为 94.3% 和 100%) (拉普拉斯估计为 96.55%) 得来的。只有两个病人被错误地分类,他们的血浆 S100A8/A9 复合物值显示为很好的预后,然而他们在 3 周之后,由于他们有肝硬化的背景而死于代谢失调的肝功能衰竭。在训练组中,器官衰竭数和 aPC 及氢化可的松的治疗对血浆 S100A8/A9 水平的预后都没有影响(没有显示数据)。

[0120] 两组人数共有 111 位病人,在第 0 天有相似的严重性。在总人数中,计算得到的用于预测结局的 S100A8/A9 血浆水平的阈值与训练组计算得到的值 (8.1  $\mu$ g/ml) 相同。

[0121] 表 4:试验组第 0 天的临床特征、脓毒病类型、以及心血管支持

[0122]

| 中值 (第 25-第 75 百分位数)                           | 总人数<br>n=62      | 存活者<br>n=27     | 未存活者<br>n=35     | P 值 |
|---|------------------|-----------------|------------------|-----|
| 年龄 (年轻/年老)                                    | 63 (53-77)       | 67 (57-78)      | 59 (50-69)       | 不显著 |
| 性别 (男/女)                                      | 36/26            | 13/14           | 23/12            | 不显著 |
| SAPSII  | 51 (42-64)       | 50 (41-59)      | 53 (43-67)       | 不显著 |
| SOFA 第 0 天                                    | 10 (8-12)        | 9 (8-12)        | 10 (9-13)        | 不显著 |
| 没有器官衰竭  | 3 (3-4)          | 3 (3-4)         | 3 (3-4)          | 不显著 |
| 手术后   | 17/45            | 10/17           | 7/28             | 不显著 |
| 感染部位:   |                  |                 |                  |     |
| •胸部   | 33               | 15              | 18               |     |
| •腹部   | 11               | 3               | 8                |     |
| •泌尿道  | 4                | 2               | 2                |     |
| •中枢神经系统 CNS                                   | 3                | 1               | 2                |     |
| •边缘神经系统                                       | 11               | 6               | 5                |     |
| 治疗:   |                  |                 |                  |     |
| 儿茶酚胺类 ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ): |                  |                 |                  |     |
| •去甲肾上腺素 (n=52)                                | 0.45 (0.27-1.04) | 0.47(0.31-0.92) | 0.43 (0.24-1.20) | 不显著 |
| •肾上腺素 (n=19)                                  | 0.48 (0.23-1.40) | 0.4 (0.32-0.57) | 0.78 (0.20-1.60) | 不显著 |
| •多巴酚丁胺(n=20)                                  | 10 (5-20)        | 10 (9-15)       | 10 (7.5-20)      | 不显著 |
| •多巴胺(n=7)                                     | 12 (10-20)       | 19              | 20 (14-20)       |     |
| 氢化可的松 (n)                                     | 42               | 1               | 23               |     |
| 活化蛋白 C (n)                                    | 5                |                 | 4                |     |

[0123] 表 5:在试验组中第 0 天血浆细胞因子的水平和 HLA-DR 的单核细胞表达。

[0124]

| 中值 (第 25-第 75 百分位数) | 总人数<br>(n=62)    | 存活的<br>(n=27)    | 死亡的<br>(n=35)    | P 值  |
|---------------------|------------------|------------------|------------------|------|
| HLA-DR (AB/C)       | 2952 (1714-5138) | 2546 (1778-4795) | 3458 (1595-5684) | 不显著  |
| IL-10 (pg/ml)       | 85 (16-292)      | 42 (14-110)      | 136 (22-558)     | 0.05 |
| IL-12p40 (pg/ml)    | 0 (0-8)          | 0 (0-5)          | 0 (0-39)         | 不显著  |
| MIF (pg/ml)         | 2020 (1075-5360) | 2287 (1099-6104) | 1941 (1006-3945) | 不显著  |

[0125] MIF :巨噬细胞移动抑制因子。

[0126] 表 6 :训练组和试验组病人的主要特征比较。

[0127]

| 中值 (第 25-第 75 百分位数) | 训练组<br>n=49      | 试验组<br>n=62      | P      |
|---------------------|------------------|------------------|--------|
| 年龄 (年轻/年老)          | 64 (51-75)       | 63 (53-77)       | 不显著    |
| 性别 (男/女)            | 34/15            | 36/26            | 不显著    |
| SAPSII              | 57 (43-63)       | 51 (42-64)       | 不显著    |
| SOFA 第 0 天          | 10 (8-12)        | 10 (8-12)        | 不显著    |
| 没有器官衰竭              | 3 (3-4)          | 3 (3-4)          | 不显著    |
| 手术后                 | 31 (63%)         | 17 (27%)         |        |
| 感染部位:               |                  |                  |        |
| 胸部                  | 10               | 33               |        |
| 腹部                  | 24               | 11               |        |
| 泌尿道                 | 7                | 4                |        |
| 中枢神经系统 CNS          | 1                | 3                |        |
| 边缘神经系统              | 7                | 11               |        |
| HLA-DR (AB/C)       | 2797 (1441-4538) | 2952 (1714-5138) | 不显著    |
| IL-10 (pg/ml)       | 150 (66-478)     | 85 (16-292)      | 0.0382 |
| MIF (pg/ml)         | 2118 (955-9163)  | 2020 (1075-5360) | 不显著    |
| 并发症                 |                  |                  |        |
| 转移癌                 | 10               | 4                |        |
| 恶性血液病               | 0                | 9                |        |
| 移植                  | 1                | 4                |        |

[0128] 讨论:

[0129] 我们发现 S100A8/A9 复合物血浆水平是对败血性休克病人结局的很好的预报物,即使很早比如在第二器官发生衰竭的第 1 天采集也是如此。这与第 0 天发生的器官衰竭数和后来使用活化蛋白 C 或皮质甾类无关。至少在头两天,8.1  $\mu\text{g/ml}$  的死亡预测性阈值保持稳定。在 49 名病人的训练组中得到的阈值的有效性随后在 62 名病人的试验组中得到确认。血浆蛋白水平的差异与外周血白细胞上的 S100A8 和 S100A9 基因的表达并无相关性,这表明至少在该初期阶段,这种复合物的来源不是循环免疫细胞。

[0130] 理想的败血性休克的预后标记物,必须对结局预测具有特异性和灵敏性,能应用于广大人群,在临床解释的足够长的持续时间 (1-2 天) 内稳定,在血浆中容易被检测,全部依赖于结局、但是可以被随后的有效治疗所调节,并且相对不昂贵。虽然规模有限,上述的结局是令人鼓舞的,因为在入选时间训练组和试验组包括的内科和外科病人具有标准化的严重性。存活的脓毒病病人的血浆水平与以前在炎症性急性关节炎病人中得到的结局相符 (de Seny 等人,2008 年,Foell 等人,2004 年,Sampson 等人,2002 年)。据我们所知,只有在肾移植急性排斥反应中才报道过与那些未存活者中发现的相类似的血浆水平 (Jung 等人,2008 年)。

[0131] 得到一个可靠的、早期的、灵敏的且特异性的败血性休克预后的可行性将提供一些重要的优势。这些优势包括未来做临床试验时可以更好地选择入选的病人,由此将重点放在有较好预后的病人身上,可以加快解决问题的速度并延长器官衰竭。同时死亡状况得到改善 (有长时间的较好生活质量),这构成预后的未存活者的主要目标。对个体病人来说,这可以避免无益的治疗延长以便减轻不必要的痛苦,并使昂贵且有限的重症监护资源和治疗得到更有效的利用。重要的是,在我们的研究中,后来使用的活化蛋白 C 和 / 或氢化

可的松并不能影响预后的结局。这也突出了围绕着这两种免疫调节剂的关于病人选择、给药最佳时间和剂量的争论 (Dellinger 等人, 2008 年)。此外, 因为 S100A8/A9 蛋白在败血性休克的病理生理学中扮演了机制性的作用 (Foe11 等人, 2007 年, Vogl 等人, 2007 年), 新的用于阻断这个系统的药物可以被有效地开发。

[0132] 被研究的人群在严重性方面是相同的, 通过临床或者通过使用炎症的血浆标记物 (除了 MIF 以外), 最终的存活者和未存活者在第 0 天是不能被区分的。虽然我们并没有直接比较 S100A8/A9 蛋白水平与一些已被认可的脓毒病 / 炎症的生物标记物的预后能力, 但是有一篇文献综述表明了前者的优越性。例如: 血浆原降钙素的水平在脓毒病未存活者中比在存活者中高很多, 灵敏度为 87.5% 而特异性为 45% (Clec'h 等人, 2004 年)。这同样适用于 IL-6 (一种败血性休克的全身性炎症的严重性标志物) (Abraham 等人, 2001)、HLA-DR 在循环单核细胞上的表达 (Monneret 等人, 2006 年)、以及在严重脓毒病或败血性休克的头 3 天中测定的脑利钠肽 (Varpula 等人, 2007 年)。脓毒病病人中可溶性 TREM-1 的血浆水平 (Gibot 等人, 2005) 对结局的预测有一个相对低的灵敏度, 因此排除了它作为预后标志物的用途。最近, Scherpereel 等人报道了 Endocan (一种循环的蛋白聚糖) 的血浆水平在脓毒病存活者和未存活者之间有很大的重叠 (Scherpereel et al., 2006)。在脓毒病未存活者身上血浆 sRAGE 也被发现较高, 特异性 75%, 灵敏度 84.6% (Bopp 等人, 2008 年)。

[0133] 迄今为止, S100 蛋白家族的超过 20 个成员已被描述 (Ravasi 等人, 2004)。有 3 个 (S100A8、A9、A12) 特异性地与先天免疫功能有关。S100A8 和 S100A9 在粒细胞、单核细胞和早期分化阶段的巨噬细胞中都有发现 (Foe11 等人, 2007 年)。相比之下, S100A12 (EN-RAGE, 细胞外最近被识别的 RAGE 结合蛋白) 似乎更受限与粒细胞 (Vogl 等人, 1999 年), 在最近的研究中, 缺乏 S100A8-A9 复合物的老鼠可以免于大肠杆菌和内毒素诱导的致命性休克的危险 (Vogl 等人, 2007 年)。S100A8/A9 复合物增强了噬菌细胞的反应, 包括髓样细胞分化主要反应蛋白 (MyD)-88 的细胞内转位, 白介素 -1 受体相关激酶 (IRAK)-1 和核因子 (NF)- $\kappa$ B 的激活, 导致了肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的表达提高。因为 S100A8 特异性地与 TLR4-MD2 复合物作用, 它代表了一种内源性的 TLR4 配体。

[0134] 通过可选择的途径, 迂回经典高尔基体通路, 活跃地分泌这些噬菌细胞特异性的 S100 蛋白 (Rammes 等人, 1997 年)。这对作为细胞内分子在细胞动态平衡中起作用的 DAMP 相关因子是典型的, 但是由于细胞损伤、感染或炎症释放进入细胞外空间后, 会变成促炎症危险信号。这可以解释为什么在不会存活的病人中血浆水平显著更高, 表明了一个更严重的细胞动态平衡的破坏。

[0135] S100A8 和 S100A9 的释放与从头合成无关, 并与两个基因的 mRNA 表达的下调有关 (Foe11 等人, 2007 年)。在第 0 天, 复合物 S100A8/A9 血浆水平与白细胞 S100A8 和 A9 的基因表达没有相关性, 证实了没有早期的从头合成。

[0136] 总之, 在训练组中存活者和未存活者之间检测到的区别的基础之上, S100A8/A9 复合物的区分作用, 后来被有较高死亡率的较大试验组所验证, 这就强有力地支持了这种结局预测物可被较早地使用于至少有两个器官衰竭的败血性休克病人的表现中。显然, 需要大规模的试验来评估通用性以及并发症影响。然而, 如果得到确证, 这将同时在病人的管理和新的治疗调节系统目标方面开启一个新的纪元。

[0137] 实施例 2: 在败血性休克病人中血浆 S100A8/A9 复合物水平随时间的趋势

[0138] 如同实施例 1, 对于在第 0 天和第 1 天进行的实验, 已经在 28 天内完成 (第 0、1、7、14、28 天)

[0139] 111 位病人的结果 (实施例 1 中的 49 名训练组, 62 名试验组) 显示, 存活者的血浆蛋白水平随时间下降, 但是在未存活者中没有下降 (图 5)。与对照相比较, 存活者第 28 天的血浆 S100A8/A9 仍很高 (中值  $2.65 \mu\text{g/ml}$  (IQR  $2.60$ ))。

[0140] 只有 1 位最后结局很好的病人在第 14 天时显示了惊人高的 S100A8/A9 复合物水平。在这位病人中, 第 0 天 S100A8/A9 值为  $4.7 \mu\text{g/ml}$ , 第 1 天  $4.0 \mu\text{g/ml}$ , 第 7 天  $4.5 \mu\text{g/ml}$ , 第 14 天  $20.1 \mu\text{g/ml}$ , 虽然它的发展是平稳的并且有好的最终结局 (在第 28 天前出院)。但是第 14 天的 S100A8/A9 水平没有被控制, 这个惊人的结局也许是测量假象。

[0141] 两组人都用了弗里德曼检验来研究动力学:

[0142] 对存活者, S100A8/A9 血浆 (浓度) 水平下降:

[0143] 第 0 天 - 第 28 天,  $p < 0.0001$ ,  $n = 34$

[0144] 第 0 天 - 第 14 天,  $p < 0.0001$ ,  $n = 41$

[0145] 第 0 天 - 第 7 天,  $p = 0.0005$ ,  $n = 57$

[0146] 对第 28 天前死亡的病人 S100A8/A9 血浆水平升高:

[0147] 第 0 天 - 第 14 天, 不显著

[0148] 第 0 天 - 第 7 天,  $p = 0.0010$ ,  $n = 15$ 。

[0149] 实施例 3: 败血性休克病人中 S100A8 和 S100A9 基因表达水平随时间的趋势

[0150] 图 6 和图 7 显示了在 32 位病人中 S100A8 和 S100A9 的基因表达。这些数据是从在 Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 列阵上进行的微阵列分析采集的, 使用的是与在 EP 2085486A1 中描述同样的方法。

[0151] 从第 0 天和第 7 天之间, 在存活者中, S100A8 基因表达有轻微的下降, 即使随着 28 天的过去也不显著。这种趋势在未存活者中没有观察到。S100A8 基因表达统计如下:

[0152] 存活者中的弗里德曼检验, 第 0 天 - 第 28 天,  $n = 11$ : 不显著

[0153] 第 0 天 - 第 7 天,  $n = 18$ :  $p = 0.0421$

[0154] 存活者中的威尔科克森检验, 第 0 天 - 第 1 天,  $n = 17$ : 不显著

[0155] 未存活者中的威尔科克森检验, 第 0 天 - 第 1 天,  $n = 9$ : 不显著

[0156] 曼惠特尼检验, 存活者比上未存活者: 在第 1 天显著,  $p = 0.035$ 。

[0157] 在存活者中 S100A9 基因表达随时间有所下降, 但在未存活者中不变。用于 S100A9 基因表达的统计公开如下:

[0158] 存活者中的弗里德曼检验, 第 0 天 - 第 28 天,  $n = 11$ :  $p = 0.0199$

[0159] 第 0 天 - 第 7 天,  $n = 18$ :  $p < 0.0001$

[0160] 存活者中的威尔科克森检验, 第 0 天 - 第 1 天,  $n = 17$ :  $p = 0.0019$

[0161] 未存活者中的威尔科克森检验, 第 0 天 - 第 1 天,  $n = 9$ : 不显著

[0162] 曼惠特尼检验, 存活者比上未存活者: 每次都不显著。

[0163] 实施例 4: 血浆 S100A8/A9 复合物水平作为没有休克的严重脓毒病的早期预后标记物的评价。

[0164] 第 0 天, 在 16 位非休克病人身上测定血浆 S100A8/A9 水平。这些病人患有两个器官衰竭的严重脓毒病 (与前组中器官功能障碍标准相同)。

[0165] 有 8 位在第 28 天前死亡。与存活者相比,未存活者的血浆 S100A8/A9 显著性地更高(图 8 和表 7)。

[0166] 表 7:按照状况的描述性统计分割

|       | S100_第0天, 总数 | S100_第0天, 存活 | S100_第0天, 死亡 |
|-------|--------------|--------------|--------------|
| 平均值   | 9,213        | 4,613        | 13,812       |
| 标准偏差  | 5,095        | 2,307        | 1,391        |
| 标准误差  | 1,274        | ,816         | ,492         |
| 计数    | 16           | 8            | 8            |
| 最小值   | 1,400        | 1,400        | 11,600       |
| 最大值   | 15,600       | 8,300        | 15,600       |
| # 缺少的 | 0            | 0            | 0            |
| 中值    | 9,950        | 4,550        | 13,950       |
| IQR   | 9,400        | 3,050        | 2,200        |

[0168] 曼惠特尼检验,  $p = 0.0008$ .

[0169] 只有一位幸存者表现出了高于预定的阈值  $8.1 \mu\text{g/ml}$  的水平 ( $8.3 \mu\text{g/ml}$ ), 表明没有休克的严重脓毒病的阈值可以比败血性休克的阈值稍微高一点。未存活者中没有人表现出低于阈值  $8.1 \mu\text{g/ml}$  的水平。在  $8.4$  到  $9.5$  或  $10 \mu\text{g/ml}$  之间的阈值适合用于预测没有休克的严重脓毒病病人的结局。

[0170] 参考文献

[0171] Abraham, E., Laterre, P. F., Garbino, J., Pingleton, S., Butler, T., Dugernier, T., Margolis, B., Kudsk, K., Zimmerli, W., Anderson, P., Reynaert, M., Lew, D., Lesslauer, W., Passe, S., Cooper, P., Burdeska, A., Modi, M., Leighton, A., Salgo, M. and Van der Auwera, P. (2001) Lenercept (p55 tumor necrosis factor receptor fusion protein) in severe sepsis and early septic shock: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase III trial with 1,342 patients. *Crit Care Med*, 29, 503-510.

[0172] Agresti, A. and Coull, B. (1998) Approximate is better than "exact" for interval estimation of binomial proportions. *The American Statistician*, 52, 119-126.

[0173] Annane, D., Sebille, V., Charpentier, C., Bollaert, P. E., Francois, B., Korach, J. M., Capellier, G., Cohen, Y., Azoulay, E., Troche, G., Chaumet-Riffaud, P. and Bellissant, E. (2002) Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *Jama*, 288, 862-871.

[0174] Annane, D., Vignon, P., Renault, A., Bollaert, P. E., Charpentier, C., Martin, C., Troche, G., Ricard, J. D., Nitenberg, G., Papazian, L., Azoulay, E. and Bellissant, E. (2007) Norepinephrine plus dobutamine versus epinephrine alone for management of septic shock: a randomised trial. *Lancet*, 370, 676-684.

[0175] Bernard, G. R., Vincent, J. L., Laterre, P. F., LaRosa, S. P., Dhainaut, J. F., Lopez-Rodriguez, A., Steingrub, J. S., Garber, G. E., Helterbrand, J. D., Ely, E. W. and

Fisher, C. J., Jr. (2001) Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*, 344, 699-709.

[0176] Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M. and Sibbald, W. J. (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 101, 1644-1655.

[0177] Bopp, C., Hofer, S., Weitz, J., Bierhaus, A., Nawroth, P. P., Martin, E., Buchler, M. W. and Weigand, M. A. (2008) sRAGE is elevated in septic patients and associated with patients outcome. *J Surg Res*, 147, 79-83.

[0178] Boyd, J. H., Kan, B., Roberts, H., Wang, Y. and Walley, K. R. (2008) S100A8 and S100A9 mediate endotoxin-induced cardiomyocyte dysfunction via the receptor for advanced glycation end products. *Circ Res*, 102, 1239-1246.

[0179] Brunn, G. J. and Platt, J. L. (2006) The etiology of sepsis: turned inside out. *Trends Mol Med*, 12, 10-16.

[0180] Clec'h, C., Ferriere, F., Karoubi, P., Fosse, J. P., Cupa, M., Hoang, P. and Cohen, Y. (2004) Diagnostic and prognostic value of procalcitonin in patients with septic shock. *Crit Care Med*, 32, 1166-1169.

[0181] de Seny, D., Fillet, M., Ribbens, C., Maree, R., Meuwis, M. A., Lutteri, L., Chapelle, J. P., Wehenkel, L., Louis, E., Merville, M. P. and Malaise, M. (2008) Monomeric calgranulins measured by SELDI-TOF mass spectrometry and calprotectin measured by ELISA as biomarkers in arthritis. *Clin Chem*, 54, 1066-1075.

[0182] Dellinger, R. P., Carlet, J. M., Masur, H., Gerlach, H., Calandra, T., Cohen, J., Gea-Banacloche, J., Keh, D., Marshall, J. C., Parker, M. M., Ramsay, G., Zimmerman, J. L., Vincent, J. L. and Levy, M. M. (2004) Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*, 32, 858-873.

[0183] Dellinger, R. P., Levy, M. M., Carlet, J. M., Bion, J., Parker, M. M., Jaeschke, R., Reinhart, K., Angus, D. C., Brun-Buisson, C., Beale, R., Calandra, T., Dhainaut, J. F., Gerlach, H., Harvey, M., Marini, J. J., Marshall, J., Ranieri, M., Ramsay, G., Sevransky, J., Thompson, B. T., Townsend, S., Vender, J. S., Zimmerman, J. L. and Vincent, J. L. (2008) Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med*, 34, 17-60.

[0184] Foell, D., Frosch, M., Sorg, C. and Roth, J. (2004) Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. *Clin Chim Acta*, 344, 37-51. Foell, D., Wittkowski, H., Vogl, T. and Roth, J. (2007) S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol*, 81, 28-37.

[0185] Gibot, S., Cravoisy, A., Kolopp-Sarda, M. N., Bene, M. C., Faure, G., Bollaert, P. E. and Levy, B. (2005) Time-course of sTREM (soluble triggering receptor

expressed on myeloid cells)-1, procalcitonin, and C-reactive protein plasma concentrations during sepsis. *Crit Care Med*,33,792-796.

[0186] Grigoryev, D. N. , Liu, M. , Hassoun, H. T. , Cheadle, C. , Barnes, K. C. and Rabb, H. (2008)The local and systemic inflammatory transcriptome after acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*,19,547-558.

[0187] Ikemoto, M. , Tanaka, T. , Takai, Y. , Murayama, H. , Tanaka, K. and Fujita, M. (2003)New ELISA system for myeloid-related protein complex(MRP8/14)and its clinical significance as a sensitive marker for inflammatory responses associated with transplant rejection. *Clin Chem*,49,594-600.

[0188] Jung, D. Y. , Park, J. B. , Lee, E. N. , Lee, H. A. , Joh, J. W. , Kwon, C. H. , Ki, C. S. , Lee, S. Y. and Kim, S. J. (2008)Combined use of myeloid-related protein 8/14 and procalcitonin as diagnostic markers for acute allograft rejection in kidney transplantation recipients. *Transpl Immunol*,18,338-343.

[0189] Korndorfer, I. P. , Brueckner, F. and Skerra, A. (2007)The crystal structure of the human (S100A8/S100A9)<sub>2</sub> heterotetramer, calprotectin, illustrates how conformational changes of interacting alpha-helices can determine specific association of two EF-hand proteins. *J Mol Biol*,370,887-898.

[0190] Levy, M. M. , Fink, M. P. , Marshall, J. C. , Abraham, E. , Angus, D. , Cook, D. , Cohen, J. , Opal, S. M. , Vincent, J. L. and Ramsay, G. (2003)2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SISInternational Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*,31,1250-1256.

[0191] Monneret, G. , Lepape, A. , Voirin, N. , Bohe, J. , Venet, F. , Debard, A. L. , Thizy, H. , Bienvenu, J. , Gueyffier, F. and Vanhems, P. (2006)Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med.* ,32,1175-1183.

[0192] Oppenheim, J. J. , Tewary, P. , de la Rosa, G. and Yang, D. (2007)Alarmins initiate host defense. *Adv Exp Med Biol*,601,185-194.

[0193] Payen, D. ,Lukaszewicz, A. C. ,Belikova, I. ,Faivre, V. ,Gelin, C. ,Russwurm, S. , Launay, J. M. and Sevenet, N. (2008)Gene profiling in human blood leucocytes during recovery from septic shock. *Intensive Care Med*,34,1371-1376.

[0194] Rammes, A. , Roth, J. , Goebeler, M. , Klempt, M. , Hartmann, M. and Sorg, C. (1997)Myeloid-related protein (MRP)8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *J Biol Chem*,272,9496-9502.

[0195] Ravasi, T. , Hsu, K. , Goyette, J. , Schroder, K. , Yang, Z. , Rahimi, F. , Miranda, L. P. , Alewood, P. F. , Hume, D. A. and Geczy, C. (2004)Probing the S100 protein family through genomic and functional analysis. *Genomics*,84,10-22.

[0196] Roth, J. , Burwinkel, F. , van den Bos, C. , Goebeler, M. , Vollmer, E. and Sorg, C. (1993)MRP8and MRP14, S-100-like proteins associated with myeloid differentiation,are translocated to plasma membrane and intermediate filaments

in a calcium-dependent manner. *Blood*, 82, 1875-1883.

[0197] Sampson, B., Fagerhol, M. K., Sunderkotter, C., Golden, B. E., Richmond, P., Klein, N., Kovar, I. Z., Beattie, J. H., Wolska-Kusnierz, B., Saito, Y. and Roth, J. (2002) Hyperzincaemia and hypercalprotectinaemia: a new disorder of zinc metabolism. *Lancet*, 360, 1742-1745.

[0198] Scherpereel, A., Depontieu, F., Grigoriu, B., Cavestri, B., Tsicopoulos, A., Gentina, T., Jourdain, M., Pugin, J., Tonnel, A. B. and Lassalle, P. (2006) Endocan, a new endothelial marker in human sepsis. *Crit Care Med*, 34, 532-537.

[0199] Sprung, C. L., Annane, D., Keh, D., Moreno, R., Singer, M., Freivogel, K., Weiss, Y. G., Benbenishty, J., Kalenka, A., Forst, H., Laterre, P. F., Reinhart, K., Cuthbertson, B. H., Payen, D. and Briegel, J. (2008) Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med*, 358, 111-124.

[0200] Talwar, S., Munson, P. J., Barb, J., Fiuza, C., Cintron, A. P., Logun, C., Tropea, M., Khan, S., Reda, D., Shelhamer, J. H., Danner, R. L. and Suffredini, A. F. (2006) Gene expression profiles of peripheral blood leukocytes after endotoxin challenge in humans. *Physiol Genomics*, 25, 203-215.

[0201] van den Berghe, G., Wouters, P., Weekers, F., Verwaest, C., Bruyninckx, F., Schetz, M., Vlasselaers, D., Ferdinande, P., Lauwers, P. and Bouillon, R. (2001) Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med*, 345, 1359-1367.

[0202] Varpula, M., Pulkki, K., Karlsson, S., Ruokonen, E. and Pettila, V. (2007) Predictive value of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*, 35, 1277-1283.

[0203] Vincent, J. L., de Mendonca, A., Cantraine, F., Moreno, R., Takala, J., Suter, P. M., Sprung, C. L., Colardyn, F. and Blecher, S. (1998) Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med*, 26, 1793-1800.

[0204] Vogl, T., Propper, C., Hartmann, M., Strey, A., Strupat, K., van den Bos, C., Sorg, C. and Roth, J. (1999) S100A12 is expressed exclusively by granulocytes and acts independently from MRP8 and MRP14. *J Biol Chem*, 274, 25291-25296.

[0205] Vogl, T., Tenbrock, K., Ludwig, S., Leukert, N., Ehrhardt, C., van Zoelen, M. A., Nacken, W., Foell, D., van der Poll, T., Sorg, C. and Roth, J. (2007) Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med*, 13, 1042-1049.

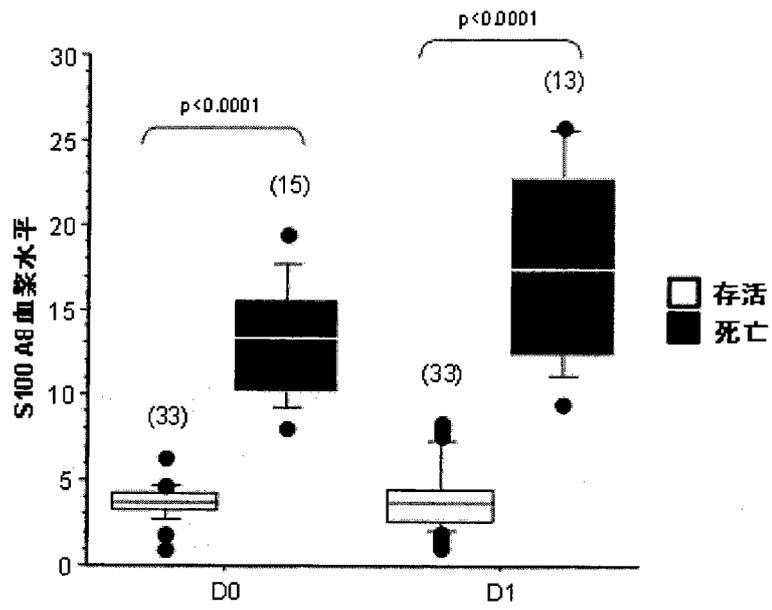


图 1

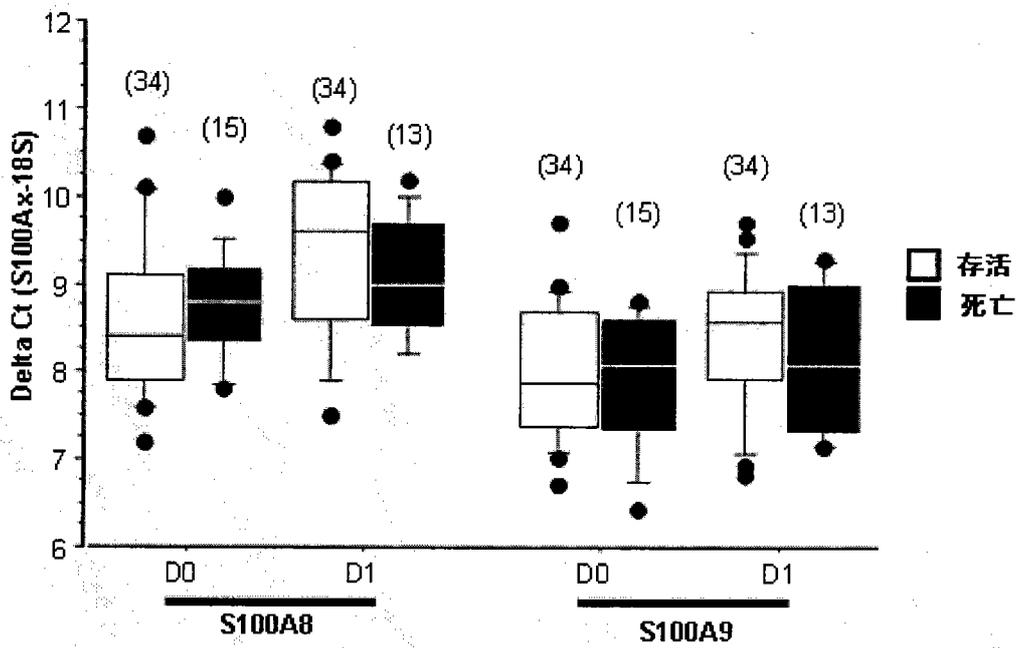


图 2

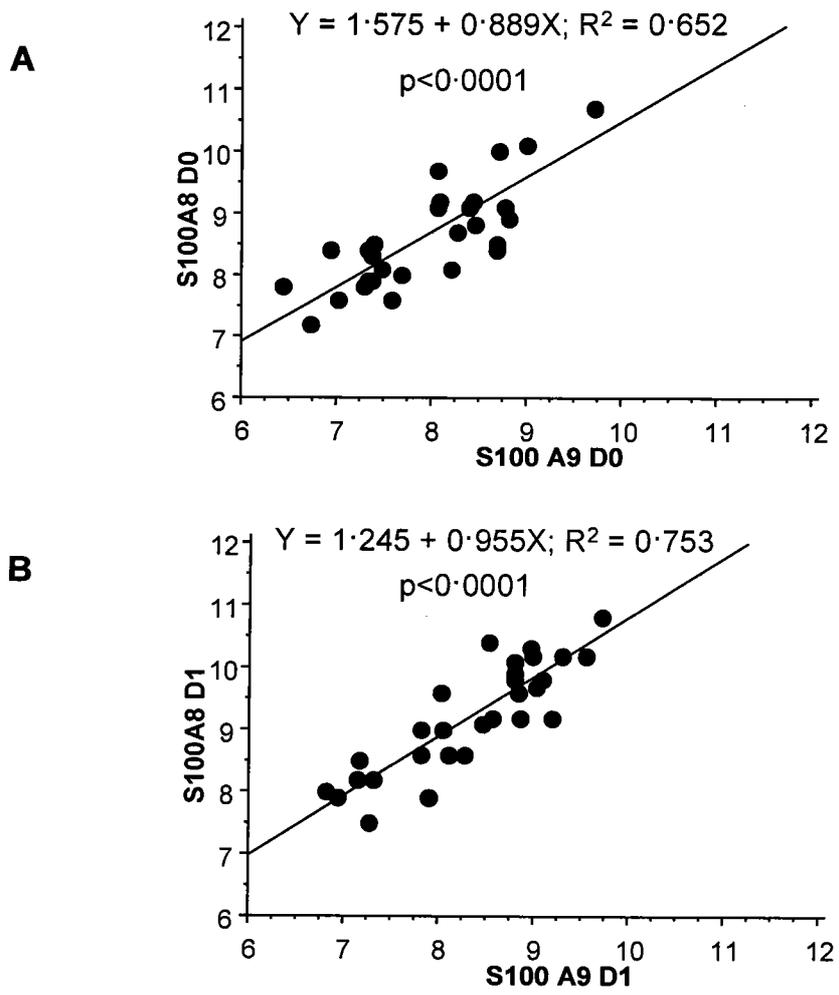


图 3

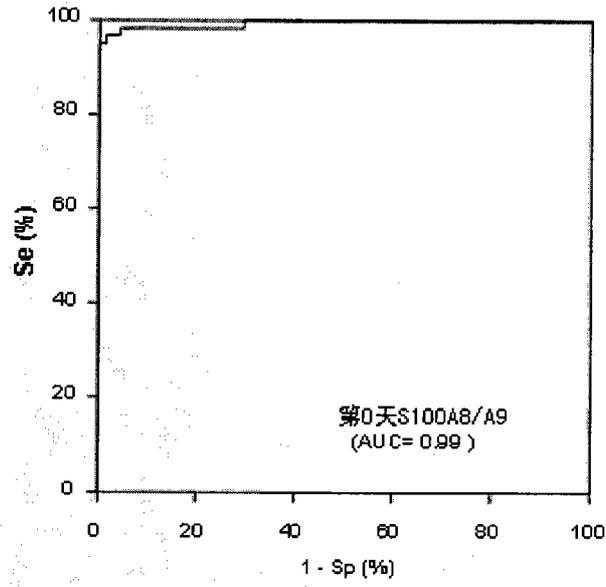


图 4

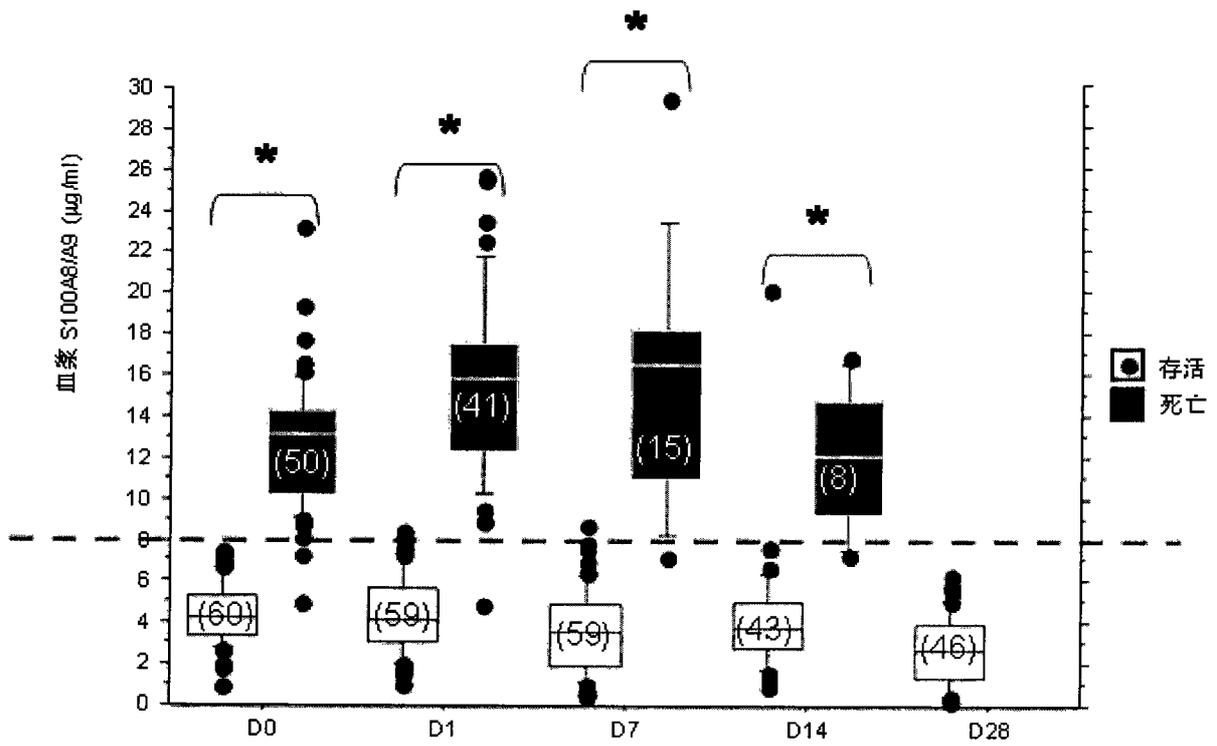


图 5

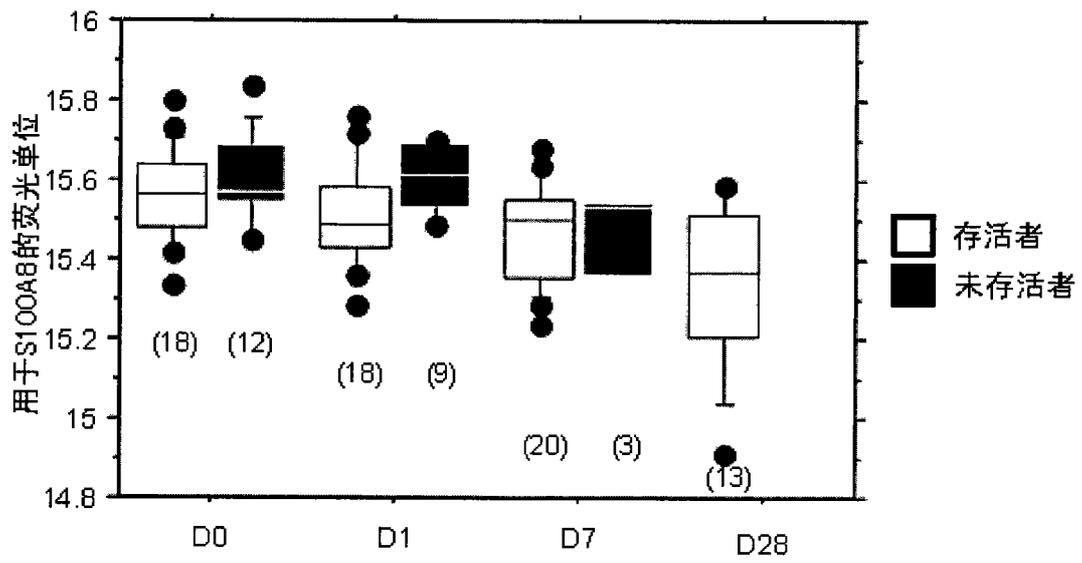


图 6

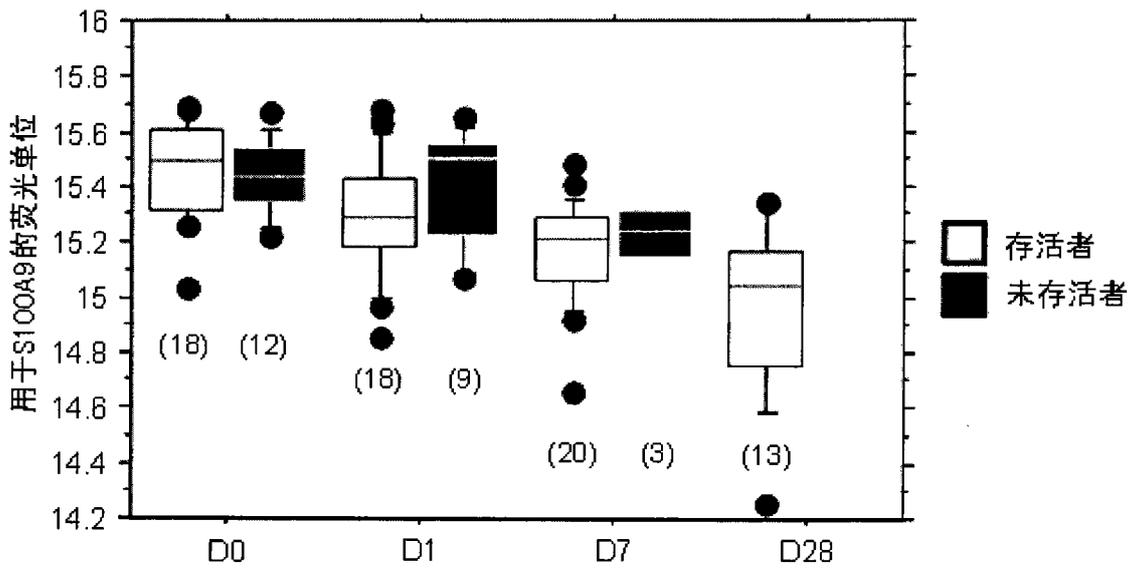


图 7

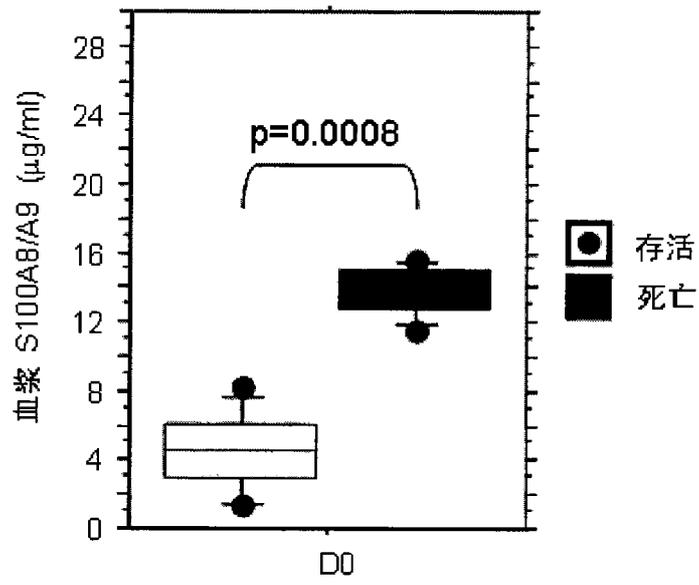


图 8