



(21) 申请号 201880027257.2	<i>C12Q 1/37</i> (2006.01)
(22) 申请日 2018.04.25	<i>C07K 14/81</i> (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 110691973 A	(56) 对比文件 US 2006110774 A1, 2006.05.25 US 2007297982 A1, 2007.12.27 US 2011190194 A1, 2011.08.04 US 6660482 B1, 2003.12.09 Hanno Teiwes. A paper-based lateral flow device for the detection of I IP VIA ELISA.《University of Rhode Island: Open Access Master's Theses》.2014, paper 363. C.Mizon 等. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for human plasma inter- α -trypsin inhibitor (ITI) using specific antibodies against each of the H1 and H, heavy chains.《Journal of Immunological Methods》.1996, 第190卷 (第1期), 第61-70页. O Carrette等. Purification and characterization of pig inter-alpha-inhibitor and its constitutive heavy chains.《Biochim Biophys Acta.》.1997, 第1338卷 (第1期), 第21-30页.
(43) 申请公布日 2020.01.14	
(30) 优先权数据 62/490003 2017.04.25 US 62/614333 2018.01.05 US	
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2019.10.24	
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2018/029436 2018.04.25	
(87) PCT国际申请的公布数据 W02018/200722 EN 2018.11.01	
(73) 专利权人 普罗瑟拉生物公司 地址 美国罗德岛州	
(72) 发明人 林佑彬 D.斯佩罗	
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001 专利代理师 李进 黄登高	
(51) Int.Cl. <i>G01N 33/53</i> (2006.01)	审查员 曹扣 权利要求书2页 说明书39页 附图30页

(54) 发明名称
用于定量间 α 抑制剂蛋白的方法

(57) 摘要
本文描述用于使用基于IAIP配体的测定定量样品(例如,来自受试者)中的IAIP水平的方法。还公开了用于测量IAIP- IAIP配体复合物的方法,以及使用前述的IAIP定量方法评估、监测和治疗受试者的方法。

1. 结合剂和检测剂在制备试剂盒中的用途,其中所述试剂盒用于定量来自受试者的样品中的完整间 α 抑制剂蛋白 (IAIP) 的方法,所述方法包括:

a) 将所述样品与结合剂接触以产生IAIP-结合剂复合物,其中所述结合剂结合至支持物,并且其中所述结合剂包含特异性结合至bikunin的抗体;

b) 将所述IAIP-结合剂复合物与所述检测剂接触,其中所述检测剂包含结合至至少一种IAIP重链的IAIP配体,并且其中所述IAIP配体选自内毒素 (LPS) 和肝素;以及

c) 检测结合至所述IAIP-结合剂复合物的所述检测剂的量,

其中所述完整IAIP包含bikunin和选自H1、H2和H3链的至少一种间 α 抑制剂蛋白 (IAIP) 重链,

从而定量样品中的完整IAIP。

2. 如权利要求1所述的用途,其中a)、b) 或c) 的至少一个在7.0至3.5的pH下进行。

3. 如权利要求2所述的用途,其中所述pH为5.0至3.5。

4. 如权利要求3所述的用途,其中所述pH为4.0。

5. 如权利要求1所述的用途,其中所述方法还包括在a) 之前,将二价阳离子添加至样品,且其中所述二价阳离子是 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 或 Fe^{2+} 。

6. 如权利要求1所述的用途,其中所述受试者是人受试者。

7. 如权利要求1所述的用途,其中所述IAIP配体是肝素。

8. 如权利要求7所述的用途,其中所述IAIP配体是内毒素 (LPS)。

9. 如权利要求1所述的用途,其中所述检测剂还包含标记,并且其中所述标记是生物素、金纳米颗粒、磁颗粒、胶乳颗粒、酶、酶底物、荧光染料、发光化合物或放射性标记。

10. 如权利要求9所述的用途,其中所述标记是酶,并且其中所述酶是辣根过氧化物酶。

11. 如权利要求9所述的用途,其中所述标记包含金纳米颗粒。

12. 如权利要求9所述的用途,其中所述检测剂包含生物素以及链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白之一。

13. 如权利要求1所述的用途,其中所述样品是血液、血浆、血清、尿液、脑脊液、滑液、羊水、间质液、卵泡液、腹膜液、支气管肺泡灌洗液、母乳、痰液、淋巴、胆汁或组织匀浆。

14. 如权利要求13所述的用途,其中所述样品是血液、脑脊液、支气管肺泡灌洗液、滑液或痰液。

15. 如权利要求14所述的用途,其中所述样品是血液。

16. 如权利要求13所述的用途,其中所述样品是血浆或血清。

17. 如权利要求9所述的用途,其中所述标记是金纳米颗粒,且所述IAIP配体是肝素或内毒素 (LPS)。

18. 如权利要求1-17中任一项所述的用途,其中所述支持物是板、颗粒、树脂、膜、生物芯片、容器、测试条或珠粒。

19. 如权利要求1-17中任一项所述的用途,其中所述支持物是纳米颗粒。

20. 如权利要求18所述的用途,其中所述支持物是测试条。

21. 如权利要求1所述的用途,其中所述支持物是测试条,且其中检测剂在样品之前、之后或与样品同时加至测试条。

22. 一种用于定量样品中的完整IAIP的试剂盒,其中所述试剂盒包括:

支持物；

包含特异性结合至bikunin的抗体的结合剂,其中所述结合剂结合至支持物；

检测剂,所述检测剂包含标记和结合至选自H1、H2和H3的至少一种IAIP重链的间 α 抑制剂蛋白 (IAIP) 配体,其中所述IAIP配体选自内毒素 (LPS) 和肝素；和

用于定量样品中的I α I和P α I的说明书,

其中所述完整IAIP包含bikunin和选自H1、H2和H3的至少一种IAIP重链。

23. 如权利要求22所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包含以下中的一种或多种:洗涤缓冲液、封闭剂和用于检测标记的底物。

24. 如权利要求22所述的试剂盒,其中所述IAIP配体是肝素。

25. 如权利要求24所述的试剂盒,其中所述IAIP配体是内毒素 (LPS)。

26. 如前述权利要求所述的试剂盒,其中所述标记是生物素、金纳米颗粒、磁颗粒、胶乳颗粒、酶、酶底物、荧光染料、发光化合物或放射性标记。

27. 如权利要求26所述的试剂盒,其中所述标记是酶,并且其中所述酶是辣根过氧化物酶。

28. 如权利要求26所述的试剂盒,其中所述标记包含金纳米颗粒。

29. 如权利要求26所述的试剂盒,其中所述检测剂包含生物素以及链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白之一。

30. 如权利要求22所述的试剂盒,其中所述样品是血液、血浆、血清、尿液、脑脊液、滑液、羊水、间质液、卵泡液、腹膜液、支气管肺泡灌洗液、母乳、痰液、淋巴、胆汁或组织匀浆。

31. 如权利要求30所述的试剂盒,其中所述样品是血液、脑脊液、支气管肺泡灌洗液、滑液或痰液。

32. 如权利要求31所述的试剂盒,其中所述样品是血液。

33. 如权利要求30所述的试剂盒,其中所述样品是血浆或血清。

34. 如权利要求26所述的试剂盒,其中所述标记是金纳米颗粒,且所述IAIP配体是肝素或内毒素 (LPS)。

35. 如权利要求22-34中任一项所述的试剂盒,其中所述支持物是板、颗粒、树脂、膜、生物芯片、容器、测试条或珠粒。

36. 如权利要求22-34中任一项所述的试剂盒,其中所述支持物是纳米颗粒。

37. 如权利要求36所述的试剂盒,其中所述支持物是测试条。

用于定量间 α 抑制剂的蛋白的方法

背景技术

[0001] IAIP (间 α 抑制剂蛋白) 是以高浓度在所有哺乳动物的血液中循环的天然存在的免疫调节血浆蛋白的家族。IAIP最初在肝脏中产生, 释放到血液中, 并且子单元(bikunin) 在尿液中排出。IAIP在调节炎症方面具有重要作用。它们对于由感染、创伤和损伤引起的严重炎症具有广泛的保护性作用, 并且重要的是, IAIP的保护性作用不依赖于引发性的微生物剂或触发物。此家族的成员由通过糖胺聚糖共价连接的重链和轻链多肽亚基构成。IAIP可以作为间 α 抑制剂(I α I) (一种由两条重链(H1和H2) 和一条轻链(L) 构成的250kDa分子) 和前 α 抑制剂(P α I) (一种由一条重链(H3) 和一条轻链(L) 构成的125kDa分子) 在体内存在。

[0002] 当身体产生炎症信号(诸如在损伤或感染期间引发的那些) 时, IAIP进入组织中并且直接到达炎症部位。IAIP的重链通过与作为炎症级联反应的一部分的蛋白质结合来增强抗炎反应。另外, 当重链裂解时, 轻链及其缔合的GAG(由于其库尼茨结构域(Kunitz domain) 而被称为Bikunin) 被释放, 并且轻链的丝氨酸蛋白酶抑制剂活性被激活。Bikunin抑制丝氨酸蛋白酶(诸如胰蛋白酶、弹性蛋白酶、纤溶酶、组织蛋白酶G和弗林蛋白酶(furin)) 的活性。IAIP通过多种机制发挥其抗炎作用。已经显示它们结合加重炎症的蛋白质, 诸如补体和细胞外组蛋白(损害信号), 从而使炎症过程衰弱。IAIP可以通过重链结合细胞外基质(ECM) 蛋白, 并且已经在体外和体内模型两者中显示在损伤之后促进肺上皮修复。还在多种体内模型中显示IAIP下调炎症细胞因子, 诸如TNF- α 和IL-6。已经显示Bikunin缺陷(并且因此IAIP缺陷) 小鼠具有减少的细胞粘附的炎症标记物VCAM-1和ICAM-1。

[0003] 在健康个体中, 血液中循环IAIP的量是相对较高的(400-800mg/L之间)。然而, IAIP水平在新生儿和在成人患者中在系统性炎症/败血症期间快速降低(Baek YW, 等人J Pediatr.2003;143:11-15;Lim YP, 等人J Infect Dis.2003;188:919-926和Opal SM, 等人Crit Care Med.2007;35:387-392), 并且已经显示降低水平的IAIP与疾病进展强烈相关。随着疾病进展至更后期且威胁生命的阶段, IAIP水平急剧降低, 这表明IAIP作为预后和治疗诊断学标记物在帮助临床医生监测疾病进展并针对疾病(诸如严重炎症性疾病, 诸如严重肺炎、败血症和相关联的器官损害、NEC、伤口愈合、烧伤、癌症、中风、阿尔茨海默氏病、癫痫等) 作出明智的治疗决策方面具有临床用途。

[0004] 标准化的竞争性IAIP免疫测定已经用于在来自细菌和病毒感染之后患有系统性炎症的患者的全血样品中测量IAIP。竞争性IAIP免疫测定提供仅检测轻链的IAIP的测量, 因此在此测定中检测完整IAIP和裂解的bikunin两者。竞争性测定不检测对于其抗炎和组织修复特性非常重要的IAIP的其他关键部分, 即重链和糖胺聚糖。因此, 竞争性IAIP免疫测定在评定患者样品中的活性IAIP方面具有限制。鉴于IAIP作为身体的保护性先天免疫防御的关键组分的重要性及其作为预后生物标记物的潜在用途, 需要定量地测量IAIP的改进方法。一种理想的测定将测量轻链和重链亚基两者来捕获完整分子。

发明内容

[0005] 本发明提供用于通过用结合至并检测IAIP的剂(例如, 结合至完整IAIP、IAIP的重

链或IAIP的糖胺聚糖(GAG)的剂)直接检测来定量来自受试者的样品中的IAIP的方法。定量方法可以用于评估、诊断、治疗或监测受试者,或评估受试者的疾病严重性或治疗功效。本发明的特征还在于可以用于根据本文所述的方法定量IAIP的试剂盒。

[0006] 在第一方面,特征在于一种用于通过以下定量来自受试者的样品中的间 α 抑制剂蛋白(IAIP)的方法:a)将所述样品与结合剂接触以产生IAIP-结合剂复合物,其中所述结合剂结合至支持物;b)将所述IAIP-结合剂复合物与检测剂接触;以及c)检测结合至所述IAIP-结合剂复合物的检测剂的量,以定量所述样品中的IAIP。

[0007] 在一些实施方案中,所述IAIP是完整IAIP。

[0008] 在一些实施方案中,所述结合剂是结合至IAIP的IAIP配体。在一些实施方案中,所述结合剂是特异性结合至IAIP的抗体。

[0009] 在一些实施方案中,所述检测剂是或含有IAIP配体。在一些实施方案中,所述检测剂还含有结合至IAIP配体检测剂的抗体(例如,IAIP配体)。在一些实施方案中,所述检测剂是特异性结合至IAIP的抗体。例如,在具体实施方案中,所述结合剂是特异性结合至IAIP的抗体(例如,MAb 69.26或MAb 69.31),并且所述检测剂是或含有结合至IAIP的IAIP配体(例如,肝素、透明质酸、内毒素(LPS)或组蛋白)。在其他实施方案中,所述结合剂是结合至IAIP的IAIP配体(例如,肝素、透明质酸、LPS或组蛋白),并且所述检测剂是特异性结合至IAIP的抗体(例如,MAb 69.26或MAb 69.31)。

[0010] 在一些实施方案中,所述IAIP在IAIP-IAIP配体复合物中。

[0011] 在一些实施方案中,所述结合剂是结合至IAIP的IAIP配体。在一些实施方案中,所述IAIP-IAIP配体复合物的IAIP配体不同于所述结合剂。在一些实施方案中,所述结合剂是结合至所述IAIP-IAIP配体复合物的IAIP配体的抗体。在一些实施方案中,所述结合剂是特异性结合至所述IAIP-IAIP配体复合物的IAIP的抗体。

[0012] 在一些实施方案中,所述检测剂含有结合至IAIP的IAIP配体。在一些实施方案中,所述检测剂还含有结合至所述IAIP配体检测剂的抗体。在一些实施方案中,所述IAIP-IAIP配体复合物的IAIP配体不同于所述IAIP配体检测剂。在一些实施方案中,所述检测剂是结合至所述IAIP-IAIP配体复合物的IAIP配体的抗体。在一些实施方案中,所述检测剂是特异性结合至所述IAIP-IAIP配体复合物的IAIP的抗体。

[0013] 在一些实施方案中,所述抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,所述抗体是MAb 69.26或MAb 69.31。

[0014] 在一些实施方案中,所述IAIP配体选自由以下组成的组:内毒素(LPS)、肝素、组蛋白、透明质酸、玻连蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白、肌腱蛋白C、聚集蛋白聚糖、血管假性血友病因子(von Willebrand Factor)、正五聚蛋白-3(PTX3)、TNF刺激基因-6(TSG-6)、因子IX、补体组分、因子XIIIa以及组织转谷氨酰胺酶。在一些实施方案中,所述补体组分是C1q、C2、C3、C4、C5、C6、C8、备解素或因子D。

[0015] 在一些实施方案中,所述检测剂含有标记。在一些实施方案中,所述标记是生物素、酶、酶底物、放射性标记、发光化合物、胶体金、颗粒或荧光染料。

[0016] 在一些实施方案中,所述支持物是板、颗粒、纳米颗粒、树脂、膜、生物芯片、容器、测试条或珠粒。

[0017] 在一些实施方案中,所述方法还包括步骤a)与步骤b)之间的洗涤步骤。

[0018] 在一些实施方案中,所述方法还包括步骤b)与步骤c)之间的洗涤步骤。

[0019] 在一些实施方案中,所述方法还包括步骤a)或步骤b)之前的封闭步骤。

[0020] 在一些实施方案中,步骤a)和/或步骤b)中的接触在约7.0至约3.5的pH下进行。在一些实施方案中,pH为约5.0至约3.5。在一些实施方案中,pH为约4.0。

[0021] 在一些实施方案中,所述样品是液体。在一些实施方案中,所述液体是血液、血浆、血清、尿液、脑脊液、滑液、羊水、间质液、卵泡液、腹膜液、支气管肺泡灌洗液、母乳、痰液、淋巴、胆汁或组织匀浆。

[0022] 在一些实施方案中,所述受试者是人类受试者。在一些实施方案中,所述受试者被鉴定为患有炎性疾病或病状或感染或者处于发展炎性疾病或病状或感染的风险。在一些实施方案中,所述受试者未被鉴定为患有炎性疾病或病状或感染或者处于发展炎性疾病或病状或感染的风险。在一些实施方案中,所述方法在将所述受试者诊断为患有炎性疾病或病状或感染或者处于炎性疾病或病状或感染的风险之前、之后或同时进行。在一些实施方案中,所述方法与治疗所述受试者的炎性疾病或病状或感染基本上同时进行。在一些实施方案中,所述方法在治疗所述受试者的炎性疾病或病状或感染之前进行。在一些实施方案中,所述方法在治疗所述受试者的炎性疾病或病状或感染之后进行。

[0023] 在一些实施方案中,所述炎性疾病或病状选自自由以下组成的组:败血症、败血症性休克、无菌性败血症、创伤、损伤、中风、急性炎性疾病、SIRS、急性肺损伤、ARDS、肺炎、坏死性小肠结肠炎、急性胰腺炎、肾病、急性肾损伤、肝损伤、急性循环衰竭、子痫前期、癌症、癌症转移、肿瘤浸润、外周动脉疾病、1型或2型糖尿病、动脉粥样硬化性心血管疾病、间歇性跛行、严重肢体缺血性疾病、心肌梗塞、颈动脉闭塞、脐带闭塞、低出生体重、早产、手术引起的炎症、脓肿引起的炎症、多发性硬化症、肺功能不全、周围神经病变、缺氧缺血、细菌感染、伤口、烧伤、割伤、挫伤、骨折、外科手术、组织缺血、类风湿性关节炎、脑膜炎、炎性肠病、慢性阻塞性肺病、鼻炎、未足月产或感染性疾病。

[0024] 在一些实施方案中,所述感染由以下导致:革兰氏阴性细菌,诸如奈瑟氏菌属(*Neisseria*)物种,包括淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)和脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*);布兰汉氏菌属(*Branhamella*)物种,包括粘膜炎布兰汉氏菌(*Branhamella catarrhalis*);埃希氏菌属(*Escherichia*)物种,包括大肠杆菌(*Escherichia coli*);肠杆菌属(*Enterobacter*)物种;变形杆菌属(*Proteus*)物种,包括奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*);假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种,包括铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、鼻疽假单胞菌(*Pseudomonas mallei*)和类鼻疽假单胞菌(*Pseudomonas pseudomallei*);克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)物种,包括肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*);沙门氏菌属(*Salmonella*)物种;志贺氏菌属(*Shigella*)物种;沙雷氏菌属(*Serratia*)物种;不动杆菌属(*Acinetobacter*)物种;嗜血杆菌属(*Haemophilus*)物种,包括流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)和杜克雷嗜血杆菌(*Haemophilus ducreyi*);布鲁氏菌属(*Brucella*)物种;耶尔森氏菌属(*Yersinia*)物种,包括鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)和小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*);弗朗西斯氏菌属(*Francisella*)物种,包括土拉热弗朗西斯氏菌(*Francisella tularensis*);巴氏杆菌属(*Pasteurella*)物种,包括多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*);霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*);黄杆菌属(*Flavobacterium*)物

种,脑膜败血性黄杆菌(meningosepticum);弯曲菌属(Campylobacter)物种,包括空肠弯曲菌(Campylobacter jejuni);拟杆菌属(Bacteroides)物种(口腔,咽),包括脆弱拟杆菌(Bacteroides fragilis);梭杆菌属(Fusobacterium)物种,包括具核梭杆菌(Fusobacterium nucleatum);肉芽肿鞘杆菌(Calymmatobacterium granulomatis);链杆菌属(Streptobacillus)物种,包括念珠状链杆菌(Streptobacillus moniliformis);以及军团菌属(Legionella)物种,包括嗜肺军团菌(Legionella pneumophila)。

[0025] 在一些实施方案中,所述受试者是新生儿、儿童、青少年或成年人。

[0026] 在一些实施方案中,所述方法每年进行一次或多次。在一些实施方案中,所述方法每月进行一次或多次。在一些实施方案中,所述方法每周进行一次或多次。在一些实施方案中,所述方法每天进行一次或多次。在一些实施方案中,所述方法每小时进行一次或多次。

[0027] 在一些实施方案中,所述方法进行至少一次、至少两次、至少三次、至少五次或至少十次。

[0028] 在一些实施方案中,所述方法还包括向受试者施用包括IAIP或治疗剂的治疗。在一些实施方案中,所述受试者具有200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更低的IAIP浓度。在一些实施方案中,来自所述受试者的样品具有相对于参考样品升高水平的IAIP-IAIP配体复合物。在一些实施方案中,所述受试者患有炎性疾病或病状或感染或者处于发展炎性疾病或病状或感染的风险。

[0029] 在一些实施方案中,所述方法还包括向受试者施用IAIP和治疗剂。

[0030] 在一些实施方案中,所述治疗剂选自以下组成的组:抗生素剂、抗病毒剂、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗炎剂、抗癌剂、抗凝剂、免疫调节剂、支气管扩张剂、补体抑制剂、血管加压素、镇静剂或机械通气。

[0031] 在一些实施方案中,所述受试者已患病至少一天。在一些实施方案中,所述受试者已患病至少一周。在一些实施方案中,所述受试者已患病至少一个月。在一些实施方案中,所述受试者已患病至少一年。

[0032] 在一些实施方案中,所述方法用于:a) 评估受试者的健康状态;b) 监测受试者的健康状态;c) 将受试者诊断为患有炎性疾病或病状或感染或者处于炎性疾病或病状或感染的风险;d) 评估向受试者施用的治疗的功效;或者e) 评估受试者的疾病严重性。

[0033] 在一些实施方案中,所述方法还包括将在所述样品中检测到的IAIP和/或IAIP-IAIP配体复合物的量与来自正常受试者的样品中存在的IAIP和/或IAIP-IAIP配体复合物的量或与截断值进行比较。在一些实施方案中,所述样品中的IAIP的量低于来自正常受试者的样品中的IAIP的量或相对于截断值更低指示受试者患有炎性疾病或病状或感染或者处于发展炎性疾病或病状或感染的风险。在一些实施方案中,所述样品中的IAIP-IAIP配体复合物的量大于来自正常受试者的样品中的IAIP-IAIP配体复合物的量或相对于截断值更大指示受试者患有炎性疾病或病状或感染或者处于发展炎性疾病或病状或感染的风险。在一些实施方案中,来自正常受试者的样品中的IAIP的量或截断值为 $>250\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在一些实施方案中,来自正常受试者的样品中的IAIP的量为约260 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约540 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0034] 在一些实施方案中,确定受试者具有250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小的IAIP浓度指示所述受试者患有炎性疾病或病状或感染或者处于发展炎性疾病或病状或感染的高风险或被诊断为具有发病率和/或死亡率的增加风险。

[0035] 在一些实施方案中,所述受试者具有200至300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的IAIP浓度。在其他实施方案

中,所述方法一年进行至少一次、一年进行至少两次、一个月进行至少一次、一周进行至少一次、一天进行至少一次或一小时进行至少一次。

[0036] 在一些实施方案中,所述受试者先前已患有炎性疾病或病状或感染。

[0037] 在一些实施方案中,所述方法在治疗之前进行和/或在治疗过程中进行一次或多次。在一些实施方案中,所述方法在治疗开始之后进行和/或在治疗结束之后进行。在一些实施方案中,如果受试者中的IAIP的浓度相对于受试者中的IAIP的先前测量值增加和/或如果受试者中的IAIP-IAIP配体复合物的浓度相对于受试者中的IAIP-IAIP配体复合物的先前测量值降低,则确定所述治疗是有效的。在一些实施方案中,如果受试者中的IAIP的浓度相对于受试者中的IAIP的先前测量值降低或保持恒定和/或如果受试者中的IAIP-IAIP配体复合物的浓度相对于受试者中的IAIP-IAIP配体复合物的先前测量值增加或保持恒定,则确定所述治疗是无效的。在一些实施方案中,所述方法还包括修改或改变治疗。

[0038] 在第二方面,特征在于一种治疗患有炎性疾病或感染或者处于发展炎性疾病或感染的风险的受试者(例如,人,诸如新生儿、儿童、青少年或成年人),其中根据第一方面的方法已确定所述受试者需要通过向所述受试者施用治疗有效量的IAIP和/或治疗剂进行的治疗,所述治疗剂选自由以下组成的组:抗生素剂、抗病毒剂、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗炎剂、抗癌剂、抗凝剂、免疫调节剂、支气管扩张剂、补体抑制剂、血管加压素、镇静剂或机械通气。

[0039] 在一些实施方案中,所述炎性疾病或病状选自由以下组成的组:败血症、败血症性休克、无菌性败血症、创伤、损伤、中风、急性炎性疾病、SIRS、急性肺损伤、ARDS、肺炎、坏死性小肠结肠炎、急性胰腺炎、肾病、急性肾损伤、肝损伤、急性循环衰竭、手术引起的炎症、脓肿引起的炎症、多发性硬化症、子痫前期、癌症、癌症转移、肿瘤浸润、外周动脉疾病、1型或2型糖尿病、动脉粥样硬化性心血管疾病、间歇性跛行、严重肢体缺血性疾病、心肌梗塞、颈动脉闭塞、脐带闭塞、低出生体重、早产、肺功能不全、周围神经病变、缺氧缺血、细菌感染、伤口、烧伤、割伤、挫伤、骨折、外科手术、组织缺血、类风湿性关节炎、脑膜炎、炎性肠病、慢性阻塞性肺病、鼻炎、未足月产或感染性疾病。

[0040] 在一些实施方案中,所述感染由以下导致:革兰氏阴性细菌,诸如奈瑟氏菌属(*Neisseria*)物种,包括淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)和脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*);布兰汉氏菌属(*Branhamella*)物种,包括粘膜炎布兰汉氏菌(*Branhamella catarrhalis*);埃希氏菌属(*Escherichia*)物种,包括大肠杆菌(*Escherichia coli*);肠杆菌属(*Enterobacter*)物种;变形杆菌属(*Proteus*)物种,包括奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*);假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种,包括铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、鼻疽假单胞菌(*Pseudomonas mallei*)和类鼻疽假单胞菌(*Pseudomonas pseudomallei*);克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)物种,包括肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*);沙门氏菌属(*Salmonella*)物种;志贺氏菌属(*Shigella*)物种;沙雷氏菌属(*Serratia*)物种;不动杆菌属(*Acinetobacter*)物种;嗜血杆菌属(*Haemophilus*)物种,包括流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)和杜克雷嗜血杆菌(*Haemophilus ducreyi*);布鲁氏菌属(*Brucella*)物种;耶尔森氏菌属(*Yersinia*)物种,包括鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)和小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*);弗朗西斯氏菌属(*Francisella*)物种,包括土拉热弗朗西斯氏菌(*Francisella tularensis*);巴氏杆菌属(*Pasturella*)物种,包括多杀性巴氏杆菌

(*Pasteurella multocida*);霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*);黄杆菌属(*Flavobacterium*)物种,脑膜败血性黄杆菌(*meningosepticum*);弯曲菌属(*Campylobacter*)物种,包括空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*);拟杆菌属(*Bacteroides*)物种(口腔,咽),包括脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*);梭杆菌属(*Fusobacterium*)物种,包括具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*);肉芽肿鞘杆菌(*Calymmatobacterium granulomatis*);链杆菌属(*Streptobacillus*)物种,包括念珠状链杆菌(*Streptobacillus moniliformis*);以及军团菌属(*Legionella*)物种,包括嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)。

[0041] 在第三方面,特征在于一种用于定量样品中的IAIP或IAIP-IAIP配体复合物的试剂盒,其中所述试剂盒包括IAIP结合剂和IAIP检测剂以及任选地以下中的一种或多种:洗涤缓冲液、封闭剂、用于检测标记的底物以及用于定量样品中的IAIP或IAIP-IAIP配体复合物的水平的说明书。试剂盒的组分中的一种或多种可以提供在容器中,诸如管或小瓶,和/或以随时可用的形式提供(例如,施加到试剂盒的支持物(例如,板或测试条))。

[0042] 在一些实施方案中,所述结合剂固定在支持物上。

[0043] 在一些实施方案中,所述检测剂被标记。

[0044] 在一些实施方案中,所述IAIP结合剂是IAIP特异性抗体或IAIP配体。

[0045] 在一些实施方案中,所述试剂盒还含有IAIP配体结合剂。在一些实施方案中,所述IAIP配体结合剂是结合至IAIP配体的抗体。

[0046] 在一些实施方案中,所述IAIP检测剂是IAIP特异性抗体或IAIP配体。

[0047] 在一些实施方案中,所述试剂盒还含有IAIP配体检测剂。在一些实施方案中,所述IAIP配体检测剂是特异性结合至IAIP配体的抗体。

[0048] 在一些实施方案中,所述IAIP特异性抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,所述单克隆抗体是MAb 69.26或MAb 69.31。

[0049] 在一些实施方案中,所述支持物是板、树脂、容器、膜、生物芯片、颗粒、纳米颗粒、测试条或珠粒。

[0050] 在一些实施方案中,所述标记是酶、酶底物、生物素、颗粒、荧光染料、发光化合物或放射性标记。

[0051] 在一些实施方案中,所述IAIP配体选自由以下组成的组:内毒素(LPS)、肝素、组蛋白、透明质酸、层粘连蛋白、肌腱蛋白C、聚集蛋白聚糖、玻连蛋白、纤连蛋白、血管假性血友病因子、正五聚蛋白-3(PTX3)、TNF刺激基因-6(TSG-6)、因子IX、补体组分、因子XIIIa以及组织转谷氨酰胺酶。

[0052] 定义

[0053] 如本文所用,术语“约”是指高于或低于不大于所述值的10%。例如,术语“约5nM”指示4.5nM至5.5nM的范围。

[0054] 如本文所用,“施用”是指通过任何有效途径提供或给予受试者治疗剂(例如,IAIP)。施用的示例性途径以下在本中描述。

[0055] 如本文所用,术语“抗体”(Ab)是指特异性结合至特定抗原或与特定抗原免疫反应的免疫球蛋白分子,并且至少包括重链的可变结构域,并且通常至少包括免疫球蛋白的重链和轻链的可变结构域。抗体及其抗原结合片段、变体或衍生物包括但不限于多克隆、单克隆、多特异性、人、人源化、灵长类化或嵌合抗体、异源缀合物抗体(例如,双、三和四特异性

抗体、双抗体、三抗体和四抗体)、单结构域抗体(sdAb)、表位结合片段,例如Fab、Fab'和F(ab')₂、Fd、Fv、单链Fv(scFv)、rIgG、单链抗体、二硫键连接的Fv(sdFv)、包含V_L或V_H结构域的片段、通过Fab表达文库产生的片段和抗独特型(抗Id)抗体。本发明的抗体分子可以是任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类的免疫球蛋白分子。此外,除非另外指示,否则术语“单克隆抗体”(mAb)旨在包括完整分子以及能够特异性结合至靶蛋白的抗体片段(例如像,Fab和F(ab')₂片段)两者。Fab和F(ab')₂片段缺乏完整抗体的Fc片段,更快地从动物的血液循环中清除,并且可能具有比完整抗体更少的非特异性组织结合。

[0056] 如本文所用,术语“抗原结合片段”是指保留特异结合至靶抗原的能力的抗体的一个或多个片段。抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段进行。抗体片段可以是Fab、F(ab')₂、scFv、SMIP、双抗体、三抗体、亲和体、纳米抗体、适体或结构域抗体。术语抗体的“抗原结合片段”所涵盖的结合片段的实例包括但不限于:(i) Fab片段,一种由V_L、V_H、C_L和C_H1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,一种包含在铰链区处通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由V_H和C_H1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体的单臂的V_L和V_H结构域组成的Fv片段,(v) 包含V_H和V_L结构域的dAb;(vi) 由V_H结构域组成的dAb片段(Ward等人,Nature 341:544-546,1989);(vii) 由V_H或V_L结构域组成的dAb;(viii) 分离的互补决定区(CDR);以及(ix) 可以任选地通过合成接头接合的两个或更多个分离的CDR的组合。此外,尽管Fv片段的两个结构域(V_L和V_H)由独立基因编码,但它们可以使用重组方法通过接头接合,所述接头能够使它们制成其中V_L和V_H区配对形成单价分子的单一蛋白质链(称为单链Fv(scFv));参见例如Bird等人,Science 242:423-426,1988,和Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883,1988)。可以使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段,并且可以对片段进行筛选以与完整抗体相同的方式使用。抗原结合片段可以通过重组DNA技术、完整免疫球蛋白的酶促或化学切割或在一些实施方案中通过本领域已知的化学肽合成程序产生。

[0057] 如本文所用,术语“间 α 抑制剂蛋白”或“IAIP”是指结构相关免疫调节蛋白的家族中的大的多组分糖蛋白。已显示IAIP在抑制蛋白酶(包括嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、纤溶酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、颗粒酶K、前蛋白转化酶、弗林蛋白酶、组织蛋白酶G和顶体酶)的阵列方面是重要的。除丝氨酸蛋白酶抑制活性之外,IAIP表现出广泛范围的抗炎机制,诸如结合至并灭活补体、细胞外组蛋白和凝血因子,下调促炎细胞因子诸如TNF- α 和IL-6,下调粘附因子诸如VCAM和ICAM,以及下调NF κ B。IAIP还重要地参与促进组织的保护和修复,其中重链转移至基质蛋白以促进细胞迁移和增殖。在人血浆中,IAIP以相对高的浓度(400-800mg/L)存在。与其他抑制剂分子不同,此抑制剂的家族通常包括通过硫酸软骨素链共价连接的多肽链(轻链和重链)的组合。IAIP的重链(H1、H2和H3)也称为透明质酸(HA)结合蛋白。人血浆中存在的IAIP的主要形式是间 α 抑制剂蛋白(I α I),其含有两条重链(H1和H2)和单一轻链(L);和前 α 抑制剂(P α I),其含有一条重链(H3)和一条轻链(L)。另一种IAIP是结合至糖胺聚糖的轻链(还称为bi-kunitz抑制剂),具有两个Kunitz结构域),其已知广泛抑制血浆和组织丝氨酸蛋白酶。另一种IAIP是重链相关分子H4,其在血液中循环而不连接至bikunin。又一种IAIP是重链相关分子H5。存在于血浆部分中的I α I和P α I具有约60kDa至约280kDa的表观分子量。

[0058] 如本文所用,术语“IAIP配体”是指体内或体外结合至IAIP的分子或其片段(例如,内毒素(LPS)、肝素、组蛋白、透明质酸、基质细胞蛋白(例如,玻连蛋白、纤连蛋白、肌腱蛋白C、层粘连蛋白、聚集蛋白聚糖)、血管假性血友病因子、正五聚蛋白-3(PTX3)、TNF刺激基因-6(TSG-6)、凝血因子(例如,因子IX和因子XIIIa)、补体组分、二价阳离子诸如Ca²⁺以及组织转谷氨酰胺酶)。IAIP配体还包括预测基于结构域结构结合至IAIP的分子(例如,具有结合至IAIP重链的血管假性血友病因子A结构域的RGD结构域的蛋白质)。用于本文所述的方法的IAIP配体包括结合至IAIP的重链、IAIP复合物或IAIP的GAG的配体(例如,不仅结合至bikunin的配体)。

[0059] 如本文所用,术语“IAIP特异性抗体”或“特异性结合至IAIP的抗体”是指包含免疫球蛋白分子的至少一部分,诸如重链和轻链或其配体结合部分的至少一个互补决定区(CDR)、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、框架区或其能够结合IAIP并且不特异性结合至任何其他蛋白质的任何部分的任何蛋白质或含肽分子。特异性结合至IAIP的抗体将结合至IAIP,并且提供至少为背景信号或噪音的两倍并且更通常为超过背景10至100倍的信号。

[0060] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指源自单一克隆的抗体,包括任何真核生物、原核生物或噬菌体克隆,而不是指产生所述抗体的方法。

[0061] 如本文所用,“药物组合物”或“药物制剂”是对减轻、治疗或预防疾病具有药理学活性或其他直接效果的组合物或制剂,和/或其最终剂型或配制品。所述组合物例如用于人使用(例如,根据药物或生物调节指南,诸如由F.D.A.和/或E.M.A.颁布的那些)。

[0062] 如本文所用,术语“药学上可接受的”是指适于与受试者(诸如哺乳动物(例如,人))的组织接触而没有过多毒性、刺激、变应性应答和与合理的效/险比相适应的其他有问题的并发症的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0063] 如本文所用,短语“降低发展的可能性”是指疑似患有特定疾病、综合征或病状(例如,本文所述的病状,诸如炎性疾病或感染)或以其他方式处于所述特定疾病、综合征或病状的风险,或者具有增加当前疾病、综合征或病状的程度或严重性的风险的患者(例如,人)(例如,患有社区获得性肺炎(CAP)的具有进展至严重社区获得性肺炎(sCAP)的风险的患者)的预防性治疗。

[0064] 如本文所用,术语“参考”是指用于与测试样品中的参数进行比较目的样品或标准的参数(例如,蛋白质水平、浓度、核酸表达水平和基因拷贝数)。例如,参考样品可以从健康个体(例如,未患有炎性疾病或感染的个体)获得。参考水平可以从一个或多个参考样品确定的分析物(例如,蛋白质(例如,IAIP)、核酸、碳水化合物等)的表达水平(或其平均值)或浓度。例如,参考可以是多个个体(例如,健康个体或未患有炎性疾病或感染的个体)的分析物(例如,IAIP)的平均水平(例如,平均值水平或中值水平)。在其他情况下,参考水平可以是预先确定的阈值水平,例如,如以其他方式确定的分析物的水平或浓度,例如通过经验测定所确定的。

[0065] 如本文所用,术语“样品”是指从受试者(例如,哺乳动物,诸如人)分离的样本(例如,血液、血液组分(例如,血清或血浆)、尿液、唾液、羊水、肺灌洗液、脑脊液、组织(例如,组织活检或组织匀浆)、胰液、滑液和细胞)。

[0066] 如本文所用,短语“特异性结合”是指确定蛋白质和其他生物分子的异质群体中分

析物(例如,蛋白质,诸如IAIP)的存在的结合反应。分析物可以是例如通过抗体或其抗原结合片段识别的抗原。待测量的分析物与结合剂(例如,抗体或抗原结合片段或配体)的特异性结合表现出小于100nM的 K_D 。例如,特异性结合至抗原(例如,IAIP)的抗体或其抗原结合片段以高达100nM(例如,1pM与100nM之间)的 K_D 结合至抗原。不表现出与特定抗原或其表位(例如,IAIP)的特异性结合的抗体或其抗原结合片段对于此特定抗原或其表位表现出大于100nM(例如,大于500nm、1 μ M、100 μ M、500 μ M或1mM)的 K_D 。各种免疫测定方式可以用于选择与特定蛋白或碳水化合物特异性免疫反应的抗体。例如,固相ELISA免疫测定常规地用于选择与蛋白质或碳水化合物特异性免疫反应的抗体。对于可以用于确定特异性免疫反应性的免疫测定方式和条件的描述,参见Harlow&Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York (1988) 和Harlow&Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York (1999)。

[0067] 如本文所用,术语“败血症”是指对于感染(在本文中是指“感染性败血症”)或与急性组织损伤和先天免疫活化相关联的非感染性过程(在本文中可互换地是指“无菌炎症”或“无菌败血症”)的系统性应答,其可以导致组织损害、器官衰竭或死亡。感染性败血症可能由细菌、病毒、真菌或其他微生物诸如寄生虫(例如,原生动物寄生虫)导致的感染引起。无菌败血症可能在失血性休克、多发伤、胰腺炎、移植排斥、自身免疫疾病、无机化合物、晶体、化学品或缺血/再灌注之后发生,并且不与已知感染的存在相关联。

[0068] 如本文所用,术语“受试者”是指哺乳动物,包括但不限于人或非人哺乳动物,诸如灵长类动物、牛、马、猪、绵羊、猫或犬科动物。所述受试者可以是患者。

[0069] 如本文所用,术语“治疗”是指减少或改善病症和/或与其相关联的症状。应理解,虽然未被排除在外,但是治疗病症或病状不需要完全消除病症或与其相关联的症状。

附图说明

[0070] 图1是描绘循环(例如,在血液中) IAIP (IaI和PaI) 和例如尿液中排出的游离轻链(LC, bikunin) 的结构示意图。IAIP的重链和轻链独特地通过糖胺聚糖(GAG) 连接。

[0071] 图2A是描绘竞争性IAIP ELISA测定的示意图。在此测定中,将纯化的IAIP固定到支持物,诸如多孔板,并且然后将生物样品和针对IAIP的标记的抗体(例如,MAb 69.26) 添加到纯化的IAIP。

[0072] 图2B是示出通过竞争性IAIP ELISA测定产生的数据的标准曲线的图。此测定提供基于样品中的IAIP与固定的纯化IAIP之间的竞争性抗体结合间接测量IAIP。较低的信号指示样品中的IAIP的量较高。

[0073] 图3A是描绘使用标记的IAIP配体(例如,生物素酰化的肝素或LPS) 的“夹心型”ELISA和使用所述ELISA生成的示例性标准曲线的示意图。在此形式的测定中,将对于IAIP特异性的抗体(例如,MAb69.26) 固定到支持物,诸如多孔板,并且然后将生物样品添加到含有固定抗体的支持物。如果IAIP存在于样品中,则它将结合至抗体,并且然后通过添加标记的IAIP配体进行检测。

[0074] 图3B和图3C是分别示出肝素-IAIP和内毒素(LPS)-IAIP夹心型ELISA的标准曲线的图。此测定提供IAIP浓度的直接测量,其中增加的信号指示样品中的IAIP的量较高。

[0075] 图4是示出使用如图2A中描绘的竞争性ELISA获得的IAIP浓度的测量值的图。在住

院期间连续几天测量来自患有严重社区获得性肺炎 (sCAP) 的患者的血浆样品中的IAIP,并且与正常对照受试者中的IAIP水平进行比较。竞争性ELISA产生患有sCAP的患者中250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和健康对照中330 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的平均IAIP浓度,并且在第0、1和3天发现患有sCAP的受试者与健康对照中的IAIP水平之间的显著差异。

[0076] 图5是示出使用如图3A中描绘的“夹心型”配体-IAIP ELISA获得的IAIP浓度的测量值的图。使用肝素作为IAIP配体生成图5中描绘的结果。还在此测定中测量使用图4中的竞争性ELISA评估的同一样品。肝素-IAIP ELISA产生患有sCAP的患者中125和150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与健康对照中422 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间的平均IAIP浓度,并且发现患有sCAP的受试者中的IAIP水平与健康对照之间的差异,所述差异比在所有时间点处使用竞争性ELISA观察到的差异在统计上更显著。

[0077] 图6是示出使用如图3A中描绘的“夹心型”配体-IAIP ELISA获得的IAIP浓度的测量值的图。使用LPS作为IAIP配体生成图6中描绘的结果。还在此测定中测量使用图4中的竞争性ELISA和图5中的肝素-IAIP ELISA评估的同一样品。LPS-IAIP ELISA产生患有sCAP的患者中118和145 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与健康对照中338 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间的平均IAIP浓度,并且发现患有sCAP的受试者中的IAIP水平与健康对照之间的差异,所述差异比在所有时间点处使用竞争性ELISA观察到的差异在统计上更显著。在增加的敏感性和患有sCAP的受试者中的IAIP水平与健康对照之间更可测量的差异方面,LPS-IAIP ELISA与肝素-IAIP ELISA可比较地进行。

[0078] 图7是示出肝素和IAIP特异性抗体 (MAb 69.26) 与IAIP的结合的一系列图。如中间图中所示,生物素酰化的肝素结合至纯化IAIP (250kDa $\text{I}\alpha\text{I}$ 和125kDa $\text{P}\alpha\text{I}$),但不结合至IAIP轻链bikunin或阴性对照人血清白蛋白。相比之下,MAb 69.26结合至纯化的IAIP和bikunin两者。这些数据表明肝素结合至IAIP的重链,这可以使得在肝素-IAIP ELISA中更准确地测量循环的完整IAIP。

[0079] 图8A至图8C是示出使用如图2A中描绘的竞争性ELISA和如图3A中描绘的“夹心型”配体-IAIP ELISA获得的IAIP浓度的测量值的一系列图。在来自患有严重肺炎、严重败血症的患者和在正常对照受试者中的血浆样品中测量IAIP。每个图下显示的是IAIP浓度的平均值 \pm SEM和所测试的患者样品的数量(在括号中)。如图8A所示,竞争性ELISA产生患有严重肺炎的患者中246 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、患有严重败血症的患者中250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和健康对照中330 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的平均IAIP浓度,并且发现患有严重肺炎的受试者中的IAIP水平与健康对照之间具有显著差异,但是患有严重败血症的受试者与健康对照之间没有显著差异。如图8B所示,LPS-IAIP ELISA产生患有严重肺炎的患者中141 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、患有严重败血症的患者中150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和健康对照中338 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的平均IAIP浓度,并且发现患有严重肺炎或严重败血症的受试者中的IAIP水平与健康对照之间具有显著差异。如图8C所示,肝素-IAIP ELISA产生患有严重肺炎的患者中145 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、患有严重败血症的患者中193 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和健康对照中422 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的平均IAIP浓度,并且发现患有严重肺炎或严重败血症的受试者中的IAIP水平与健康对照之间具有显著差异。在具有增加的敏感性和提供与竞争性ELISA相比统计上更显著的结果方面,LPS-IAIP ELISA与肝素-IAIP ELISA可比较地进行。

[0080] 图9是示出生物素酰化的LPS与固定的血浆衍生的IAIP、牛血清白蛋白 (BSA) 和IAIP特异性抗体MAb 69.26的IgG的结合的柱状图。LPS显示出与IAIP的明显结合,并且与MAb 69.26显示出很少或没有结合,MAb 69.26充当阴性对照。明显的是,LPS没有表现出与

IAIP轻链bikunin的结合,从而指示IAIP的重链可以促进与LPS的结合。

[0081] 图10是示出生物素酰化的IAIP与LPS、BSA、IAIP特异性抗体MAb 69.26的IgG和脱脂干燥奶粉的结合的柱状图。如所预期的,IAIP结合至MAb 69.26和LPS,并且显示与BSA和脱脂干燥奶粉的微小结合。这些数据确认了图9的结果。

[0082] 图11是示出pH对于生物素酰化的IAIP与LPS、BSA和IAIP特异性抗体MAb 69.26的IgG的结合的影响的柱状图。这些数据证明,IAIP在pH 5下最强地结合至LPS,在pH 6和pH 7下的结合减少,并且在pH 8或更高或pH 4或更低下的结合很少或没有结合。相比之下,IAIP在pH 5-pH 9下结合至MAb 69.26的IgG,但在pH 4或更低下不结合。如在先前的实验中,IAIP不结合至BSA。

[0083] 图12是示出盐(NaCl)浓度对于生物素酰化的IAIP与LPS、BSA和IAIP特异性抗体MAb 69.26的IgG的结合的影响的柱状图。这些数据示出IAIP与LPS和MAb 69.26的结合不受盐的影响,从而指示强的且特异性的结合。在任何所测试的盐浓度下没有观察到与BSA的结合。

[0084] 图13是示出非离子洗涤剂NP-40对于生物素酰化的IAIP与LPS、BSA和IAIP特异性抗体MAb 69.26的IgG的结合的影响的柱状图。IAIP与LPS的结合通过添加0.05%NP-40而增强,并且在1%NP-40的存在下仍然观察到,从而指示强结合相互作用。在任何所测试的NP-40浓度下没有观察到与BSA的结合。

[0085] 图14是示出非离子洗涤剂Tween-20对于生物素酰化的IAIP与LPS、BSA和IAIP特异性抗体MAb 69.26的IgG的结合的影响的柱状图。IAIP与LPS的结合通过添加0.05%Tween-20而增强,并且在1%Tween-20的存在下仍然观察到,从而指示强结合相互作用。在任何所测试的Tween-20浓度下没有观察到与BSA的结合。

[0086] 图15A至图15B是描绘在初始呈现时患有NEC(n=14)和SIP(n=13)的婴儿以及性别、体重和胎龄相匹配的健康对照(n=26)中的血液IAIP水平(图15A)和CRP(图15B)的柱状图。在患有已证明的NEC的婴儿中发现降低的IAIP水平(平均值±SD:139±21ug/mL),而健康对照中的水平(276±110ug/mL)或患有SIP的婴儿中的水平(319±72ug/mL)显著更高(p<0.05和p<0.005)。相比之下,患有SIP的婴儿中的IAIP水平与对照之间没有统计上显著的差异(p>0.4)。在测试CRP水平时,SIP、NEC与对照组之间没有发现显著差异(p>0.05)。

[0087] 图16A至图16B时描绘NEC婴儿中的IAIP和CRP的ROC曲线的图。IAIP水平的预测值是优异的,其中敏感性为100%,特异性为88.2%,PPV为41%并且NPV为100%(图16A),与之相比的CRP(图16B),敏感性为100%,特异性为64.7%,PPV为18%并且NPV为98%。

[0088] 图17是描绘患有NEC(n=8)和SIP(n=9)的婴儿中的血浆IAIP水平的纵向研究的结果的图。在疾病呈现发作之前和之后的时间处连续采集血液。在疾病发作之前患有SIP和NEC的婴儿组中均未发现IAIP水平的显著差异(p值>0.6),但是在发作之后多达10天,与患有SIP的婴儿中的水平相比,患有NEC的婴儿中的IAIP水平显著更低(p<0.04)。

[0089] 图18是基于横向流动免疫测定的IAIP快速测试的示意图。

[0090] 图19是描绘使用ESEQuant读取器的快速IAIP测试的标准曲线的图。每个点的值绘制为总计13个独立分析的平均值+SD。快速测试标准曲线适用于具有范围是17.5至1100μg/mL的IAIP水平的血浆样品。

[0091] 图20A至图20C是描绘通过使用ESEQuant读取器、Detekt读取器、iCalQ读取器的

IAIP快速测试获得的结果与通过建立的竞争性ELISA方式获得的结果之间的相关性的一系列图。

[0092] 图21A至图21B是描绘使用“夹心型”ELISA定量IAIP的一系列图,其中将透明质酸固定在96孔板上以捕获IAIP,并且使用生物素缀合的MAb 69.26(针对人IAIP的单克隆抗体)检测IAIP。所述测定可以用于使用50ng、100ng或200ng透明质酸/孔定量人血浆(图21A)和纯化IAIP(图21B)两者的系列稀释度的IAIP。

具体实施方式

[0093] 特征在于使用可以用于测量样品中的IAIP的量的试剂(例如,直接结合至样品中的IAIP的试剂,诸如IAIP配体,或结合至与IAIP结合的IAIP配体的试剂)测量样品(例如,来自受试者的样品,诸如血液样品)中的IAIP浓度的方法。试剂可以通过使用可检测标记测量。所述方法可以用于鉴定患有炎性疾病或病状或感染或者处于发展炎性疾病或病状或感染的风险的受试者,确定受试者的健康状态或疾病严重性,并且监测施用治疗剂(例如,IAIP或用于治疗炎性疾病或病状或感染的药剂)的受试者的病状治疗。

[0094] 用于定量IAIP的测定

[0095] 提供定量从受试者采集的一种或多种样品中的IAIP的方法。检测IAIP的先前方法依赖于基于抗体的竞争性ELISA,其提供样品中的IAIP浓度的间接测量。此方法检测完整IAIP复合物(例如,含有一条或多条重链(H1-H5)和轻链bikunin的IAIP)和单独的bikunin两者。相比之下,本文所述的方法使用一种试剂(例如,IAIP配体),其通过结合至IAIP重链、完整IAIP复合物的重链和轻链或IAIP复合物的GAG但不结合单独的bikunin来直接检测样品中的IAIP。

[0096] 不受理论的束缚,由于检测IAIP重链或完整IAIP复合物,本文所述的基于IAIP配体的测定表现出比竞争性ELISA更大的敏感性和稳健性。本发明的方法提供相对于检测切割的或降解的IAIP轻链的基于抗体的测定改进的样品中功能性IAIP量的读出。

[0097] 本文所述的方法包括使用IAIP配体来检测IAIP,例如底物(例如,固体支持物,例如,板、树脂、颗粒、容器、膜或珠粒)上捕获的IAIP,使用例如IAIP特异性剂,诸如抗体,使用IAIP配体来捕获随后用IAIP特异性抗体检测的IAIP,以及使用IAIP配体来捕获随后用第二不同IAIP配体检测的IAIP。

[0098] 可以用于检测样品中的完整IAIP的第一方法涉及附接到支持物并且用于捕获样品中的IAIP的IAIP结合剂(例如,IAIP特异性抗体或IAIP配体)。然后添加IAIP结合剂(例如,IAIP配体或IAIP特异性抗体),其结合至与IAIP结合剂形成复合物的IAIP。然后可以例如通过检测标记的存在来定量IAIP浓度,所述标记直接附接至IAIP检测剂或附接至结合至IAIP检测剂的试剂。

[0099] 可以用于检测样品中的IAIP的量的第二方法涉及检测体内形成并存在于样品中的IAIP-IAIP配体复合物。此方法还以使用附接至支持物的结合剂开始。结合剂可以结合至IAIP或IAIP配体。然后添加检测剂,其结合至IAIP-IAIP配体复合物的其他组分(例如,如果结合剂是针对IAIP,则检测剂是针对IAIP配体,并且相反,如果结合剂是针对IAIP配体,则检测剂是针对IAIP)。然后可以例如通过检测标记的存在来测量IAIP的浓度,所述标记直接或间接附接至检测剂。

[0100] 所述方法中使用的试剂和方法步骤在以下详细讨论。

[0101] IAIP配体

[0102] 用于本文所述的方法的IAIP配体包括结合至一条或多条IAIP重链、或一条或多条IAIP重链和轻链bikunin (例如,完整IAIP) 或IAIP的GAG (例如,完整IAIP中的GAG) 的配体。完整IAIP是含有至少一条IAIP重链 (H1、H2、H3、H4和/或H5) 和IAIP轻链 (bikunin) 的复合物。结合至IAIP的重链或完整IAIP的任何配体可以用于本文所述的方法中,包括例如内毒素 (脂多糖,LPS)、肝素、组蛋白、透明质酸、玻连蛋白、纤连蛋白、肌腱蛋白C、层粘连蛋白、聚集蛋白聚糖、血管假性血友病因子、正五聚蛋白-3 (PTX3)、TNF刺激基因-6 (TSG-6)、凝血蛋白 (例如,因子IX和因子XIIIa)、补体蛋白 (例如,C1q、C2、C3、C4、C5、C6、C8、备解素和因子D)、二价阳离子 (例如,Ca²⁺) 以及组织转谷氨酰胺酶。IAIP配体可以根据本领域已知的标准技术 (例如,使用以下所述的一种或多种可检测标记) 来标记。

[0103] IAIP抗体

[0104] 特异性结合至IAIP的抗体可以在本文所述的方法中用作结合剂或检测剂。特异性结合至IAIP的抗体是不特异性结合至除了IAIP以外的任何蛋白质的抗体或其抗原结合片段 (例如,IAIP特异性抗体与非IAIP蛋白的相互作用产生与背景相似的信号)。特异性结合至IAIP的抗体可以结合至IAIP的重链、IAIP的轻链、或两者或IAIP的GAG。优选地,抗体结合至IAIP的重链或含有重链和轻链的完整IAIP。抗体可以针对人IAIP或针对来自另一种哺乳动物 (例如,非人灵长类动物、牛、猪、绵羊、山羊、猫、狗、大鼠、小鼠、兔、豚鼠或表达IAIP的任何其他非人哺乳动物) 的IAIP来培养。特异性结合至IAIP的抗体可以仅结合人IAIP,或者可以能够结合来自人和其他哺乳动物的IAIP。抗体可以通过用IAIP免疫通常用于生成抗体的动物 (例如,兔、豚鼠、大鼠、小鼠、绵羊、驴、山羊、仓鼠和鸡) 来产生。IAIP特异性抗体可以是多克隆的 (例如,PAb R16、PAb R20、PAb R21)、单克隆的 (例如,MAb 69.26或MAb 69.31)、嵌合的或重组的。

[0105] 标记

[0106] 用于在本文所述的方法中检测IAIP的浓度的标记可以附接或缀合至IAIP配体、IAIP特异性抗体或本文所述的其他试剂。适用于检测IAIP配体、IAIP配体特异性抗体和/或IAIP特异性抗体的标记包括生物素、酶 (例如,辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶 (AP)、 β -半乳糖苷酶、乙酰胆碱酯酶和过氧化氢酶)、酶底物、放射性标记 (例如,放射性同位素)、发光化合物、颗粒 (例如,胶体金 (例如,金纳米颗粒)、磁颗粒或胶乳颗粒) 和荧光染料。然后标记可以通过使用酶缀合的抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白 (例如,缀合至AP或HRP的抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白以用于检测生物素) 和/或通过使用底物直接评定 (例如,通过荧光染料的成像、放射性的检测或颗粒的检测), 并且可以通过已知的方法和装置 (例如,分光光度计、荧光计、光度计或液体闪烁计数器) 可视化。底物可以是比色的 (例如,用于检测AP的PNPP; 或用于检测HRP的ABTS、OPD或TMB)、化学发光的或荧光的。底物还包括用于检测放射性的液体闪烁体。本领域已知的标准检测方法可以用于检测本文所述的标记。

[0107] 样品

[0108] 本文所述的方法可以使用来自受试者 (例如,人受试者) 的样品进行。合适的样品包括液体样品。例如,可以在来自受试者 (例如,患有炎性疾病或病状诸如败血症的受试者,或者处于发展炎性疾病或病状诸如败血症的风险的受试者) 的血液或血浆的样品中检测

IAIP。本文所述的方法还可以使用其他体液的样品进行,所述其他体液诸如尿液、脑脊液、滑液、羊水、间质液、卵泡液、腹膜液、支气管肺泡灌洗液、母乳、痰液、淋巴和胆汁。来自受试者的组织样品(例如,活检)可以在适当的缓冲液中匀化,以产生用于使用这些方法定量IAIP的“液体”。

[0109] 测定中使用的样品的体积将根据所进行的测定类型(例如,ELISA、横向流动免疫测定或另一种测定)和支持物类型(例如,板、膜、测试条或另一种支持物)而变化。所使用的样品的体积可以是约1 μ L至约500 μ L(例如,对于诸如横向流动免疫测定的测定,约1 μ L至约150 μ L,例如1 μ L至约30 μ L,或者对于诸如ELISA的测定,约50 μ L至约200 μ L)。样品可以在测定中使用之前用不干扰结合至检测剂或检测剂的结合的缓冲液(例如,水、PBS或测定方法中使用的缓冲液)稀释,并且可以1:2、1:3、1:4、1:5、1:10、1:15、1:20、1:100或更多地稀释。

[0110] 用于检测完整IAIP的方法

[0111] 第一IAIP定量测定涉及将含有IAIP的样品与IAIP结合剂(例如,特异性结合至IAIP的抗体或IAIP配体)接触以形成IAIP-结合剂复合物。IAIP结合剂可以附接至支持物(例如,固体支持物)。合适的支持物包括板(例如,多孔板)、颗粒(例如,磁颗粒、纳米颗粒、磁纳米颗粒)、生物芯片、树脂、膜(例如,硝酸纤维素膜、PVDF膜)、容器(例如,管)、测试条(例如,纤维素、玻璃纤维、硝酸纤维素)和珠粒(例如,蛋白质A或蛋白质G珠粒、磁珠粒、玻璃珠粒、塑料珠粒)。支持物优选地能够洗涤一次或多次(例如,使用缓冲液,诸如TBS、TBS-T、PBS或PBS-T)以去除不结合至IAIP结合剂的材料。

[0112] 然后将IAIP-结合剂复合物与IAIP检测剂(例如,IAIP配体或特异性结合至IAIP的抗体)接触。IAIP检测剂可以缀合至标记(例如,以下所述的一种或多种标记),所述标记然后可以使用已知的检测方法检测。可替代地,可以在不使用标记的情况下检测IAIP检测剂。在添加IAIP检测剂之后,可以进行额外的洗涤步骤(例如,一个或多个)以去除未结合的检测剂。

[0113] 然后可以基于来自缀合标记或附接的检测剂的信号(例如,酶活性或荧光)使用本领域已知的标准技术来测量IAIP。如果使用酶作用标记,则可以添加底物来产生信号(例如,颜色变化),并且可以通过适用于检测信号的装置(诸如分光光度计)来读取。信号(例如,吸光度或荧光)可以针对具有已知的IAIP浓度的标准物来绘图,以建立标准曲线或者可以针对已知的参考浓度来比较。可以计算样品中的未知浓度,并且基于建立的标准曲线或参考浓度值来确定。

[0114] 在将样品添加至IAIP结合剂之前,可以进行封闭步骤以预防或减少非特异性结合。用于本文所述的方法的封闭剂包括例如奶、BSA、酪蛋白、明胶(例如,鱼明胶)和血清(例如,山羊血清、驴血清、马血清、胎牛血清)等。

[0115] 方法步骤可以在pH 7.0至3.5(例如,pH 5.0至pH 3.5,例如,pH 4.0)下进行。例如,结合步骤和检测步骤中的任一者或两者可以在pH 7.0至3.5(例如,pH 5.0至pH 3.5,例如,pH 4.0)下进行。IAIP结合剂可以在pH 7.0至3.5(例如,pH 5.0至pH 3.5,例如,pH 4.0)下在缓冲液中制备,并且/或者IAIP检测剂(例如,IAIP配体)可以在pH 7.0至3.5(例如,pH 5.0至pH 3.5,例如,pH 4.0)下在缓冲液中制备。低pH缓冲液(例如,pH 5.0或更低,例如pH 4.0)可以用于改进IAIP的检测。

[0116] 另外,为了在测定期间稳定IAIP,可以在与IAIP结合剂接触之前或期间将二价阳

离子(例如, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 等)添加到样品中,并且/或者在与结合剂-IAIP复合物接触之前或期间添加到含有检测剂的缓冲液中。二价阳离子可以 $1\mu\text{M}$ 至 1M (例如, $100\mu\text{M}$ 至 100mM , 1mM 至 10mM)的浓度提供。

[0117] a) IAIP特异性抗体结合剂和IAIP配体检测剂

[0118] 在本文所述的方法的一个实例中, IAIP结合剂是特异性结合至IAIP的抗体(例如, MA b 69.26或MA b 69.31),并且所述检测剂是标记的IAIP配体(例如,肝素、透明质酸或LPS)。可替代地,所述配体可以是未标记的,并且使用对于IAIP配体特异性的标记抗体检测,或者未标记的配体可以使用对于IAIP配体特异性的未标记的抗体检测,所述未标记的抗体然后使用标记的第二抗体(例如,结合至对于IAIP配体特异性的抗体但不结合至IAIP抗体的标记的第二抗体,例如, IAIP抗体和IAIP配体抗体在不同的宿主物种中生成)检测。如果配体是未标记的并且通过使用标记的配体特异性抗体、或配体特异性抗体和标记的第二抗体检测,则可以在与每种抗体温育之前和/或之后进行额外的洗涤步骤。

[0119] b) IAIP配体结合剂和IAIP特异性抗体检测剂

[0120] 在本文所述的方法的另一个实例中, IAIP结合剂是IAIP配体(例如,肝素、透明质酸或LPS),并且检测剂是对于IAIP特异性的抗体(例如, MA b 69.26或MA b 69.31)。在此实例中,对于IAIP特异性的抗体可以直接缀合至标记,或者抗体可以使用结合至IAIP特异性抗体的标记的第二抗体检测。如果使用标记的第二抗体,则可以在与第二抗体温育之后进行洗涤步骤以在IAIP测量之前最小化非特异性信号。

[0121] c) IAIP配体结合剂和IAIP配体检测剂

[0122] 在本文所述的方法的第三实例中,结合剂是IAIP配体(例如,透明质酸),并且检测剂是结合至IAIP的不同区域的标记的IAIP配体(例如,肝素、透明质酸或LPS)。此方法可以用不结合至IAIP的相同区域的任何两种IAIP配体(例如,不竞争结合至IAIP或者IAIP配体中的一者的结合不在空间上阻碍第二IAIP配体与IAIP的结合的两种IAIP配体)进行。充当IAIP检测剂的配体可以是未标记的,并且使用对于充当检测剂的IAIP配体特异性的标记抗体检测,或者它可以通过结合至未标记的抗体的标记的第二抗体检测,所述未标记的抗体对于充当检测剂的IAIP配体具有特异性。如果标记的抗体用于检测充当检测剂的IAIP配体,则可以在与每种抗体温育之前和/或之后进行额外的洗涤步骤。

[0123] d) IAIP特异性抗体结合剂和IAIP特异性抗体检测剂

[0124] 在本文所述的方法的第四实例中,结合剂是IAIP特异性抗体,并且检测剂是标记的IAIP特异性抗体。在此实例中, IAIP特异性抗体中的至少一种能够结合至完整IAIP或包含至少一条重链的IAIP(例如,抗体不结合至bikunin,除非存在至少一条IAIP重链,例如,抗体不结合至缺乏bikunin的切割的或降解的IAIP)。另外,测定中使用的两种IAIP特异性抗体结合IAIP的不同表位(例如,抗体不竞争结合至IAIP)。如果两种IAIP特异性抗体使用不同的宿主物种生成,则用作检测剂的IAIP特异性抗体可以是未标记的并且使用标记的第二抗体检测。如果使用标记的第二抗体,则可以在与标记的第二抗体温育之前和/或之后进行额外的洗涤步骤。

[0125] e) 使用快速横向流动免疫测定(LFIA)定量IAIP

[0126] 在第五实例中,本文所述的方法可以使用基于横向流动免疫测定的测试进行。在此实例中,可以将小体积的样品(例如, $1-30\mu\text{L}$, 例如, $15\mu\text{L}$)以未稀释形式或以稀释形式(例

如,1:2、1:5、1:10、1:20、1:100或更多地稀释,例如用缓冲液(例如,PBS)或水)施加至测试条(例如,纤维素、玻璃纤维或硝酸纤维素),并且然后添加缓冲液以将样品推动通过所述条。所述条含有IAIP结合剂(例如,IAIP特异性抗体或IAIP配体),以结合至样品中的IAIP。IAIP可以使用IAIP检测剂(例如,标记的IAIP特异性抗体或标记的IAIP配体)检测,所述IAIP检测剂可以在添加样品之前、之后或与其同时添加到所述条。测试条可以使用用于定量附接至IAIP检测剂的标记的适当读取器(例如,便携式台式横向流动读取器、手持式基于PDA的读取器或基于智能手机/平板电脑的读取器等)读取。结合剂和检测剂组合的选择可以基于本文所列出的参数进行。此测定可以快速进行(例如,在15分钟或更少内,诸如15、10或7分钟或更少),并且提供对小样品体积中的IAIP的定量且快速的测量。

[0127] 天然存在的IAIP-IAIP配体复合物的检测

[0128] 还提供用于检测天然存在的IAIP-IAIP配体复合物(例如,在受试者(例如,人受试者)中体内形成并且存在于来自受试者的样品中的IAIP-IAIP配体复合物)的方法。此方法涉及将样品(例如,液体样品,诸如血浆、血清、血液、支气管肺泡液、脑脊液、痰液、尿液或其他体液)与结合剂(例如,附接至支持物(例如,固体支持物)的结合剂)接触。结合剂可以是IAIP结合剂(例如,特异性结合至IAIP的抗体,例如MAb 69.26或MAb 69.31,或IAIP配体),或者结合剂可以是特异性结合至感兴趣的IAIP配体(例如,疑似在体内形成IAIP-IAIP配体复合物的IAIP配体)的抗体。合适的支持物包括板(例如,多孔板)、颗粒(例如,磁颗粒、纳米颗粒、磁纳米颗粒)、生物芯片、树脂、容器(例如,管)、膜(例如,硝酸纤维素膜、PVDF膜)、测试条(例如,纤维素、玻璃纤维或硝酸纤维素)和珠粒(例如,蛋白质A或蛋白质G珠粒、磁珠粒、玻璃珠粒、塑料珠粒)。支持物优选地能够洗涤一次或多次(例如,使用缓冲液,诸如TBS、TBS-T、PBS或PBS-T)以去除不结合至结合剂的材料。

[0129] 如果测定中使用的结合剂是IAIP结合剂(例如,特异性结合至IAIP的抗体,例如MAb 69.26或MAb 69.31,或IAIP配体),则IAIP-IAIP配体复合物可以使用作为针对感兴趣的IAIP配体的抗体的检测剂通过将抗体与IAIP复合物-结合剂复合物接触来检测。如果测定中使用的结合剂是特异性结合至感兴趣的IAIP配体的抗体,则IAIP-IAIP配体复合物可以使用特异性结合至IAIP的检测剂(例如,特异性结合至IAIP的抗体,例如MAb 69.26或MAb 69.31,或不同的IAIP配体)通过将检测剂与IAIP复合物-结合剂复合物接触来检测。

[0130] 洗涤步骤(例如,一个或多个)可以在与检测剂温育之后进行。另外,在将样品添加至IAIP或IAIP配体结合剂之前,可以进行封闭步骤以预防或减少非特异性结合。用于本文所述的方法的封闭剂包括例如奶、BSA、酪蛋白、明胶(例如,鱼明胶)和血清(例如,山羊血清、驴血清、马血清、胎牛血清)等。

[0131] 如果检测剂是抗体(例如,IAIP特异性抗体或IAIP配体特异性抗体),则检测剂可以直接缀合至标记(例如,以上所述的标记),或者检测剂可以通过添加不结合至测定中使用的任何其他抗体的标记的第二抗体(例如,结合剂,如果是抗体的话)来可视化。

[0132] 如果检测剂是配体(例如,IAIP配体,诸如与测定中所检测的不同的IAIP配体),则检测剂可以直接缀合至标记(例如,以上所述的标记),或使用标记的配体特异性抗体检测,然后检测所述标记的配体特异性抗体。可替代地,检测剂可以使用未标记的配体特异性抗体和不结合至测定中使用的任何其他抗体的标记的第二抗体(例如,结合剂,如果是抗体的话)检测。如果检测剂未标记并且使用额外的试剂(例如,标记的第一或第二抗体),则可以

在与额外的试剂温育之后进行一个或多个洗涤步骤以最小化非特异性信号。标记可以用于使用相同的底物和以上提及的成像方法测量IAIP-IAIP配体复合物的浓度。来自样品的信号可以与具有已知浓度的IAIP-IAIP配体复合物的一个或多个样品中测量的信号进行比较(例如,以建立标准曲线)。样品中的未知浓度可以基于建立的标准曲线或基于已知的参考浓度值计算。

[0133] 如果IAIP-IAIP配体复合物中的IAIP配体的身份是未知的,则所述方法可以使用特异性结合至IAIP的抗体(例如,结合至完整IAIP和/或IAIP重链的抗体)作为结合剂进行。然后检测步骤可以通过以下进行:添加对于不同的IAIP配体具有特异性的标记的第二抗体,在与标记的第二抗体温育之后洗涤,并且检测来自标记的信号以确定IAIP-IAIP配体复合物中的IAIP配体的身份。可以添加标记的抗体并且单个地针对IAIP配体识别进行评估,或者如果不同标记的附接或缀合到每种抗体(例如,不同的荧光染料),则它们可以同时添加。一旦鉴定了IAIP配体,则可以如本文所述定量样品中的IAIP-IAIP配体复合物的量。

[0134] 定量测定中捕获的IAIP

[0135] IAIP或IAIP-IAIP配体复合物可以通过使用感兴趣的样品以及用于产生标准曲线的含有已知量的IAIP或IAIP-IAIP配体复合物的样品进行本文所述的检测方法来定量。来自受试者的样品可以与已知量的IAIP或IAIP-IAIP配体复合物同时测量,使得可以确定样品中的IAIP或IAIP-IAIP配体复合物的浓度。可以将来自受试者的样品中的浓度与在对照群体中使用相同测定测量的IAIP或IAIP-IAIP配体复合物的平均浓度进行比较,所述对照群体诸如健康对照,以确定样品中的IAIP的浓度是否落在正常范围,或患病对照,以确定样品中的IAIP的浓度是否落在疾病状态的范围。

[0136] 还可以通过使用本文所述的方法在同一时间测量测试样品和对照样品两者中的IAIP或IAIP-IAIP配体复合物来将来自受试者的样品中的IAIP或IAIP-IAIP配体复合物浓度与健康对照中的IAIP或IAIP-IAIP配体复合物浓度进行比较。对照样品包括来源于相同原材料的那些(例如,测试样品和对照样品两者均来源于相同的体液或相同的组织类型)。除来源于相同的原材料之外,测试样品和对照样品还可以从相同年龄和/或相同性别的受试者采集,以最小化受试者之间的可能变化。如果直接比较受试者与健康对照之间的IAIP浓度,则与健康对照相比受试者中的IAIP浓度降低25%或更多指示受试者患有炎性疾病或病状或感染或者处于发展炎性疾病或病状或感染的风险。

[0137] 可替代地,可以将来自受试者的样品中的IAIP或IAIP-IAIP配体复合物浓度与在未知条件下(例如,健康状态或疾病状态)的IAIP或IAIP-IAIP配体复合物浓度的预先确定的截断值进行比较。截断值可以是由正常受试者或疾病受试者的群体确定的IAIP或IAIP-IAIP配体复合物的平均浓度。

[0138] 使用本文所述的方法,已发现健康对照受试者具有血浆中的 $400 \pm 140 \mu\text{g}/\text{mL}$ IAIP,虽然也在健康受试者中观察到更高的浓度。已发现患有严重炎性疾病的受试者具有低于约 $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的IAIP的平均浓度。约 $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的IAIP浓度可以用作截断值以将受试者归类为患有疾病或病状(例如,炎性疾病或病状或感染)或处于发展所述疾病或病状的风险。然后将此归类用于推荐受试者进行治疗或进一步的诊断测试。具有中等至低水平的IAIP(例如, 300 至 $200 \mu\text{g}/\text{mL}$)的受试者可以受益于随时间推移的重复测试(例如,每周一次、每月两次、每月一次、每两月一次、每年三次或每年两次),以确定IAIP水平是恒定的或改变

的(例如,增加的或降低的),因为这些水平可以指示发展炎性疾病或病状或感染的风险,炎性疾病或病状或感染的存在,或者它们可能代表受试者的正常基线水平。

[0139] 使用IAIP和IAIP-IAIP配体复合物检测测定确定疾病状态或疾病风险的方法

[0140] 本文所述的IAIP和IAIP-IAIP配体复合物检测方法可以用于测量各种受试者(诸如患有或疑似患有疾病或病状(例如,炎性疾病或病状或感染(例如,细菌感染))的受试者)中的IAIP和/或IAIP-IAIP配体复合物。这种受试者中的IAIP和IAIP-IAIP配体复合物的水平可以使用以上测定中的任一种评定,例如用于诊断受试者中疾病或病状的存在或者受试者正在发展或将发展疾病或病状的风险或者监测受试者的疾病或病状的发展或解决的目的。

[0141] 可以例如使用测定方法诊断或监测的炎性疾病或病状包括例如急性炎性疾病、败血症、败血症性休克、系统性炎性应答综合征(SIRS)、创伤和/或损伤(例如,伤口、烧伤、割伤、挫伤、骨折、外科手术)、中风(例如,缺血性中风、失血性中风)、急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、肺炎(例如,严重肺炎,严重或非严重:社区获得性肺炎、医院获得性肺炎、疗养院获得性肺炎)、坏死性小肠结肠炎、急性胰腺炎、肾疾病(例如,急性肾损伤、肝损伤、急性循环衰竭)、子痫前期、癌症、癌症转移、肿瘤浸润、外周动脉疾病、1型或2型糖尿病、动脉粥样硬化性心血管疾病、间歇性跛行、严重肢体缺血性疾病、心肌梗塞、颈动脉闭塞、脐带闭塞、低出生体重、早产、手术引起的炎症、脓肿引起的炎症、肺功能不全、周围神经病变、缺氧缺血(例如,新生儿缺氧缺血性脑损伤或缺氧缺血性脑病)、组织缺血(例如,骨骼肌、平滑肌、心肌、脑、皮肤间充质组织、结缔组织、胃肠组织或骨缺血)、类风湿性关节炎、脑膜炎、多发性硬化症、炎性肠病(例如,克罗恩氏病)、慢性阻塞性肺病、鼻炎、未足月产或感染性疾病(例如,流感或病毒感染,例如登革热或西尼罗热)。

[0142] 可以例如使用测定方法诊断或监测的感染包括例如以下细菌的感染:革兰氏阴性细菌,诸如奈瑟氏菌属(*Neisseria*)物种,包括淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)和脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*);布兰汉氏菌属(*Branhamella*)物种,包括粘膜炎布兰汉氏菌(*Branhamella catarrhalis*);埃希氏菌属(*Escherichia*)物种,包括大肠杆菌(*Escherichia coli*);肠杆菌属(*Enterobacter*)物种;变形杆菌属(*Proteus*)物种,包括奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*);假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种,包括铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、鼻疽假单胞菌(*Pseudomonas mallei*)和类鼻疽假单胞菌(*Pseudomonas pseudomallei*);克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)物种,包括肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*);沙门氏菌属(*Salmonella*)物种;志贺氏菌属(*Shigella*)物种;沙雷氏菌属(*Serratia*)物种;不动杆菌属(*Acinetobacter*)物种;嗜血杆菌属(*Haemophilus*)物种,包括流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)和杜克雷嗜血杆菌(*Haemophilus ducreyi*);布鲁氏菌属(*Brucella*)物种;耶尔森氏菌属(*Yersinia*)物种,包括鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)和小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*);弗朗西斯氏菌属(*Francisella*)物种,包括土拉热弗朗西斯氏菌(*Francisella tularensis*);巴氏杆菌属(*Pasteurella*)物种,包括多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*);霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*);黄杆菌属(*Flavobacterium*)物种,脑膜败血性黄杆菌(*meningosepticum*);弯曲菌属(*Campylobacter*)物种,包括空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*);拟杆菌属(*Bacteroides*)物种(口腔,咽),包括脆弱拟杆菌

(*Bacteroides fragilis*);梭杆菌属(*Fusobacterium*)物种,包括具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*);肉芽肿鞘杆菌(*Calymmatobacterium granulomatis*);链杆菌属(*Streptobacillus*)物种,包括念珠状链杆菌(*Streptobacillus moniliformis*);以及军团菌属(*Legionella*)物种,包括嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)。

[0143] 本文所述的测定可以用于测量处于发展炎性疾病或病状或感染的风险的受试者中的IAIP水平。风险因子包括免疫抑制、免疫缺陷(例如,免疫不全的受试者)、高龄、烧伤(例如,热烧伤)、创伤、手术、异物、癌症、早产(例如,新生儿过早出生)、肥胖和代谢综合征。

[0144] 本文所述的方法可以作为常规体检的一部分或作为综合健康评定进行。

[0145] 疾病状态或疾病风险的诊断

[0146] 本文所述的测定可以与传统诊断方法一起用于确定受试者是否患有炎性疾病或病状或感染或者处于发展炎性疾病或病状或感染的风险。使用所述测定获得的IAIP测量值还可以用于确定患者是否是用于用IAIP进行治疗或者抗炎或抗感染疗法,或用于预测对于施用IAIP的应答(例如,具有低水平的IAIP的患者可以用IAIP治疗和/或可以有利地对用IAIP进行的治疗做出应答)的候选者。如果认为适当(例如,如果确定IAIP水平是低的,例如比健康受试者中所认为的正常IAIP水平至少低25%,或者如果IAIP水平低于200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), IAIP的测量之后可以向受试者施用IAIP,一种抗炎或抗感染疗法。

[0147] 来自受试者的样品中IAIP和/或IAIP-IAIP配体复合物的测量可以用于确定受试者是否患有炎性疾病或病状或感染或者处于发展炎性疾病或病状或感染的风险。所述方法包括使用以上所述的方法中的一种测量IAIP和/或IAIP-IAIP配体复合物的水平,并且将所述值与对照值(例如,来自健康患者的参考样品或从外观健康患者的群体的测量获得的平均值)进行比较。与健康对照相比受试者中的IAIP水平降低(例如,受试者中与对照相比低25%、30%、40%、50%或更多的水平)或约250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更低的IAIP浓度指示,受试者患有炎性疾病或病状或感染或者处于发展炎性疾病或病状或感染的风险。与健康对照相比受试者中的IAIP-IAIP配体复合物水平升高(例如,受试者中与对照相比高5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%或更多的水平)指示,受试者患有炎性疾病或感染或者处于发展炎性疾病或感染的风险。

[0148] 结合至天然存在的IAIP-IAIP配体复合物中的IAIP的配体的身份还提供对于受试者患有或处于发展风险的炎性疾病或感染的类型的了解。例如,检测到来自受试者的样品中IAIP-LPS复合物的水平升高可能指示,受试者患有感染(例如,细菌感染)或处于发展所述感染的风险,并且检测到来自受试者的样品中IAIP-组蛋白复合物的水平升高可能指示,受试者患有急性系统性炎性疾病(例如,败血症或中风)或处于发展所述急性系统性炎性疾病的风险。此类测量可以用于诊断患有特定炎性疾病或感染的受试者,或者用于推荐疗法或治疗过程。

[0149] 疾病严重性

[0150] 本文所述的方法还可以用于评估疾病严重性。具有低于约200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的IAIP浓度(如使用本文所述的测定所测量的)的受试者可以归类为患有严重炎症或感染或者处于发展严重炎症或感染的风险,或者归类为具有更大的发病率和/或死亡率风险。可替代地,具有升高水平的IAIP-IAIP配体复合物(如使用本文所述的测定所测量的)的受试者(例如,具有与健康对照或已知的参考浓度值相比高10%、20%、30%、40%、50%或更多的IAIP-IAIP

配体复合物(诸如IAIP-LPS复合物)水平的受试者)可以归类为患有严重炎症或感染或者处于发展严重炎症或感染的风险,或者归类为具有更大的发病率和/或死亡率风险。一旦评定了严重性,就可以推荐对应的治疗过程。可以选择具有指示严重炎症的IAIP浓度的受试者进行比IAIP浓度指示患有或发展炎性疾病或病状的中等或低风险的受试者更频繁或更积极的治疗。本文所述的测定可以用于测量完整IAIP,并且因此,它们可以用于检测威胁生命的病状并评定对于适当治疗性应答的需要。

[0151] 监测

[0152] 先前患有炎性疾病或病状或感染或者处于发展炎性疾病或病状或感染的风险的受试者(例如,具有遗传倾向的受试者,暴露于患有疾病或感染的其他者的受试者,或具有以上所述的风险因子中的任一种的受试者)可以使用本文所述的方法进行监测。对于具有中等至低IAIP水平(例如,300至200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的受试者和/或具有稍微升高水平的IAIP-IAIP配体复合物的受试者(例如,具有与健康对照或已知参考浓度值相比1%、5%或10%更高的IAIP-IAIP配体复合物诸如IAIP-LPS复合物水平的受试者),特别是当受试者未呈现炎症或感染的明显症状时,监测也可以是一种合适方法。IAIP和/或IAIP-IAIP配体复合物测量可以定期间隔(例如,一年一次、一年两次、每三个月一次、每月一次、每月两次或每周一次)进行,以确定IAIP和/或IAIP-IAIP配体复合物是否是恒定的或改变的。IAIP水平增加和/或IAIP-IAIP配体复合物水平降低可能指示改善并且使监测和/或治疗停止。IAIP水平降低和/或IAIP-IAIP配体复合物水平增加可能指示恢复中的受试者复发或炎性疾病或感染的发展或恶化,并且可能使得进行诊断测试(例如,以更大的频率)和治疗的开始或者增加或改变。

[0153] 治疗功效

[0154] 本文所述的方法还可以用于针对炎性疾病或病状或感染评估正在治疗的受试者的治疗功效(例如,用抗生素、抗炎剂、抗感染剂或IAIP)。可以在治疗开始之前或之后测量IAIP水平,并且然后在治疗期间以持续基础(例如,一天一次、一周一次、两周一次、一个月一次、两月一次、每三月一次或一年两次)测量。在治疗过程期间IAIP水平增加(例如,相对于之前的测量增加1%、5%、10%、20%、30%或更多)将指示改善并证明治疗的有效性,而IAIP水平恒定或降低(例如,相对于之前的测量未显示改变或显示1%、5%、10%、20%、30%或更多降低的一个或多个测量)指示缺乏改善并且表明应修改或改变治疗过程(例如,增加剂量或频率或两者,改变为不同的治疗剂,或者修改以包括额外的治疗剂)。

[0155] 作为替代方案,或除测量IAIP之外,检测IAIP-IAIP配体复合物(例如,IAIP-LPS)可以用于评估用于治疗炎性疾病或感染或降低炎性疾病或感染的风险的疗法的治疗功效。所述方法包括在治疗开始之前或之后测量经受疗法的受试者中作为生物标记物的IAIP-IAIP配体复合物的水平,并且然后在治疗期间以持续基础(例如,一天一次、一周一次、两周一次、一个月一次、两月一次、每三月一次或一年两次)测量。可以将IAIP-IAIP配体复合物的水平与对照值(例如,来自健康患者的参考样品或从对照受试者(例如,健康患者)的群体的测量获得的平均值)或与从所述受试者获取的之前测量进行比较。IAIP-IAIP配体复合物的水平朝向“正常水平”降低或在治疗期间在随后的时间点降低(例如,相对于之前的测量降低1%、5%、10%、20%、30%或更多)指示疗法是有效的。IAIP-IAIP配体复合物水平增加(例如,相对于之前的测量或“正常水平”增加1%、5%、10%、20%、30%或更多)指示治疗是

无效的并且需要修改(例如,更高剂量、更频繁的施用或两者或不同的治疗或组合疗法)。

[0156] 治疗方法

[0157] 本发明的特征还在于在根据本文所述的诊断方法已确定有需要的受试者(例如,具有与参考相比或与之前的测量相比低IAIP水平和/或升高水平的IAIP-IAIP配体复合物的受试者)(例如,人)中治疗、预防炎性疾病或病状或感染(例如,严重感染)或降低发展炎性疾病或病状或感染的风险的方法。所述受试者可以用对于疾病或病状的适当的护理标准治疗剂和/或IAIP进行治疗。所述受试者可以是新生儿、儿童、青少年或成年人。

[0158] 在向有需要的受试者施用IAIP或另一种治疗剂之前,可以根据本文所述的方法测量来自受试者的样品中的IAIP浓度。作为替代方案或除测量IAIP水平之外,所述方法可以包括在施用IAIP之前检测IAIP-IAIP配体复合物。例如,所述方法可以包括检测患有或疑似患有细菌感染(例如,革兰氏阴性细菌感染)的受试者中的IAIP-LPS复合物,和/或测量来自所述受试者的样品中的IAIP浓度,以及向受试者施用IAIP(例如,向具有与健康对照或参考值相比增加水平的IAIP-LPS复合物(例如,比健康对照中的IAIP-LPS复合物水平高1%、5%、10%、20%、30%或更多的水平)的受试者施用IAIP,或向具有系统性炎症或休克综合征的风险的受试者(例如,具有低于健康对照的IAIP水平至少25%的IAIP水平的受试者)施用IAIP)。

[0159] 可以向有需要的受试者(例如,通过使用本文所述的方法中的一种或多种确定)施用IAIP或含有IAIP的组合物。可以用IAIP治疗的受试者包括患有感染(例如,革兰氏阴性细菌感染)的受试者或处于发展感染的升高风险的受试者(例如,具有一种或多种风险因子的受试者,所述风险因子包括免疫抑制、免疫缺陷(例如,免疫不全的受试者)、高龄、烧伤(例如,热烧伤)、创伤、手术、异物、癌症、新生产(例如,新生儿)、早产(例如,新生儿过早出生)、肥胖和代谢综合征)。感染可能产生通过从感染的革兰氏阴性细菌释放脂多糖(LPS)分子触发的内毒素。由革兰氏阴性细菌产生的严重感染可能导致严重系统性炎症、败血症、休克综合征和死亡。如本文所示,IAIP结合至LPS,并且因此施用IAIP可以用于治疗感染革兰氏阴性细菌的受试者以降低或预防LPS诱导的细胞毒性。

[0160] 适用于用IAIP治疗的感染包括以下细菌导致的感染:革兰氏阴性细菌,诸如奈瑟氏菌属(*Neisseria*)物种,包括淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)和脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*);布兰汉氏菌属(*Branhamella*)物种,包括粘膜炎布兰汉氏菌(*Branhamella catarrhalis*);埃希氏菌属(*Escherichia*)物种,包括大肠杆菌(*Escherichia coli*);肠杆菌属(*Enterobacter*)物种;变形杆菌属(*Proteus*)物种,包括奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*);假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种,包括铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、鼻疽假单胞菌(*Pseudomonas mallei*)和类鼻疽假单胞菌(*Pseudomonas pseudomallei*);克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)物种,包括肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*);沙门氏菌属(*Salmonella*)物种;志贺氏菌属(*Shigella*)物种;沙雷氏菌属(*Serratia*)物种;不动杆菌属(*Acinetobacter*)物种;嗜血杆菌属(*Haemophilus*)物种,包括流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)和杜克雷嗜血杆菌(*Haemophilus ducreyi*);布鲁氏菌属(*Brucella*)物种;耶尔森氏菌属(*Yersinia*)物种,包括鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)和小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*);弗朗西斯氏菌属(*Francisella*)物种,包括土拉热弗朗西斯氏菌

(*Francisella tularensis*);巴氏杆菌属(*Pasturella*)物种,包括多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*);霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*);黄杆菌属(*Flavobacterium*)物种,脑膜败血性黄杆菌(*meningosepticum*);弯曲菌属(*Campylobacter*)物种,包括空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*);拟杆菌属(*Bacteroides*)物种(口腔,咽),包括脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*);梭杆菌属(*Fusobacterium*)物种,包括具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*);肉芽肿鞘杆菌(*Calymmatobacterium granulomatis*);链杆菌属(*Streptobacillus*)物种,包括念珠状链杆菌(*Streptobacillus moniliformis*);以及军团菌属(*Legionella*)物种,包括嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)。

[0161] 确定需要治疗(例如,通过使用本文所述的方法中的一种或多种)或在确定这种需要之后可以用IAIP治疗的受试者还可以包括患有炎性疾病或病状或者处于发展炎性疾病或病状的风险的受试者,所述炎性疾病或病状诸如急性炎性疾病、败血症、败血症性休克、无菌败血症、系统性炎性应答综合征(SIRS)、创伤/损伤(例如,伤口、烧伤、割伤、挫伤、骨折、外科手术)、中风(例如,缺血性中风、失血性中风)、急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、肺炎(例如,严重肺炎,严重或非严重:社区获得性肺炎、医院获得性肺炎、疗养院获得性肺炎)、坏死性小肠结肠炎、急性胰腺炎、肾疾病(包括,急性肾损伤、肝损伤、急性循环衰竭)、子痫前期、癌症、癌症转移、肿瘤浸润、外周动脉疾病、1型或2型糖尿病、动脉粥样硬化性心血管疾病、间歇性跛行、严重肢体缺血性疾病、心肌梗塞、颈动脉闭塞、脐带闭塞、低出生体重、早产、手术引起的炎症、脓肿引起的炎症、肺功能不全、周围神经病变、缺氧缺血(例如,新生儿缺氧缺血性脑损伤或缺氧缺血性脑病)、组织缺血(例如,骨骼肌、平滑肌、心肌、脑、皮肤间充质组织、结缔组织、胃肠组织或骨缺血)、类风湿性关节炎、脑膜炎、多发性硬化症、炎性肠病(例如,克罗恩氏病)、慢性阻塞性肺病、鼻炎、未足月产或感染性疾病(例如,流感或病毒感染,例如登革热或西尼罗热);具有低IAIP水平(例如,250、225、200、175、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更低的IAIP水平)的受试者,以及具有增加水平的疾病相关IAIP-IAIP配体复合物(例如,IAIP-LPS或IAIP-组蛋白)的受试者。

[0162] 施用

[0163] 可以通过任何合适的途径向根据本文所述的诊断方法确定有需要的患有炎性疾病或病状或感染或者处于发展炎性疾病或病状或感染的风险的受试者(例如,人)(例如,具有与参考相比或与之前的测量相比低IAIP水平和/或升高水平的IAIP-IAIP配体复合物的受试者)施用IAIP(例如, I α I和/或P α I)或含有此类蛋白质和药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体的组合物,所述合适的途径包括例如肠胃外、通过吸入喷雾、局部、经鼻、经颊、舌下、鼻内、通过口服施用、吸入、栓剂、直肠、阴道或通过注射。通过注射进行的施用包括例如静脉内、腹腔内、皮下、真皮内、皮内、肌内、关节内、动脉内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内、玻璃体内和颅内注射。如果患者住院,优选的施用方法是通过静脉内注射。

[0164] 可以每1、2、3、4、5、6、8、12或24小时一次或多次;每1、2、3、4、5或6天一次或多次;或每1、2、3或4周一一次或多次向受试者施用IAIP(例如, I α I和/或P α I)或含有此类蛋白质的组合物。在其他情况下,IAIP(例如, I α I和/或P α I)或含有此类蛋白质的组合物作为连续输注施用。

[0165] 用于本发明的组合物的IAIP(例如, I α I和/或P α I)可以通过本领域已知的方法从例如人血浆和血液获得(参见例如美国专利号9,139,641,其以引用的方式整体并入本文)。

[0166] 具体地, IAIP可以从天然来源(例如,血液)以80%至100%(例如,约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%)的纯度获得,并且用于制备本发明的组合物(参见例如美国专利号7,932,365,其以引用的方式整体并入)。用于本发明的组合物的IAIP也可以在纯化期间暴露于低pH条件(例如,具有约4.0或更低的pH,例如约pH 3.6或更低的洗涤缓冲液)(如美国专利号9,139,641中所描述的)。

[0167] 所述组合物可以包含任何合适的IAIP,例如I α I、P α I、重链、轻链或它们的任何组合。例如,所述组合物可以包含I α I、P α I和/或bikunin。在一些情况下,所述组合物可以包含I α I和P α I。重链可以是H1、H2、H3、H4或H5。轻链可以是bikunin。

[0168] 组合物中的IAIP(例如,I α I和/或P α I)的比例或浓度可以根据多种因素变化,所述多种因素包括剂量、化学特征(例如,疏水性)和施用途径。IAIP(例如,I α I和/或P α I)可以生理比例存在于组合物中。生理比例可以是例如健康的人或动物中存在的比例和/或人血浆中天然出现的I α I和P α I的比率。生理比例通常在约60%至约80% I α I之间和约20%至约40% P α I之间。

[0169] IAIP(例如,I α I和/或P α I)或其组合物可以具有例如大于约1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、7.5或10小时的半衰期。IAIP(例如,I α I和/或P α I)或其组合物可以具有大于约5小时或优选地大于约10小时的半衰期。更长的半衰期是优选的,例如因为随时间推移需要向受试者施用更少的剂量。

[0170] 剂量

[0171] 用于向根据本文所述的诊断方法确定有需要的患有炎性疾病或病状或感染或者处于发展炎性疾病或病状或感染的风险的受试者(例如,具有与参考相比或与之前的测量相比低IAIP水平和/或升高水平的IAIP-IAIP配体复合物的受试者)施用的本发明的药学上可接受的组合物包含本领域已知剂量的IAIP(例如,I α I和/或P α I)(参见例如美国专利号7,932,365、国际专利申请公布号W02009154695和美国专利申请公布号2009/0190194,其中的每个以引用的方式并入本文)。例如,本发明的组合物可以范围是约1mg/kg至50mg/kg,优选地10mg/kg与30mg/kg之间的剂量施用。剂量可以每1、2、3、4、5、6、8、12或24小时,每1、2、3、4、5或6天,或者每1、2、3或4周一次或多次或按需要施用。比以上所列举的更低或更高的剂量可以是有利的。任何特定受试者的具体剂量和治疗方案将取决于各种因素,包括所采用的具体组合物的活性、年龄、体重、整体健康状态、性别、饮食、施用时间、排泄率、药物组合、疾病的严重性和过程(例如,患者的病状和/或症状)、受试者对于疾病的处置以及医疗专业人员(例如,医师)的判断。IAIP可以与载体材料组合以产生单一剂型。

[0172] 在患者病状改善之后(如基于症状的改善所评估和/或通过如本文所述测量IAIP和/或IAIP-IAIP配体复合物),如果需要的话,可以施用维持剂量的IAIP组合物或组合疗法。随后,施用的剂量或频率或两者可以根据症状的减少而减少至保留改善病状的水平。当症状缓解至所需水平或者IAIP增加和/或IAIP-IAIP配体复合物降低至所需水平时,可以停止治疗。然而,受试者可能在疾病症状的任何复发或IAIP水平降低时在长期基础上需要间歇治疗。病状的改善还可以基于来源于患者的生物样品(例如,血液(例如,全血、血浆或血清)、支气管灌洗液(BALF)、痰液、尿液、脑脊液(CSF)或组织匀浆(例如,肝活检的匀浆))中的I α Ip水平来判断。生物样品中的I α Ip和/或IAIP-IAIP复合物的水平可以使用本文所述的测定中的一种或多种来确定。

[0173] 配制品

[0174] 本发明提供向根据本文所述的诊断方法确定有需要的患有炎症疾病或病状或感染或者处于发展炎症疾病或病状或感染的风险的受试者(例如,发现具有如使用本文所述的方法测量的低水平的IAIP和/或升高水平的IAIP-IAIP配体复合物(例如,IAIP-LPS复合物)的受试者)施用IAIP。所述方法包括施用IAIP(例如, I α I和/或P α I)、包含IAIP(例如, I α I和/或P α I)的组合物和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂或者与第二治疗组合的此类组合物,如本文所述。所述组合物可以配制为固体或液体。所述组合物可以配制为通过任何合适的手段(包括本文所述的那些)施用。

[0175] 用于施用的可注射形式的IAIP是特别优选的。IAIP和含有其的组合物可以配制为用于静脉内、腹膜内、皮下、皮内、肌内、关节内、动脉内、滑膜内、胸骨内、鞘内、真皮内、玻璃体内、病灶内和颅内注射或输注技术。药物组合物可以呈无菌的可注射制剂的形式,例如作为无菌可注射水性或油性悬浮液。此悬浮液可以按照本领域中已知的技术使用合适的分散剂或湿润剂(例如像TWEEN®80)以及悬浮剂来配制。无菌可注射的制剂还可以是在非毒性的、肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射的溶液或悬浮液。

[0176] 所述组合物还可以配制为以任何口服可接受的剂型进行口服施用,所述剂型包括但不限于胶囊、片剂、药丸、乳液和水性悬浮液、分散体和溶液。对于制备固体组合物,诸如片剂,IAIP可以与药物赋形剂混合以形成含有均匀混合物的固体预配制品组合物。此固体预配制品然后可以细分为含有例如1mg/kg至约50mg/kg的IAIP(例如, I α I和/或P α I)的以上所述类型的单位剂型。固体预配制品可以含有约10mg/kg至30mg/kg的IAIP(例如, I α I和/或P α I)。本发明的片剂或药丸可以被包被或以其他方式配混,以提供具有延长作用优点的剂型。

[0177] 可以并入组合物以用于口服或通过注射施用的液体形式包括水性溶液、合适风味的糖浆、水性或油性悬浮液以及具有食用油(诸如棉籽油、芝麻油、椰子油或花生油)的风味乳液以及酞剂和类似的药物媒介物。

[0178] 用于吸入或吹入的组合物包括在药学上可接受的水性或有机溶剂中的溶液和悬浮液或其混合物以及粉末。液体或固体组合物可以含有如本文所述和/或本领域已知的合适的药学上可接受的赋形剂。所述组合物可以通过口或鼻呼吸途径施用以实现局部或系统性作用。组合物可以通过使用惰性气体进行喷雾。

[0179] 当所需治疗涉及通过局部施用可易于触及的区域或器官时,组合物的局部施用是有用的。对于局部施加至皮肤,组合物应配制为具有含有悬浮或溶解在载体中的活性组分的合适膏剂。可替代地,药物组合物可以配制为具有含有悬浮或溶解在具有合适的乳化剂的载体中的活性组成的合适洗剂或霜膏。

[0180] 药物组合物还可以栓剂形式施用以用于经直肠施用。可以通过将本发明的组合物与适合的非刺激性赋形剂混合来制备这些组合物,所述赋形剂在常温下是固体并且在直肠温度下是液体并且因此将在直肠中融化以释放活性组分。局部经皮贴剂也包括在本发明中。

[0181] 向受试者施用的组合物可以呈以上所述的药物组合物中的一种或多种的形式。这些组合物可以通过常规灭菌技术来灭菌或者可以进行无菌过滤。水性溶液可以按原样包装或者是冻干的,冻干制剂在施用之前与无菌水性载体组合。

[0182] 其他递送系统可以包括即时释放、延迟释放或持续释放递送系统。此类系统可以避免重复施用本发明的组合物,从而增加受试者和医师的方便性。许多类型的释放递送系统是可行的,并且是本领域普通技术人员已知的。它们包括聚合物基系统,诸如以下中描述的那些:(美国专利号3,773,919;欧洲专利号58,481、欧洲专利号133,988,Sidman,K.R.等人,Biopolymers 22:547-556,以及Langer,R.等人,J.Biomed.Mater.Res.15:267-277;Langer,R.Chem.Tech.12:98-105)。持续释放组合物的其他实例包括呈成型制品(例如,膜或微胶囊)形式的半透性聚合物基质。递送系统还包括非聚合物系统,它们是:脂质;水凝胶释放系统;sylastic系统;肽基系统;蜡涂层;使用常规粘合剂和赋形剂的压缩片剂;部分融合的植入物等。用于制备此类配制品的方法对于本领域技术人员将是显而易见的(参见例如美国专利号4,452,775、4,667,014、4,748,034和5,239,660、3,832,253和3,854,480)。

[0183] 配制药物剂的方法是本领域已知的,例如Niazi,Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations(第2版),CRC Press 2009,其描述液体、无菌、压缩、半压缩和OTC形式的配制品发展。经皮和粘膜递送、淋巴系统递送、纳米颗粒、受控药物释放系统、治疗诊断学、蛋白质和肽药物以及生物制品递送在以下中描述:Wang等人,Drug Delivery:Principles and Applications(第2版),Wiley 2016;肽和蛋白质剂的配制和递送在例如以下中描述:Banga,Therapeutic Peptides and Proteins:Formulation,Processing,and Delivery Systems(第3版),CRC Press 2015。

[0184] 组合疗法

[0185] 本发明的方法还包括施用或共同施用第二治疗(例如,作为独立疗法或除IAIP(例如,IAI和/或PAI)或其组合物之外)以用于治疗炎性疾病或病状(例如,败血症、败血症性痛风、无菌败血症、SIRS、创伤/损伤(例如,伤口、烧伤、割伤、挫伤、骨折、外科手术)、中风(例如,缺血性中风、失血性中风)、急性肺损伤、ARDS、肺炎(例如,严重肺炎,严重或非严重:社区获得性肺炎、医院获得性肺炎、疗养院获得性肺炎)、坏死性小肠结肠炎、急性胰腺炎、肾疾病(包括,急性肾损伤、肝损伤、急性循环衰竭)、子痫前期、癌症、癌症转移、肿瘤浸润、外周动脉疾病、1型或2型糖尿病、动脉粥样硬化性心血管疾病、间歇性跛行、严重肢体缺血性疾病、心肌梗塞、颈动脉闭塞、脐带闭塞、低出生体重、早产、手术引起的炎症、脓肿引起的炎症、肺功能不全、周围神经病变、缺氧缺血、组织缺血、类风湿性关节炎、脑膜炎、多发性硬化症、炎性肠病(例如,克罗恩氏病)、慢性阻塞性肺病、鼻炎、未足月产或感染性疾病)或感染(例如,细菌感染)。例如,第二治疗可以包括:如果受试者患有细菌感染或者处于发展细菌感染的风险,则施用抗生素剂;如果受试者患有病毒感染(例如,登革热或西尼罗热)或者处于发展病毒感染的风险,则施用抗病毒剂;如果受试者患有真菌感染或处于发展真菌感染的风险,则施用抗真菌剂;如果受试者患有寄生虫感染或者处于发展寄生虫感染的风险,则施用抗寄生虫剂;如果受试者患有本文所述的炎性疾病或病状或者处于发展本文所述的炎性疾病或病状的风险,则施用抗炎剂;如果受试者患有癌症或癌症转移或者处于发展癌症或癌症转移的风险,则施用抗癌剂;如果受试者患有中风或心肌梗塞或者处于发展中风或心肌梗塞的风险,则施用抗凝剂;如果受试者患有癌症或自身免疫疾病或病状(例如,炎性肠病或类风湿性关节炎),则施用免疫调节剂;并且如果受试者患有急性肺损伤、ARDS或肺炎或者处于发展急性肺损伤、ARDS或肺炎的风险,则施用支气管扩张剂、补体抑制剂、血管加压素、镇静剂或机械通气。

[0186] 当所述方法包括施用IAIP(例如, I α I和/或P α I)或包含IAIP(例如, I α I和/或P α I)的组合物以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体和一种或多种第二治疗剂的组合时, 每种剂以单一疗法方案中通常施用的剂量的约1%至100%之间并且更优选地约5%至95%之间的剂量水平存在。第二治疗的一种或多种剂可以作为多剂量方案的一部分与IAIP(例如, I α I和/或P α I)或其组合物分开施用。IAIP和第二治疗的一种或多种剂可以同时或以任何顺序顺序地施用。可替代地, 第二治疗的一种或多种剂可以是单一剂型的一部分, 例如在单一组合物中与IAIP(例如, I α I和/或P α I)一起混合。

[0187] 可以与IAIP(例如, I α I和/或P α I)组合施用的剂包括双脱氧核苷(例如, 齐多夫定(zidovudine, AZT)、2', 3'-双脱氧肌苷(ddI)和2', 3'-双脱氧胞苷(ddC)、拉米夫定(lamivudine, 3TC)、司他夫定(stavudine, d4T)和TRIZIVIR(阿巴卡韦+齐多夫定+拉米夫定); 非核苷, 例如依法韦仑(efavirenz)(DMP-266, DuPont Pharmaceuticals/Bristol Myers Squibb)、奈韦拉平(nevirapine, Boehringer Ingleheim)和德拉维拉丁(delaviridine, Pharmacia-Upjohn); TAT拮抗剂(诸如Ro 3-3335和Ro 24-7429); 蛋白酶抑制剂, 例如弗林蛋白酶抑制剂、茚地那韦(indinavir, Merck)、利托那韦(ritonavir, Abbott)、沙奎那韦(saquinavir, Hoffmann LaRoche)、奈非那韦(nelfinavir, Agouron Pharmaceuticals)、141 W94(Glaxo-Wellcome)、阿他那韦(atazanavir, Bristol Myers Squibb)、安普那韦(amprenavir, GlaxoSmithKline)、福沙那韦(fosamprenavir, GlaxoSmithKline)、替拉那韦(tipranavir, Boehringer Ingleheim)、KALETRA(洛匹那韦(lopinavir)+利托那韦, Abbott)和其他剂, 诸如9-(2-羟乙氧基甲基)鸟嘌呤(阿昔洛韦(acyclovir)); 干扰素, 例如 α -干扰素、白介素II和磷甲酸盐(磷甲酸(Foscarnet)); 或进入抑制剂, 例如T20(恩夫韦地(enfuvirtide), Roche/Trimeris)或UK-427, 857(Pfizer)、左旋咪唑或胸腺素、顺铂、卡铂、多西他赛、紫杉醇、氟尿嘧啶、卡培他滨(capecitabine)、吉西他滨、伊立替康、拓扑替康、依托泊苷、丝裂霉素、吉非替尼、长春新碱、长春碱、阿霉素、环磷酰胺、塞来昔布、罗非昔布、戊地昔布、布洛芬、萘普生、酮洛芬、地塞米松、强的松、泼尼松龙、氢化可的松、对乙酰氨基酚、米索硝唑、氨磷汀、坦索罗辛(tamsulosin)、非那吡啶、昂丹司琼、格拉司琼、阿洛司琼、帕洛诺司琼、异丙嗪、普鲁氯嗪、曲美苄胺、阿瑞比坦、具有阿托品地芬诺酯和/或洛哌丁胺; 以及抗凝剂, 例如抗凝血酶III和活化的蛋白质C。

[0188] 可以与IAIP(例如, I α I和/或P α I)或其组合物组合施用的额外的示例性剂在以下讨论。

[0189] 抗生素剂

[0190] 如果受试者患有细菌感染(例如, 坏死性小肠结肠炎或革兰氏阴性细菌感染)或者处于发展所述细菌感染的风险, 则第二治疗可以包括用于治疗细菌感染的抗生素剂。抗生素剂的非限制性实例包括阿莫西林、青霉素、强力霉素、克拉霉素、苄甲青霉素、阿奇霉素、达托霉素、利奈唑胺、左氧氟沙星、莫西沙星、加替沙星、庆大霉素、大环内酯、头孢菌素、阿奇霉素、环丙沙星、头孢呋辛、阿莫西林-克拉维酸钾、红霉素、磺胺甲噁唑-甲氧苄啶、一水强力霉素、头孢吡肟、氨苄青霉素、头孢泊肟、头孢曲松、头孢唑啉、琥珀酸乙酯红霉素、美罗培南、哌拉西林-他唑巴坦、阿米卡星、硬脂酸红霉素、右旋糖中的头孢吡肟、盐酸强力霉素、氨苄青霉素-舒巴坦钠、头孢他啶、吉米沙星、硫酸庆大霉素、乳糖酸红霉素、亚胺培南-西司他汀、头孢西丁、头孢托仑匹酯、厄他培南、强力霉素-过氧化苯甲酰、氨苄青霉素-舒巴坦

钠、美罗培南、头孢呋辛、头孢替坦、哌拉西林-他唑巴坦、宽谱氟喹诺酮(其可以例如用于治疗由非典型病原体(诸如肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*)或肺炎衣原体(*Chlamydomphila pneumoniae*))引起的肺炎)和本领域中已知的其他抗生素。

[0191] 抗病毒剂

[0192] 如果受试者患有病毒感染(例如,登革热或西尼罗热)或者处于发展所述病毒感染的风险,则第二治疗可以包括用于治疗病毒感染的抗病毒剂。抗病毒剂的非限制性实例包括扎那米韦、奥司他韦、帕那米韦、病毒唑、阿昔洛韦、更昔洛韦、磷甲酸、西多福韦和本领域中已知的其他抗病毒剂。

[0193] 抗真菌剂

[0194] 如果受试者患有真菌感染或者处于发展真菌感染的风险,则第二治疗可以包括用于治疗真菌感染的抗真菌剂。抗真菌剂的非限制性实例包括两性霉素、卡泊芬净、伏立康唑、伊曲康唑、泊沙康唑、氟康唑、氟胞嘧啶和本领域中已知的其他抗真菌剂。

[0195] 抗寄生虫剂

[0196] 如果受试者患有寄生虫感染或者处于发展寄生虫感染的风险,则第二治疗可以包括用于治疗寄生虫感染(例如,寄生原虫感染)的抗寄生虫剂。抗寄生虫剂的非限制性实例包括硝噻醋柳胺、硫肿蜜胺、依氟鸟氨酸、甲硝哒唑、硝砒咪唑、米替福新、甲苯咪唑、双羟萘酸喹啉啉、噻苯咪唑、二乙胺嗪、依维菌素、阿苯达唑、吡喹酮、利福平和本领域中已知的其他抗寄生虫剂。

[0197] 抗炎剂

[0198] 如果受试者患有本文所述的炎性疾病或病状或者处于发展本文所述的炎性疾病或病状的风险,则第二治疗可以包括用于治疗或减少炎症的抗炎剂。抗炎剂的非限制性实例包括皮质类固醇、斯达汀、类固醇、非类固醇性抗炎药、糖皮质激素和本领域中已知的其他抗炎剂。

[0199] 支气管扩张剂

[0200] 如果受试者患有急性肺损伤、ARDS或肺炎或者处于发展急性肺损伤、ARDS或肺炎的风险,则第二治疗可以包括用于放松支气管肌肉、从而允许气道更大并允许空气穿过肺的支气管扩张剂。支气管扩张剂的非限制性实例包括 β 2激动剂、黄嘌呤、异丙托品、氧托溴铵、蝇蕈碱受体拮抗剂、异丙托品、氧托品、茶碱、可可碱、咖啡因、沙丁胺醇、异丙肾上腺素、舒喘宁、levalbuterol、吡布特罗、奥西那林、特布他林、沙美特罗、福莫特罗和本领域中已知的其他支气管扩张剂。

[0201] 血管加压素

[0202] 如果受试者患有急性肺损伤、ARDS、肺炎或创伤/损伤(例如,伤口、烧伤或外科手术)或者处于发展急性肺损伤、ARDS、肺炎或创伤/损伤的风险,则第二治疗可以包括引起血管收缩和/或血压增加的血管加压素。血管加压素的非限制性实例包括肾上腺素、异丙肾上腺素、去氧肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴酚丁胺、麻黄碱、屈昔多巴和本领域中已知的其他血管加压素。

[0203] 镇静剂

[0204] 第二治疗可以包括镇静剂。镇静剂的非限制性实例包括异丙酚、得普利麻乳剂、吗啡、芬太尼、咪达唑仑、劳拉西泮、precede、硫酸吗啡(infumorph)、右美托咪定、阿芬太尼和

本领域中已知的其他镇静剂。

[0205] 补体抑制剂

[0206] 如果受试者患有急性肺损伤、ARDS或肺炎或者处于发展急性肺损伤、ARDS或肺炎的风险,则第二治疗可以包括补体活化的抑制剂。所述组合物可以抑制一种或多种补体组分(诸如C1、C2、C3(例如,C3a和C3b)、C4(例如,C4b)、C5(例如,C5a和C5b)、C6、C7、C8、C9、膜攻击复合物、因子B、因子D、MASP-1和MASP-2或其片段)的活化。补体抑制剂可以包括蛋白酶抑制剂(诸如C1-INH和Rhucin/rhC11NH)、可溶性补体调节剂(诸如sCR1/TP10、CAB-2/MLN-2222)、治疗性抗体(诸如依库珠单抗/SOLIRIS®、培塞利珠单抗、奥法木单抗)、补体组分抑制剂(诸如坎普他汀)、受体拮抗剂(诸如PMX-53和rhMBL)。

[0207] 试剂盒

[0208] 本发明的特征还在于用于在测量来自受试者(例如,人患者,诸如新生儿、儿童、青少年或成年人)的样品(例如,液体样品)中的IAIP中使用的试剂盒。所述试剂盒可以包括以下中的一种或多种:含有固定的IAIP结合剂(例如,IAIP特异性抗体或IAIP配体)的支持物(例如,板(例如,多孔板)、颗粒(例如,磁颗粒,例如纳米颗粒、磁纳米颗粒)、生物芯片、树脂、容器(例如,管)、膜(例如,硝酸纤维素膜、PVDF膜)、测试条(例如,纤维素、玻璃纤维或硝酸纤维素)或珠粒(例如,蛋白质A或蛋白质G珠粒、磁珠粒、玻璃珠粒、塑料珠粒)、标记的IAIP检测剂(例如,IAIP配体或IAIP特异性抗体)、洗涤缓冲液、封闭剂、用于检测标记的底物、稀释剂和用于进行检测测定的说明书。结合剂和检测剂可以提供在容器中,或者结合剂可以预附接至支持物来提供(例如,结合剂已附接至板或测试条)。

[0209] 本发明的特征还在于用于在测量来自患者的样品(例如,液体样品)中的IAIP-IAIP配体复合物中使用的试剂盒。所述试剂盒可以包括以下中的一种或多种:含有固定的结合剂(例如,IAIP特异性抗体、不同的IAIP配体或特异性结合至IAIP配体的抗体)的支持物(例如,板(例如,多孔板)、颗粒(例如,磁颗粒,例如纳米颗粒、磁纳米颗粒)、生物芯片、树脂、容器(例如,管)、膜(例如,硝酸纤维素膜、PVDF膜)、测试条(例如,纤维素、玻璃纤维或硝酸纤维素)或珠粒(例如,蛋白质A或蛋白质G珠粒、磁珠粒、玻璃珠粒、塑料珠粒)、标记的检测剂(例如,不同的IAIP配体、IAIP特异性抗体或特异性结合至IAIP配体的抗体)、洗涤缓冲液、封闭剂、用于检测标记的底物、扩张剂和用于进行检测测定的说明书。结合剂和检测剂可以提供在容器中,或者结合剂可以预附接至支持物来提供(例如,结合剂已附接至板或测试条)。

[0210] 实施例

[0211] 提供以下实施例来进一步说明本发明的一些实施方案,但不旨在限制本发明的范围;通过其示例性性质应理解,可以替代性地使用其他程序、方法或本领域技术人员已知的技术。

[0212] 实施例1:肝素-IAIP测定

[0213] 生物素酰化的肝素的制备

[0214] 根据制造商的说明书使用生物素酰肼试剂将肝素(肝素钠注射USP, Sagent Pharmaceuticals, 目录号NDC 25021-400-30)与生物素缀合。简而言之,将1000IU肝素溶液与0.25mg交联剂试剂EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-3乙基碳二亚胺盐酸, Alfa Aesar目录号A10807)和0.5mM先前已溶解在0.1M MES缓冲液pH 4.7中的DMSO中的生物素酰肼在轻微搅

拌下在室温下混合3小时。通过在具有5kDa截留过滤膜(Millipore)的Amicon超离心过滤器装置上超滤来进行未缀合生物素和缓冲液交换。在d-H₂O中稀释之后,生物素酰化的肝素准备在测定中使用。

[0215] “夹心型”肝素-IAIP ELISA

[0216] 将针对人IAIP的轻链的纯化小鼠单克隆抗体(MAb 69.26)在32°C下以200ng/孔固定在96孔微板(Immulon 600, Greiner BioOne)上2小时。在用5%脱脂干燥奶粉封闭1小时并用TBS-T(TBS+0.05% Tween 20)洗涤之后,将未知样品和已知IAIP标准物在TBS+0.1% Tween 20中稀释并添加至微板(最终体积50uL/孔)。将样品和系列稀释的IAIP标准物溶液在32°C下温育1小时。在用TBS-T洗涤微板若干次之后,将生物素酰化的肝素在含有20mM乙酸+25mM NaCl的缓冲液中稀释,pH 4.0(1:2500),并且每孔添加50μL。将生物素酰化的肝素在32°C下温育30分钟,并且然后使用TBS-T将微板洗涤至少三次。最后,将1:5000(50uL/孔)稀释的HRP缀合的链霉抗生物素蛋白(Pierce)添加至微板。在洗涤之后,添加50μL底物TMB(Neogen Enhanced K-Blue TMB底物),并且通过添加50μL 1M HCl来使反应停止,并且在450nm波长处在分光光度计(Molecular Devices)上读取颜色变化。使用四点逻辑回归(SoftMax Pro软件,Molecular Devices)生成标准曲线,并且从2.0μg/mL的最大IAIP浓度至系列两倍稀释的0.03125μg/mL绘制七点曲线,如图3B所示。基于所生成的标准曲线计算未知样品的IAIP浓度。

[0217] 实施例2:LPS-IAIP测定

[0218] 生物素酰化的内毒素/LPS(脂多糖)的制备:

[0219] 根据制造商的说明书并且与针对肝素所使用的方案类似使用生物素酰肼试剂(ApExBIO,目录号A87007)用生物素标记来自大肠杆菌055:B5(Sigma目录号L2280)的脂多糖(LPS/内毒素)。将10mg LPS在0.1M MES缓冲液中重构,并且将2.5mM生物素-酰肼和2.5mgEDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-3乙基碳二亚胺盐酸,Alfa Aesar目录号A10807)在室温下轻微混合3小时。通过在具有5kDa截留过滤膜(Millipore)的Amicon超离心过滤器装置上超滤来进行未缀合LPS去除和缓冲液交换。在d-H₂O中稀释之后,生物素酰化的LPS准备在测定中使用。

[0220] “夹心型”LPS-IAIP ELISA

[0221] 与以上所述的肝素-IAIP方案类似,将针对人IAIP的轻链的纯化小鼠单克隆抗体(MAb 69.26)在32°C下以50ng/孔固定在96孔微板(Immulon 600, Greiner BioOne)上2小时。在用5%脱脂干燥奶粉封闭1小时并用TBS-T(TBS+0.05% Tween 20)洗涤之后,将未知样品和已知IAIP标准物在TBS+0.1% Tween 20中稀释并添加至微板(最终体积50uL/孔)。将样品和系列稀释的IAIP标准物溶液在32°C下温育1小时。在用TBS-T洗涤微板若干次之后,将生物素酰化的LPS在含有20mM乙酸+25mM NaCl的缓冲液中稀释,pH 4.0(1:32,000),并且每孔添加50uL。将生物素酰化的LPS在32°C下温育30分钟,并且然后使用TBS-T洗涤微板至少三次。最后,将1:10,000(50μL/孔)稀释的HRP缀合的链霉抗生物素蛋白添加至微板。在洗涤之后,添加50μL底物TMB(Neogen Enhanced K-Blue TMB底物),并且通过添加50μL 1M HCl来使反应停止,并且在450nm波长处在分光光度计(Molecular Devices)上读取颜色变化。使用四点逻辑回归(SoftMax Pro软件,Molecular Devices)生成标准曲线,并且从2.0μg/mL的最大IAIP浓度至系列两倍稀释的0.03125μg/mL绘制七点曲线,如图3C所示。

[0222] 实施例3:来自诊断患有严重社区获得性肺炎 (sCAP) 的患者的血液样品的分析

[0223] 从确认诊断患有sCAP的患者采集一系列血液样品,所述患者在Rhode Island医院的重症监护室住院。在研究中募集16名患者,并且在第0(进入ICU的时间)、1、3和7天采集血浆。使用建立的竞争性ELISA(图2A)和使用生物素酰化的肝素或生物素酰化的LPS作为检测分子的两种夹心型ELISA(图3A)确定IAIP的水平。在此研究中包括来自95名年龄在17至71岁之间的健康对照的血液样品(从健康血液供体获得并且购自Rhode Island血液中心),以便将健康对照中的IAIP水平与sCAP患者中测量的水平进行比较。结果在图4、图5和图6中示出。

[0224] 结果指示,在住院时和在疾病进展期间(多至7天),与健康对照相比,IAIP水平在sCAP患者中显著更低。因此,IAIP水平可以用于指导医师进行评估预后和做出治疗性决策。虽然竞争性ELISA显示sCAP患者中的IAIP水平降低,但是使用生物素缀合的肝素和/或LPS作为特异性结合配体的“夹心型”ELISA测定产生统计上更显著的结果(与健康对照相比,在第0、1、3和7天时IAIP水平之间的 p 值=0.0001)。使用生物素缀合的肝素和/或LPS的“夹心型”ELISA测定产生sCAP患者中更低浓度的IAIP,从而在患有sCAP的患者与健康对照中测量的IAIP水平之间产生更大的差异。这些数据指示,使用标记的IAIP配体的“夹心型”ELISA测定具有比竞争性ELISA测定增加的敏感性和潜在更大的准确性。

[0225] 使用相同的测定来评估来自患有败血症的进入Rhode Island医院的重症监护室的受试者的样品。这些测定产生类似的结果。虽然正常健康对照的IAIP值在竞争性ELISA(平均值 \pm SEM=328.9+6.34 μ g/mL)和LPS或肝素-IAIP测定(337.7 \pm 9.05和421.8 \pm 14.47 μ g/mL)两者中是类似的,但是在竞争性ELISA中肺炎和败血症组中的IAIP水平显著更高,这在疾病组与健康对照之间产生统计上较不显著的差异或没有差异(图8A至图8C)。

[0226] 实施例4:肝素与IAIP的结合的分析

[0227] 使用免疫印迹分析进行肝素与IAIP的特异性结合的评估。将高度纯化的IAIP(1 μ g)、正常人血浆(1 μ L)、纯化的bikunin(用于注射的乌司他汀, Techpool, 2 μ g)和作为阴性对照的人血清白蛋白(HSA, 2 μ g)在7.5%SDS-PAGE凝胶上分离并且转移到硝酸纤维素膜上。在用5%脱脂干燥奶粉封闭之后,将硝酸纤维素膜与生物素缀合的肝素(在TBS中1:500)在室温下温育过夜。在用TBS+0.05% Tween洗涤若干次之后,添加HRP缀合的链霉抗生物素蛋白(1:15,000)并且在室温下温育1小时。在洗涤之后,添加底物,金属增强的DAB(Pierce)来使反应带可视化。

[0228] 生物素缀合的肝素特异性结合至纯化的IAIP(250kDa I α I和125kDa P α I),如泳道2所示(图7),与MAb 69.26(针对人IAIP的单克隆抗体)类似。相比于结合至轻链(bikunin)(泳道3)的MAb 69.26,生物素缀合的肝素不结合至IAIP的轻链,从而表明肝素通过重链结合至IAIP。IAIP的重链似乎特异性结合至肝素。

[0229] 通过人血浆中的生物素缀合的肝素检测到多条反应性蛋白质带(图7,泳道1),并且与HSA的结合是不可检测的。

[0230] 此外,在肝素-IAIP或LPS-IAIP ELISA中未检测到游离bikunin,从而表明使用肝素或LPS-IAIP ELISA仅测量具有完整重链的IAIP复合物。这些数据指示,使用肝素和/或LPS(或其他IAIP配体)的夹心型ELISA提供受试者(例如,具有病理病状的受试者)中循环IAIP复合物的评定,其相对于其他已知的IAIP测定(例如,竞争性IAIP测定(图2A))具有增

加的准确性和稳健性。

[0231] 实施例5:生物素酰化的LPS与固定的血浆来源的IAIP的结合

[0232] 为了研究体外LPS与IAIP的直接结合,将IAIP和其他对照蛋白(BSA=牛血清白蛋白;bikunin(IAIP的轻链);以及单克隆抗体MAb69.26的纯化的IgG)以1000 μ g/孔固定在96孔微板(Greiner Microlon 600)上,并且用脱脂干燥奶粉(在TBS+0.1%Tween 20中5%)封闭。在洗涤之后,将100 μ g生物素酰化的LPS(来自大肠杆菌055:B5的脂多糖,购自Sigma,目录号L2880)添加至每个孔,并且在室温下在TBS+150mM CaCl₂缓冲液中温育1小时。在用TBS+0.1%Tween洗涤若干次之后,添加HRP缀合的链霉抗生物素蛋白并且温育1小时。最后,添加TMB底物并且通过添加1M HCl溶液来使反应停止。在450nm处通过分光光度法测量颜色变化和吸光度。发现生物素酰化的LPS分子与IAIP相比于BSA(其充当阳性对照,因为它已被描述结合LPS(David SA,等人,Innate Immunity 1995;2(2):99-106))或MAb 69.26的IgG(阴性对照)的显著结合(图9)。LPS不显著结合至IAIP的轻链(bikunin),从而表明IAIP的重链促进结合至LPS。结合还可以通过糖胺聚糖链介导。

[0233] 实施例6:生物素酰化的IAIP与固定的LPS的结合

[0234] 在先前实验的反转中,添加生物素酰化的IAIP(4 μ g/孔)并且与固定的LPS(100 μ g/孔)、BSA(2 μ g/孔)、作为阳性对照的MAb 69.26的IgG(2 μ g/孔)和作为阴性对照(空白)的脱脂干燥奶粉(2 μ g/孔)温育1小时。在若干次洗涤之后,添加HRP缀合的链霉抗生物素蛋白,并且随后将TMB底物添加到微板孔。检测到生物素酰化的IAIP与固定的LPS的显著结合,同时观察到IAIP与固定的BSA或脱脂干燥奶粉的显著更低的结合(图10)。在此实验中充当阳性对照的MAb 69.26(对于人IAIP特异性的单克隆抗体)的IgG强烈结合至生物素酰化的IAIP。

[0235] 实施例7:pH对于IAIP-LPS结合的影响的分析

[0236] 为了进一步表征IAIP与LPS的结合,进行类似的固相结合实验。将生物素酰化的IAIP在各种pH条件下与固定的LPS、MAb 69.26的IgG(阳性对照)或BSA(阴性对照)一起温育。乙酸盐缓冲液(50mM)用于低pH溶液(pH 3-6),并且Tris-HCl缓冲液(50mM)用于获得中性或更高pH的溶液(pH 7-9)。虽然在pH 5下生物素酰化的IAIP强烈结合,但是在pH 3或4下未观察到结合(图11)。当pH增加至高于pH 5时,观察到IAIP的降低结合。IAIP与其特异性单克隆抗体MAb 69.26的结合在pH 7下达到峰值,但是有趣的是,当pH增加高至pH 9时,没有显著变化。类似地,在pH 3和4下,IAIP与单克隆抗体的结合可忽略不计。没有观察到生物素酰化的IAIP与BSA之间的结合。结果清楚地表明,IAIP与LPS之间的最佳结合在pH 4-7的范围内并且具体地在约pH 5下发生。

[0237] 实施例8:盐浓度对于IAIP-LPS结合的影响的分析

[0238] 通过在生物素酰化的IAIP与固定的LPS在微板上的温育期间向缓冲液添加增加量的盐(NaCl)来研究盐浓度的影响。IAIP与LPS的结合在增加的盐浓度下降低,然而所述降低甚至在1200mM的盐浓度下也不是显著的,从而表明IAIP与LPS的结合是相对强烈且特异性的,与IAIP与针对人IAIP的单克隆抗体(MAb 69.26)(其在此实验中用作阳性对照)的特异性结合类似(图12)。

[0239] 实施例9:非离子洗涤剂(NP-40和Tween-20)对于IAIP-LPS结合的影响的分析

[0240] 进行进一步的探索来研究增加浓度的非离子洗涤剂壬基酚氧基聚乙氧基乙醇(NP-40)(图13)和Tween 20(图14)对于生物素酰化的IAIP与固定的LPS的结合的影响。与单

独的TBS缓冲液而没有添加洗涤剂相比,当向IAIP与LPS的结合反应添加0.05% (w/w) NP-40或Tween-20时,观察到增加的结合。少量的洗涤剂可以促进与LPS的结合,从而表明LPS分子的脂质结合结构域可能参与此相互作用。甚至当洗涤剂的量增加高至1%时,IAIP的结合仍然是相对强烈的,因为大部分IAIP仍然结合至LPS,从而指示体外IAIP与LPS之间的强烈相互作用。类似地,生物素酰化的IAIP以高特异性和亲和力强烈结合至MAb 69.26,并且添加高达1%的洗涤剂不显著改变结合。相比之下,阴性对照(BSA)未显示与IAIP的任何结合。

[0241] 实施例10:使用快速横向流动免疫测定(LFIA)定量IAIP

[0242] 本文所述的方法可以用于使用横向流动免疫测定(LFIA)快速定量IAIP。实施例1-3中描述和使用的“夹心型”IAIP ELISA可以改编为LFIA,一种及时(POC)、快速、可靠、定量且用户友好的测试,其可以用于鉴定具有威胁生命的严重炎性病状(例如,新生儿败血症(NS)和坏死性小肠结肠炎(NEC))的高风险受试者(例如,婴儿、青少年或成年人)。LFIA可以a) 测量20与700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IAIP之间的线性范围;b) 表现出接近150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (例如,约100至约200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的IAIP水平的高精度(例如,<5%的波动或误差);c) 在一小时或更少时间(例如,15分钟或更少时间,诸如小于10、7或5分钟或更少时间)内获得结果;并且d) 获得<150 μL 小样品体积的血浆或全血样品(例如,150、100、75、50、25、15 μL 或更少)。

[0243] 所述测试可以用于快速鉴定受试者(例如,早产新生儿、婴儿、青少年或成年人)中的失调炎性应答。已知早期干预对于提高经历炎性疾病或病状或感染的患者的存活率是重要的。

[0244] 在新生儿中,例如,应用早期干预方案的能力通常被从其他较不严重的疾病中鉴定此类病状(例如,NS和NEC)的困难而受到限制。优异的预测的IAIP负值可以帮助指导临床医生做出困难的决策,例如像提前终止当前测试信息不足的受试者(例如,婴儿、青少年或成年人)中的抗生素治疗。此外,作为治疗性蛋白,IAIP在病危受试者(例如,婴儿、青少年或成年人)中可以是有益的,并且血液水平可以充当有用的诊断治疗标记物来帮助医师做出关于用IAIP或其他辅助治疗剂进行替换疗法的明智决策并监测疾病进展。

[0245] 可以用于影响治疗性决策(诸如治疗(例如,抗生素治疗)的开始和持续时间)的使用简单的用户友好且便携式装置(准确的定量结果在短时间(例如,15min或更少时间)内可读)的基于IAIP的快速及时测试不仅是创新性的,并且对于帮助减少发病和死亡在临床上也是有用的。

[0246] LFIA涉及向测试条(例如,纤维素、玻璃纤维或硝酸纤维素)添加来自受试者的样品,然后使用缓冲液将样品推动到所述条中。所述条含有IAIP结合剂(例如,IAIP特异性抗体或IAIP配体)。标记的检测剂(例如,IAIP特异性抗体或IAIP配体)可以在样品之前、之后或与其同时添加至所述条,并且使用快速定量IAIP的标准方法可视化。

[0247] a) 金缀合的试剂:金纳米颗粒由于其优异的胶体稳定性而可以用于以(LFIA)形式标记试剂。用酰肼官能化的金纳米颗粒的合适配制品是可商购获得的(Innova Bioscience)。虽然通常抗体共价附接至作为检测试剂的胶体金,但是肝素或LPS可以通过其糖链使用InnovaCoat金纳米颗粒类似地缀合。LPS和肝素的金缀合可以小范围进行并且在LFIA中测试其稳定性和性能。

[0248] b) LFIA的捕获、检测、样品试剂和条件的优化:可以选择基于以下所述的竞争性LFIA发展的经验的构建、捕获泳道上MAb 69.26的配制品和涂覆条件和其他因素(诸如封闭

剂、表面活性剂和碳水化合物)来减少非特异性结合并改善流动特征。还可以确定减少干扰和非特异性结合的最佳稀释因数和合适的稀释剂。多因素实验设计(DoE)可以用于确定以下参数的相互作用:1)结合剂浓度,2)涂覆pH和缓冲液类型(范围=4-10),3)涂覆持续时间以及4)封闭剂的类型(例如,牛血清白蛋白、鱼明胶等)。

[0249] c) 测试条组分、外壳和读取器:测试条可以容纳在具有放置在条的适当区域上的样品孔和测试读取窗口的塑料盒中。可以使用各种标准化条尺寸构型。可以选择合适的外壳,诸如适用于Detekt或ESEQuant读取器的外壳。可以选择样品垫和缀合物垫的组成以及硝酸纤维素膜的孔大小来实现毛细管作用的所需速率,并且因此实现样品与检测器试剂的所需反应时间。

[0250] LFIA性能目标可以通过改变以下各项来优化:例如测试泳道试剂的配制和剥离条件的方法,检测分子(例如,LPS或肝素)的缀合方法和检测剂的滴定以及垫和芯的最佳材料和尺寸,如下所述:

[0251] a. 测试泳道和对照泳道的优化。膜剥离条件可以针对测试条的测试泳道(MAb 69.26)和对照泳道(LPS结合蛋白或肝素结合蛋白(例如,凝血因子IX)。37°C下的30分钟干燥时间段可以用于固定测试泳道和对照泳道,作为LFIA膜的稳健制造程序。多因素DoE可以用于确定以下膜剥离参数的相互作用:1)结合剂浓度,2)pH和缓冲液类型(范围=pH 4-10),3)盐浓度以及4)剥离体积(1-3 μ L/条)和喷墨速度。并入膜剥离相对于初始优化研究有所改善。多因素DoE还可以用于确定用各种浓度(0-1 μ g/条)的蛋白质封闭剂、表面活性剂、碳水化合物和可以减少金颗粒非特异性结合或改善膜的流动特征的其他剂进行膜共涂覆的功效。基于固相结合研究,LPS和肝素在低于5的pH下显著更强地结合至IAIP。类似的条件可以在LFIA中使用。

[0252] b. 测试条参数的优化。样品垫和缀合物垫的组成以及硝酸纤维素膜的孔大小可以影响毛细管作用的速率,并且因此影响样品与金检测器试剂的反应时间,并且因此可以选择来实现所需结果。已确定快速流动NC(HF090,Millipore)满足敏感性和产生结果的时间的设计规范。DoE可以用于评定过滤器的类型和用于测定的垫和芯材料。类似地,可以调整样品垫和缀合物垫的大小和几何形状来实现所需结果。

[0253] 可以优化样品垫来:1)接收未稀释的样品,2)提供必要的配方来最小化非特异性结合,并且3)接收全血样品。以下讨论的竞争性IAIP原型快速测试利用稀释样品(1:5),其减轻对于进入测试条的原始样品体积的需要并且含有减少非特异性结合组织的封闭蛋白和表面活性剂。基于配制品的样品垫(例如,干燥配方)可以针对组分(例如,蛋白质封闭剂、表面活性剂等)及其浓度来发展。它们是可以用于有效且可依赖地减少干扰和非特异性结合的可获得的免疫测定添加剂。可以在多因素DoE之后进行候选剂的筛选研究以确定例如封闭剂的最佳浓度。

[0254] LPS和肝素的缀合技术可以针对与基于金胶体(纳米颗粒)和染色胶乳颗粒的缀合技术的一起使用来评估。

[0255] c. 血液分离过滤膜和塑料外壳盒。除干燥样品垫配方之外,适用于排除红细胞的泳道内血液分离过滤膜可以用于全血样品。目标在于简化过程,并且使得快速测试形式的测试是用户友好的,尤其是对于及时使用的非实验室应用,诸如当使用从手指或通过采集管采集的直接应用的全血。这些血液过滤器的多种类型是可商购获得的,诸如Vivid™或

Cytosep™膜 (Pa11) 或其他制造商 (GE Lifesciences), 并且可以用于LFIA。可以选择测试条的塑料外壳尺寸以用于读取器 (例如, Detekt读取器)。

[0256] 已确定手持式Detekt™读取器模型RDS-150PRO (Detekt Biomedical, Austin, TX) 可以用于LFIA。用于快速测试读取器的Detekt的光学横向流动读取器技术当前用于食品和饮料安全测试、生物威胁检测、环境监测和动物健康的商业诊断装置中。读取器是光学扫描测试条并且将测试泳道和对照泳道信号强度与编程的校准算法进行比较的手持式装置。信号整合软件可以定制来解读IAIP剂量响应曲线, 并且此算法可以驻留在Detekt™单元上。Vision Suite Pro开发者的试剂盒软件程序可以用于与德克萨斯奥斯汀 (Austin, TX) 的制造商Detekt Biomedical LLC合作, 以便将IAIP测试条的解读与Detekt读取器整合。可以开发基于IAIP结合曲线形状和内部对照的软件算法来执行以下功能: a) 建立相对于测试泳道信号强度的IAIP结合曲线的形状; b) 可能基于对照泳道信号建立内部对照以矫正测试条运行的每日波动, 以及c) 建立针对待并入读取器中 (例如, 通过条形码扫描) 的试剂盒批次特定信息的软件。

[0257] 开发和优化的夹心型IAIP快速测试 (根据以上和本文中讨论的参数) 的性能可以在临床前环境中评估。LFIA盒可以如下测试:

[0258] a) 分析敏感性、可报告范围和精度-已知IAIP浓度跨度和可能的IAIP浓度范围 (25-800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的样品/对照可以经多天 ($N=10$) 通过多位操作员 (最小 $N=3$) 在多个平行测定中测试。可以分析数据来建立IAIP结合曲线的所有点处的精度, 包括测定截留点 (设定为150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的精度。

[0259] b) 干扰物-已知IAIP浓度的样品池可以掺入潜在的干扰物来确定对于剂量恢复的影响。临床和实验室标准协会 (CLSI) EP-07A方案可以用于参考。可以高浓度存在于患者样品中的物质 (例如, 血红蛋白、胆红素、人IgG等) 的储备溶液可以掺入IAIP样品中并测试。

[0260] c) 用户稳健性评定-已知IAIP浓度的样品池可以用于验证测试条对于由终端用户产生的各种情况/错误的稳健性。测试的参数包括: 1) 添加的不正确的样品体积 (+25%), 2) 实验室环境条件 (温度65°F-85°F; 湿度10%-70%RH) 以及3) 不正确的测试条读取时间 (+50%-100%所推荐的时间)。

[0261] d) 产品保质期稳定性-IAIP测试试剂盒可以在不同的温度方案 (例如, 环境温度和37°C) 下储存并且使用一组已知IAIP浓度的IAIP对照在不同的制造后间隔 (>1年) 下测试以确定产品的稳定性。

[0262] e) 初步临床样品的敏感性和特异性-产品可以使用来自受试者 (例如, 疑似和确认诊断NS和NEC的婴儿) 的临床样品进行测试。

[0263] 为了在观察临床研究中评估IAIP快速测试, 可以从经历常规临床评估和管理的受试者 (例如, 患有炎性疾病或病状或感染或者具有炎性疾病或病状或感染的风险的受试者) 采集样品。来自护理患有相同炎性疾病或病状或感染的受试者的广泛混杂群体的多个中心的数据采集可以用于提供足够数量的研究受试者, 并且加强IAIP与疾病或感染之间的联系。可以实时提供IAIP水平的快速及时床边装置可以帮助消除使用不必要的干预或延长不必要的治疗 (例如, 抗生素疗法), 并且可以降低住院的长度/成本。

[0264] IAIP LFIA可以如下用于受试者的临床评估:

[0265] 1) 血液样品的采集: 可以从在不同医疗中心的患有炎性疾病或病状或者处于发展

炎性疾病或病状的风险的受试者采集样品。可以记录所有受试者的临床和人口统计数据,包括年龄、体重、性别和实验室结果。在不同时间点(例如,第0、24、48、72小时和第7天)从相同受试者采集的一系列样品也可以用于LFIA中。LFIA可以用于确定IAIP水平是否与疾病的严重性和进展相关,IAIP水平是否预测风险或随后的疾病,以及受试者是否将发展更严重的疾病或改进之后的疗法。

[0266] 2) 能力分析:患有炎性疾病或病状或感染的受试者的初步数据和公布的研究可以用于样品大小估计。

[0267] 3) 血液分析:可以将采集的临床血浆样品转移到研究小瓶中,标记(去识别)并且以冷冻状态储存,直至进行测试。IAIP样品在室温下稳定24小时,在常规冷藏临床储存下稳定多达14天,并且在20°C下稳定不受限的时间。可以使用LFIA快速IAIP测试和夹心型IAIP ELISA分析IAIP水平以用于比较研究。

[0268] 为了评估IAIP快速测试LFIA的概念的证据,产生测试条盒,其被设计来使用与图2A中所示类似的竞争性LFIA测量IAIP。使用此免疫测定形式产生的以下所述的数据确认也可以使用基于夹心型形式的LFIA(与图3A中所示类似)。以下描述竞争性LFIA。

[0269] 新生儿中的败血症和系统性炎性应答综合征

[0270] 重症监护的发展已引起受试者存活的明显改善(例如,婴儿,尤其是早产、非常低体重(VLBW)(<1,500g)的婴儿)。然而,早产婴儿易于遭受机会性感染和急性的威胁生命的病状新生儿败血症(NS)和坏死性小肠结肠炎(NEC)。最近的多中心调查表明,高达21%的VLBW婴儿遇到晚期发作(>72小时的生命)血液培养的至少一种情况(被证明是败血症),并且高达7%的VLBW发展NEC。NS和NEC与严重的发病(包括不利的神经发育结果)相关联,并且在NS(10%-30%)和NEC(16%-42%)中具有相对高的死亡率。这些新生儿疾病的早期警告现象和症状是非特异性的,经常不显眼的,并且可能由于非感染性病因而容易误诊,诸如支气管肺发育不良、早产儿呼吸暂停、胃食管反流或功能性肠动力障碍的恶化。更让人烦恼的是,两种疾病的临床恶化可能以暴发性方式进展,从而在临床呈现的数小时内导致休克、弥散性血管内凝血和死亡。当前没有关于患者进展至严重疾病和死亡的风险广泛指导医师的快速测试。

[0271] 虽然NEC的明确病因仍然不清楚,但是普遍认为,当感染剂转移穿过肠上皮层时,NEC发病机制发生,躲避先天免疫防御并且导致随后的炎症和组织坏死。NS和NEC两者均与系统性炎性应答相关联。它们的临床呈现(其是非特异性的并且在初始阶段并不明显)是非常类似的。此外,NS和NEC经常共存于相同的疾病情况中(例如,在病例控制研究中,NEC与败血症在三分之一的NEC病例中发生)。迅速的抗微生物治疗和支持性护理的立即医疗管理是两种病状的护理标准。因此,尽早鉴定这些潜在致命的病状具有实际和临床重要性。

[0272] 用于早期且准确地鉴定炎性疾病或感染(例如,NS和/或NEC)的生物标记物对于帮助医师做出关于在常规测试信息不足的受试者(例如,婴儿)中初始使用和继续或早期终止抗生素治疗的挑战性决策是非常有用的。遗憾的是,当前没有临床上有用且有效管理这些挑战性疾病的广泛可用的生物标记物。最近降钙素原(PCT)已被批准作为生物标记物来帮助管理具有较低呼吸道感染和败血症的患者中的抗生素治疗,但是此标记物仅对于细菌感染是特异性的,并且在检测由病毒或其他非细菌感染引起的系统性炎性病状方面不是敏感的。此外,使用PCT测试在儿科患者,尤其是处于生命的前几天内的早产婴儿中仍然是有争

议的。因此,提供关于炎性疾病过程的严重性的信息的敏感生物标记物在管理炎性疾病或感染(例如,早产婴儿中的NS和NEC)中是临床上有用的。这仍然是主要的挑战。

[0273] IAIP的预测值与其他标记物在检测患有系统性炎症的婴儿和更“局部化的”疾病(自发性肠穿孔)中的比较研究

[0274] 确认IAIP是优异的严重性生物标记物,并且它可以从更局限性的炎性疾病自发性肠穿孔(SIP)辨别NEC。IAIP测试在从SIP诊断NEC方面优于CRP。

[0275] IAIP可以识别疾病严重性,例如局部炎性应答(SIP)相对于系统性和潜在威胁生命的炎性应答(NEC和NS)。在罗得岛州普罗维登斯(Providence,RI)的妇婴医院(Women& Infants' Hospital)从95名疑似患有新生儿败血症(NS)、坏死性小肠结肠炎(NEC)和自发性肠穿孔(SIP)的婴儿(64名女性和31名男性)采集血液样品。当从每位个体患者可获得时,还采集一系列样品。大部分婴儿是<30周胎龄(范围是23-31周),平均出生体重为1235克。从这些采集样品,获得8名患有已证明的NEC的婴儿,9名患有SIP的婴儿和20名患有NS的婴儿。因为先前已使用IAIP测定来针对NS确定正和负预测值,所以在系统性炎性疾病病状诸如NEC和更“局部化的”和局限性的坏死疾病病状诸如SIP中评定IAIP水平的预测值。还将这些婴儿中的IAIP和另一种炎性生物标记物C反应性蛋白(CRP)的水平与性别、体重和胎龄匹配的对照进行比较。使用针对人IAIP特异性的单一单克隆抗体(MAb 69.26)的竞争性ELISA用于测量血液IAIP的水平,并且CRPELISA试剂盒用于以盲式分析CRP水平。与健康婴儿($p<0.05$)和患有SIP的婴儿(没有射线照相NEC, $p<0.005$)相比,在诊断患有NEC(改变的Bell II阶段或更高)的婴儿中存在IAIP水平的显著降低。然而,在患有SIP的婴儿与健康对照之间不存在显著差异。相比之下,在患有NEC和SIP的婴儿中均存在增加水平的CRP,虽然所述增加不是统计上显著的($p>0.05$) (参见图15A至图15B)。此外,<4的截断值下的CRP的接收者操作特征(ROC)产生0.65的曲线下面积(AUC) ($p=0.01,95\%CI;0.54-0.90$),其中敏感性为100%,特异性为64.7%,正预测值(PPV)为18.7并且负预测值(NPV)为100;同时<207mg/L的截断值下的IAIP的ROC产生0.98的稳健AUC($p<0.0001,95\%CI;0.84-0.99$)。与CRP的预测值相比,IAIP的预测值更优异,其中敏感性为100%,特异性为88.2%,PPV为41,并且NPV为100(图16A至图16B)。

[0276] 来自婴儿的多个系列样品在NEC和SIP发作之前和之后可从一些或并非所有婴儿获得。使用建立的IAIP竞争性ELISA进一步分析了IAIP水平。在诊断时并在治疗开始之后,与SIP患者中存在的水平相比,患有NEC的婴儿中的IAIP水平显著更低(图17)。这些是仅从残余血液采集物获得的方便样品。这些结果证明,IAIP水平是以高敏感性和特异性鉴定威胁生命的系统性炎性病状诸如NEC(除NS之外)的有用生物标记物,并且IAIP水平似乎还在SIP患者中从较不威胁生命的病状区分NEC。IAIP测试证明在NEC(100%)和NS(98%)两者中的优异NPV。IAIP测试还可以用于指导治疗(例如,抗生素治疗)决策,诸如常规测试信息不足的婴儿中的早期终止。

[0277] 测量血液IAIP水平并检测NS和NEC的IAIP的定量竞争性横向流动免疫测定(LFIA)的原型开发

[0278] a) 测试形式和测定架构的选择:针对IAIP快速测试的形式选择基于横向流动免疫测定的测试(参见图18)。在开发快速及时测定时,LFIA提供许多优点,因为它们被设计来: 1) 使用小样品体积;2) 遵循良好表征的动力学并提供快速间隔来测试结果;3) 在分析上是

敏感且精确的;4)通常含有内部对照来验证装置的适当性能;5)由良好表征且广泛可获得的原材料制备;并且6)产生可以使用条读取器定量分析的信号。因此,作为IAIP快速测试的LFIA可以例如在及时环境下使用。

[0279] b) LFIA的捕获、检测以及样品试剂和条件的优化:

[0280] 初始努力成功地通过优化横向流动免疫测定的捕获、检测、样品试剂和条件来将建立的竞争性IAIP ELISA用于竞争性LFIA形式。进一步建立了剂量响应曲线,并且评估了快速IAIP测定形式的信号时间、精确度和可重复性。使用Qiagen测试条读取器初始采用测试结果的数据分析。在这些初始测试之后,继续优化测试条和测定条件,并且测试若干可获得并适用于测试条的便携式读取器。

[0281] c) 针对IAIP的纯化的IAIP和单克隆抗体(MAb 69.26):两种试剂均是用于竞争性测定形式的关键组分。已开发并优化了用于从人血浆分离IAIP的产生高产率和高纯度的可扩展生物处理方法。杂交瘤细胞在可扩展的细胞系培养烧瓶(Integra Bioscience)中生长以用于体外抗体大规模生产。通过亲和力蛋白质A色谱法从杂交瘤上清液分离IgG。

[0282] d) 测试条:制备多个试验性批次的条,并且选择的配方是用于定量测量人血浆中的IAIP的稳定平台:1) 样品垫:具有缓冲液和上清液的纤维素垫;2) 缀合物垫:具有抗IAIP(MAb 69.26)金缀合物和兔IgG金缀合物(对照泳道)的玻璃纤维垫;3) 硝酸纤维素:IAIP剥离(测试泳道)和山羊-抗兔IgG剥离(对照泳道末端芯:纤维素垫(无配方))的快速流动(Millipore HF090)硝酸纤维素。

[0283] e) 样品:将小体积的血浆(15 μ l的1:5稀释样品)添加至条,然后添加115 μ l chase缓冲液来将样品推动通过条。优化chase缓冲液:2mM Tris pH 8.0+100mM NaCl+0.5%Brij+0.05%Tween 20+1.0%胎牛血清。将Brij上清液添加至缓冲液以促进缀合物从条的上游部分的快速清除。

[0284] f) 运行时间:将条在血浆样品或IAIP校准物(在三个不同的浓度下)的情况下运行,并且然后在样品添加之后在10、15、20、25、30、45和60分钟时通过Qiagen读取器定量。条在约7min内运行(即,硝酸纤维素已清除外来金),并且可以在此之后任何时间读取。发现在15min之后,信号没有很大地改变。因此,在添加样品之后15min时统一读取条。

[0285] g) 校准物 and 对照:使用具有基于ELISA结果的已知IAIP值的人血浆(Rhode Island血液中心)作为校准物和内部标准对照。通过用含有1%FCS的缓冲液稀释血浆来产生不同的剂量。使用便携式Qiagen测试读取器(ESEQuant LFR),建立了范围是17.5至1100 μ g/mL的标准曲线(使用1:5样品稀释度)。通过在5天内每天的在不同时间处重复并运行一组校准物多达13次来测试校准曲线跨数天的再现性。结果在图19中示出。对每个值的平均值和SD进行绘图。结果显示,测试展示在5天时间段内的紧密分布,具有优异的变异系数(CV小于15%)。

[0286] h) 测试条读取器和软件:因为IAIP快速测试旨在是定量的,所以小心选择了一个读取器来捕获由测试条生成的信号。各种类型的测试条读取器是可商购获得的。读取器的选择是基于特征和规范,诸如工程学、人体工程学和软件稳健性。因为这是快速测试的重要部分,所以测试用于IAIP快速测试条的具有不同技术和特征的三种不同读取器。1) 便携式台式横向流动读取器(Qiagen的ESEQuant LFR);2) 手持式基于PDA的读取器Detekt RDS 1500 Pro (Detekt Biomedical, Austin, TX) 和3) 基于智能手机/平板电脑的读取器系统

(iCaIq读取器-iCaIq, Salt Lake City, UT)。发现Detekt读取器产生比其他测试的读取器更好的范围是5至700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的线性曲线。

[0287] 优化测定的测定间和测定内精确度的确定

[0288] 使用连续6天重复运行的采集的血液样品 ($n=6$) 确定快速测试的测定间精确度特征。随后使用三种不同的便携式和手持式读取器读取结果, 并且从每个个体样品获得的结果计算变异系数 (CV)。使用ESEQuant读取器进行的IAIP快速测试的CV的范围是4%至16%之间, 平均值为13%, 而Detekt读取器展示10%的平均CV (范围是5% - 16%), 并且iCaIQ基于智能手机的读取器产生16%的平均CV (范围是10% - 23%)。Detekt读取器以比所测试的其他两种读取器相对更低的CV而性能更好。为了评估测试的测定内精确度, 运行8个血浆样品并且基于优化方案分析IAIP水平。在各种读取器上读取三次从每个样品获得的信号, 并且基于所建立的标准曲线单个地计算IAIP值。随后, 根据一式三份的读取确定CV, 并且发现对于所测试的全部三种读取器, 范围是2%至8%之间, 平均CV为5%。

[0289] 婴儿血浆中快速测定的性能评定

[0290] 使用在妇婴医院从婴儿采集的样品, 针对以上所述的IAIP测试条基于优化条件进行IAIP的分析。使用三种独立的读取器顺序读取所得的信号, 并且基于读取器的相应标准曲线计算结果。将快速测试的结果与通过建立的竞争性ELISA测定获得的结果进行比较, 并且将每个个体样品的值针对快速测试的结果进行绘图 (图20A至图20C)。结果证明, 6小时竞争性ELISA与通过使用ESEQuant读取器 (相关系数 R^2 为0.832, $n=311$) 和Detekt读取器 ($R^2=0.84$, $n=339$) 在15分钟内生成的快速竞争性LFIA测试结果之间的优异相关性。然而, iCaIQ基于智能手机的读取器产生与ELISA结果较不可比的测试结果, 尤其是在含有高水平IAIP ($>600\mu\text{g}/\text{mL}$) 的样品中。

[0291] 总之, 成功地将基于6小时实验室的竞争性ELISA转化为及时IAIP快速测试, 其能够以可接受的测定内和测定间精确度 (小于20% CV) 在15分钟内准确地 (与ELISA结果相比, 相关系数 $R^2>0.8$) 测量血液中的循环IAIP (范围是10-800 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。确认了血液IAIP水平不仅对于NS, 对于NEC也是有用的预测标记物, 具有高敏感性 (100%) 和高特异性 (88%)。IAIP测试在检测NEC方面比CRP测试更具特异性, 并且IAIP水平也可用于从SIP患者区分NEC。

[0292] 鉴于成功地将竞争性测定改编为LFIA形式, 预期本文所述的“夹心型”IAIP ELISA (例如, 如图3A所示) 也可以改编为LFIA形式。IAIP的快速定量可以使得早期鉴定患有炎症性疾病或病状或感染 (例如, 败血症、NEC、细菌感染或另一种疾病或病状) 或者处于发展炎症性疾病或病状或感染的风险的受试者 (例如, 人受试者, 诸如婴儿、儿童、青少年或成年人) 并及时开始最佳疗法。

[0293] 实施例11: 透明质酸-IAIP结合测定

[0294] 将透明质酸钠盐 (Sigma-Aldrich) 溶解在 dH_2O 中 (1mg/mL的储液浓度), 并且进一步稀释到pH 9.0下的20mM $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 缓冲液中。将每孔50、100和200ng透明质酸在37 $^\circ\text{C}$ 下固定在96孔微板 (Greiner BioOne, Microlon 600) 上, 持续120分钟。在37 $^\circ\text{C}$ 下用在TBS-T (pH 7.3下的20mM Tris缓冲盐水溶液+0.05% Tween-20 (v/v)) 中的5% 脱脂干燥奶粉封闭60分钟并用TBS-T洗涤3次之后, 将系列稀释的含有IAIP (TBS中的人血浆和高度纯化的IAIP) 的溶液添加至微板并且在37 $^\circ\text{C}$ 下温育60分钟。通过将从当地血库获得的新鲜冷冻血浆进行低温沉淀来制备人血浆。在此实验中使用低温上清液, 并且具有250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的IAIP浓

度。纯化的IAIP的起始浓度为1mg/mL。然后将微板用TBS-T洗涤3次,并且添加在TBS中1:1000稀释的生物素缀合的MAb 69.26 (针对人IAIP的单克隆抗体)并且在37°C下温育30分钟。

[0295] 在用TBS-T额外洗涤三次之后,添加在TBS中稀释至1:5000的辣根过氧化物酶(HRP)缀合的链霉抗生物素蛋白(Inova Bioscience)并且在37°C下温育30分钟。在用TBS-T洗涤3次之后,将50 μ L Enhanced K-Blue TMB底物(Neogen)添加至每个孔,并且通过添加50 μ L 1M盐酸(HCl)来使反应停止。在650nm波长处使用分光光度计(分子装置SpectraMax加上微板读取器)读取颜色变化,并且将人血浆或纯化的IAIP的标准曲线在50、100和200ng/孔固定的透明质酸下绘图(图21A至图21B)。这些数据显示,IAIP可以通过使用透明质酸捕获IAIP复合物分子并且使用对于IAIP的轻链具有特异性的单克隆抗体(例如,MAb 69.26)检测捕获的IAIP来在生物混合物中定量测量。如图21A至图21B所示,可以使用具有已知量的IAIP的纯化IAIP或人血浆来优化并建立标准曲线。因此,此测定可以用于定量来自受试者的生物样品中的未知量的IAIP。可以采用此方法的替代性方式,其中使用IAIP特异性单克隆抗体来捕获IAIP,并且使用生物素标记的透明质酸作为配体来检测结合的IAIP,与实施例1和2中使用的方式类似。

[0296] 其他实施方案

[0297] 以上说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请都特此以引用的方式并入,如同每一独立的出版物、专利或专利申请具体且单独地指示以引用的方式整体并入。美国临时申请号62/490,003和62/614,333具体地整体并入本文。本发明的所述方法、药物组合物和试剂盒的各种改进和变化对于本领域技术人员将是显而易见的,而不背离所要求保护的发明的范围和精神。虽然已结合具体实施方案描述了本公开,但应理解的是,能够做出进一步的改进并且要求保护的本发明不应不适当地局限于此类具体实施方案。

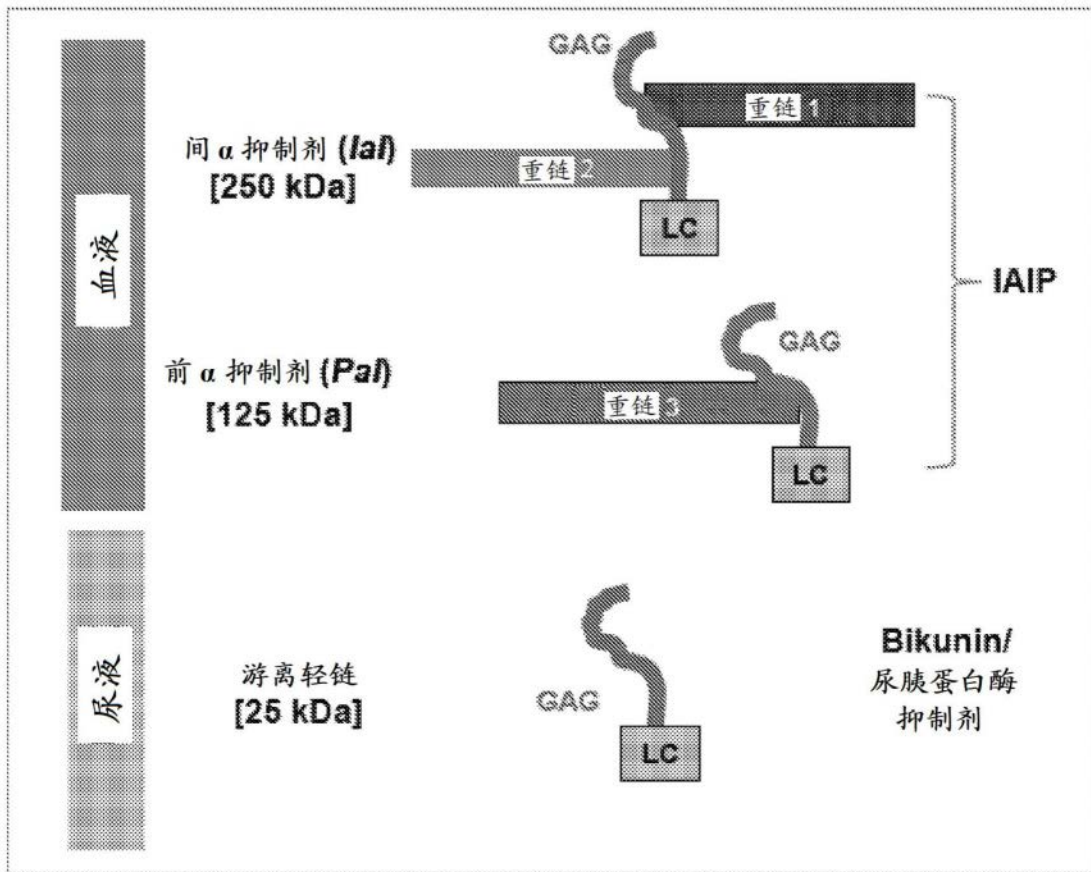


图1

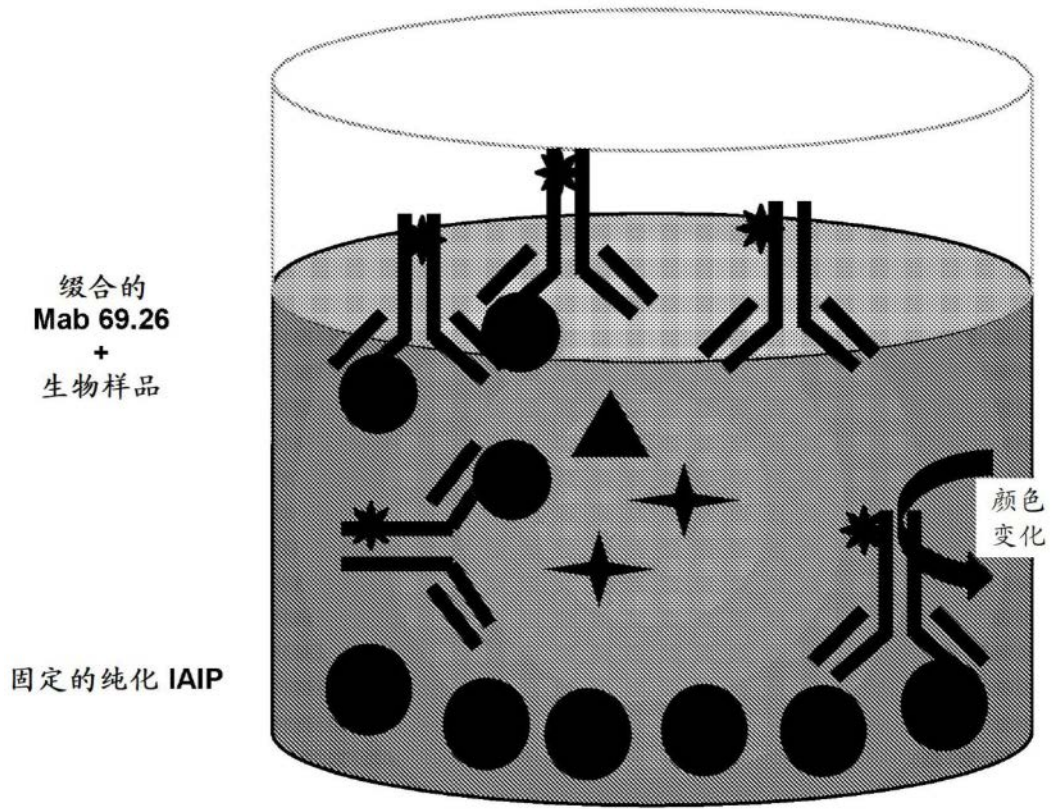


图2A

标准曲线

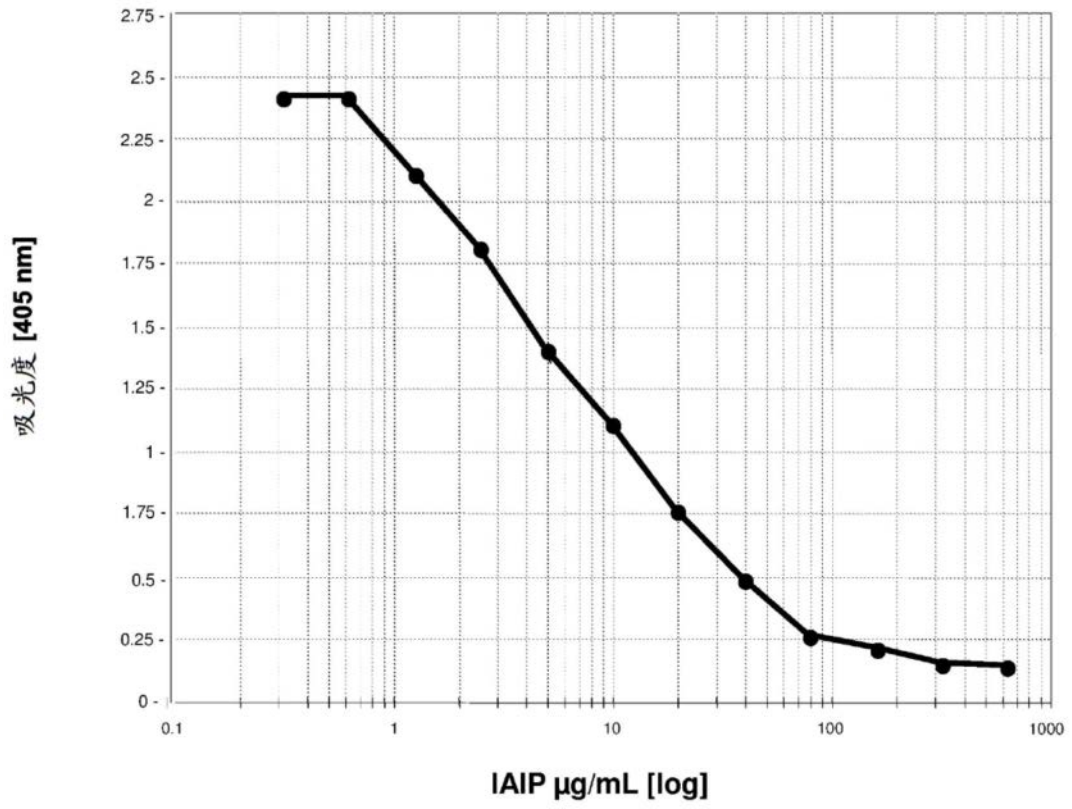


图2B

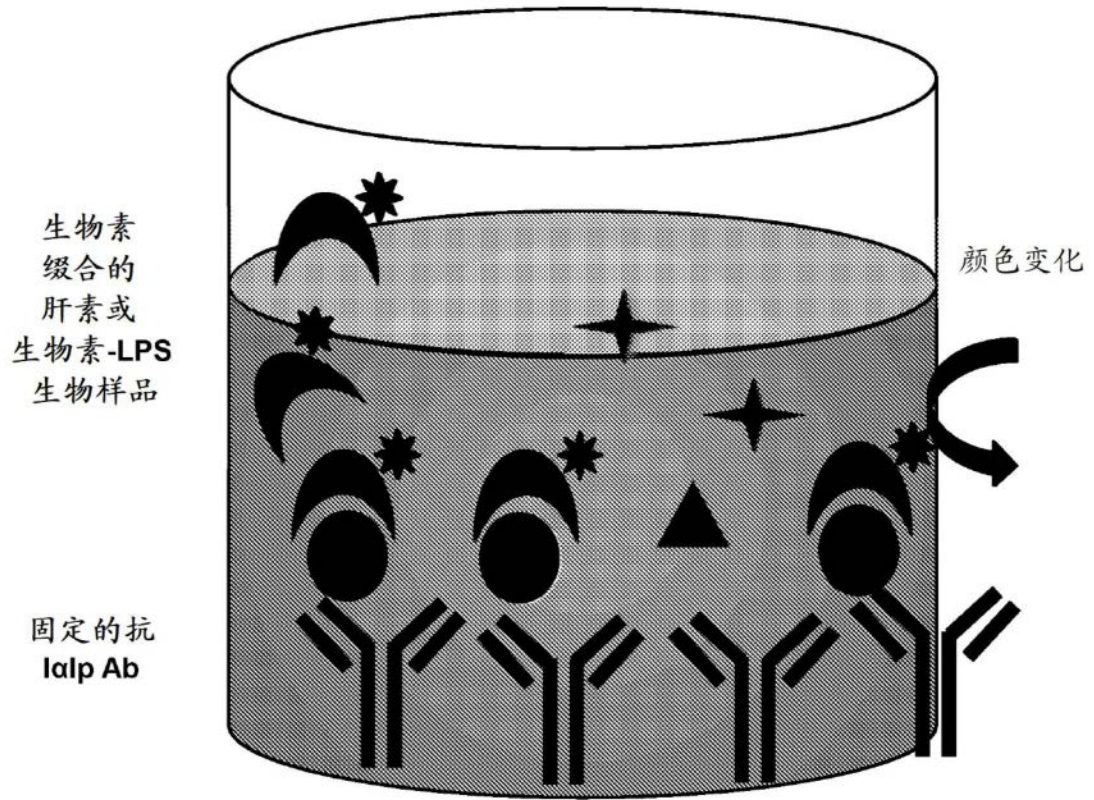


图3A

肝素-IAIP 标准曲线

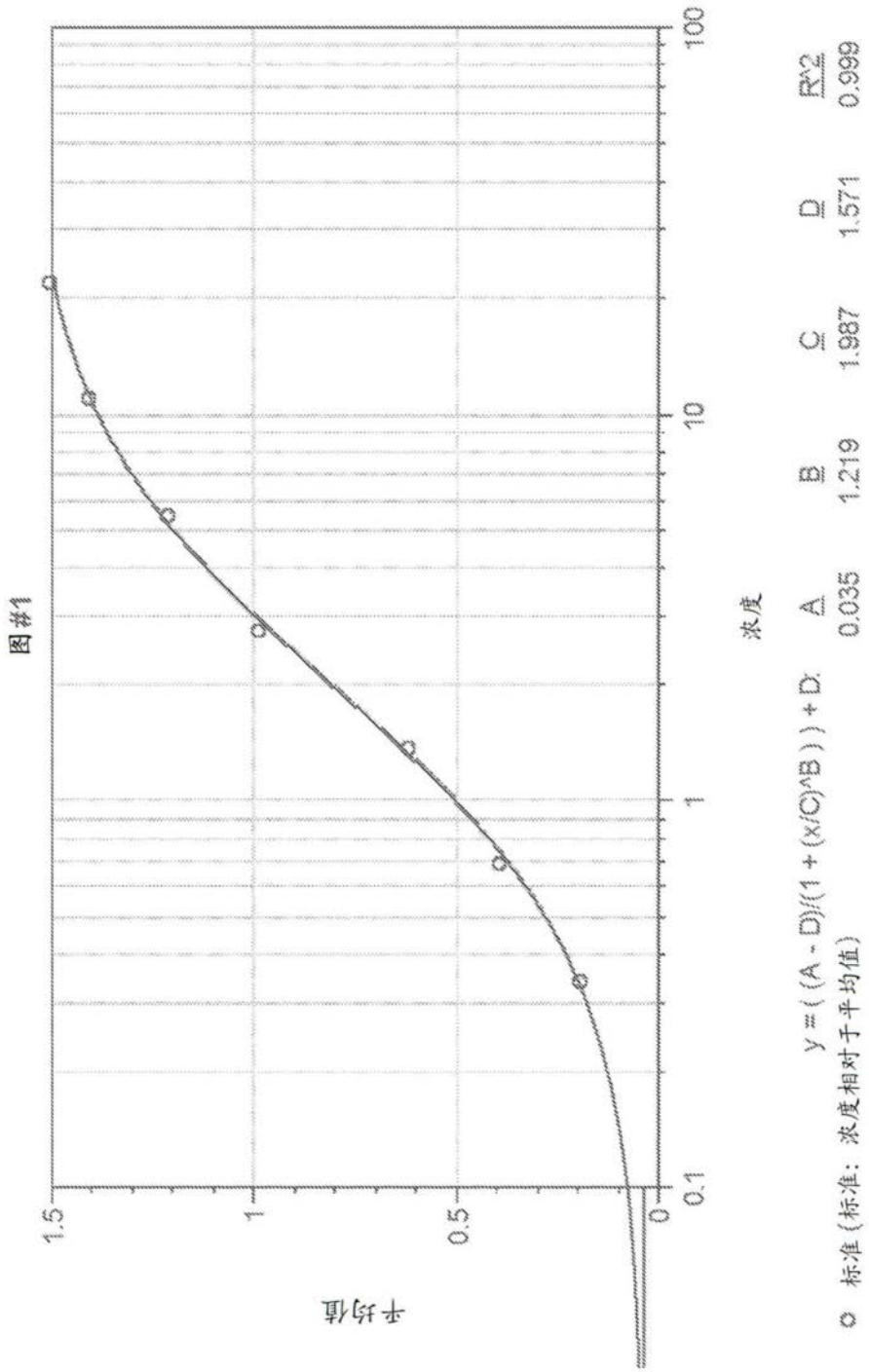


图3B

内毒素-IAIP 标准曲线

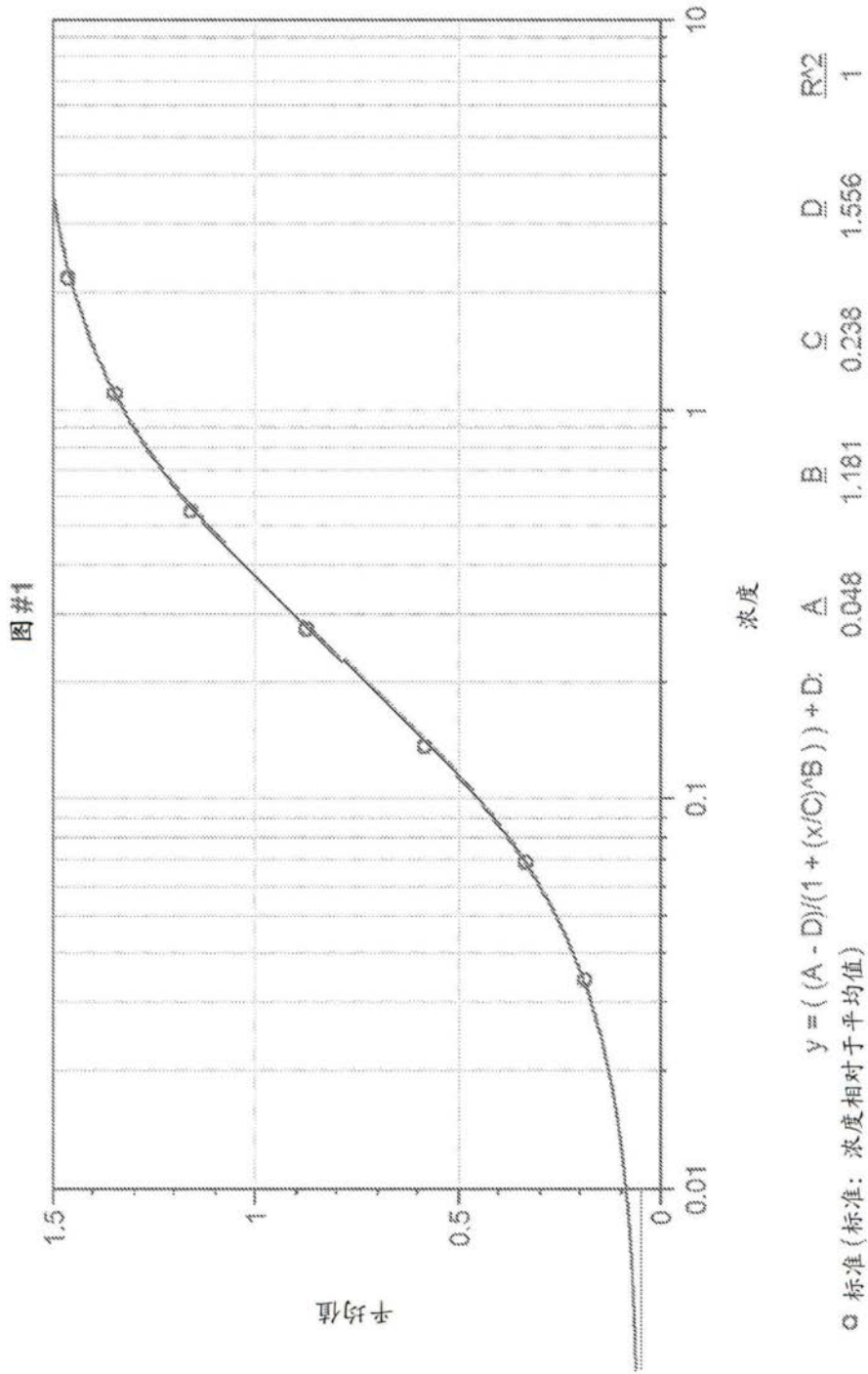


图3C

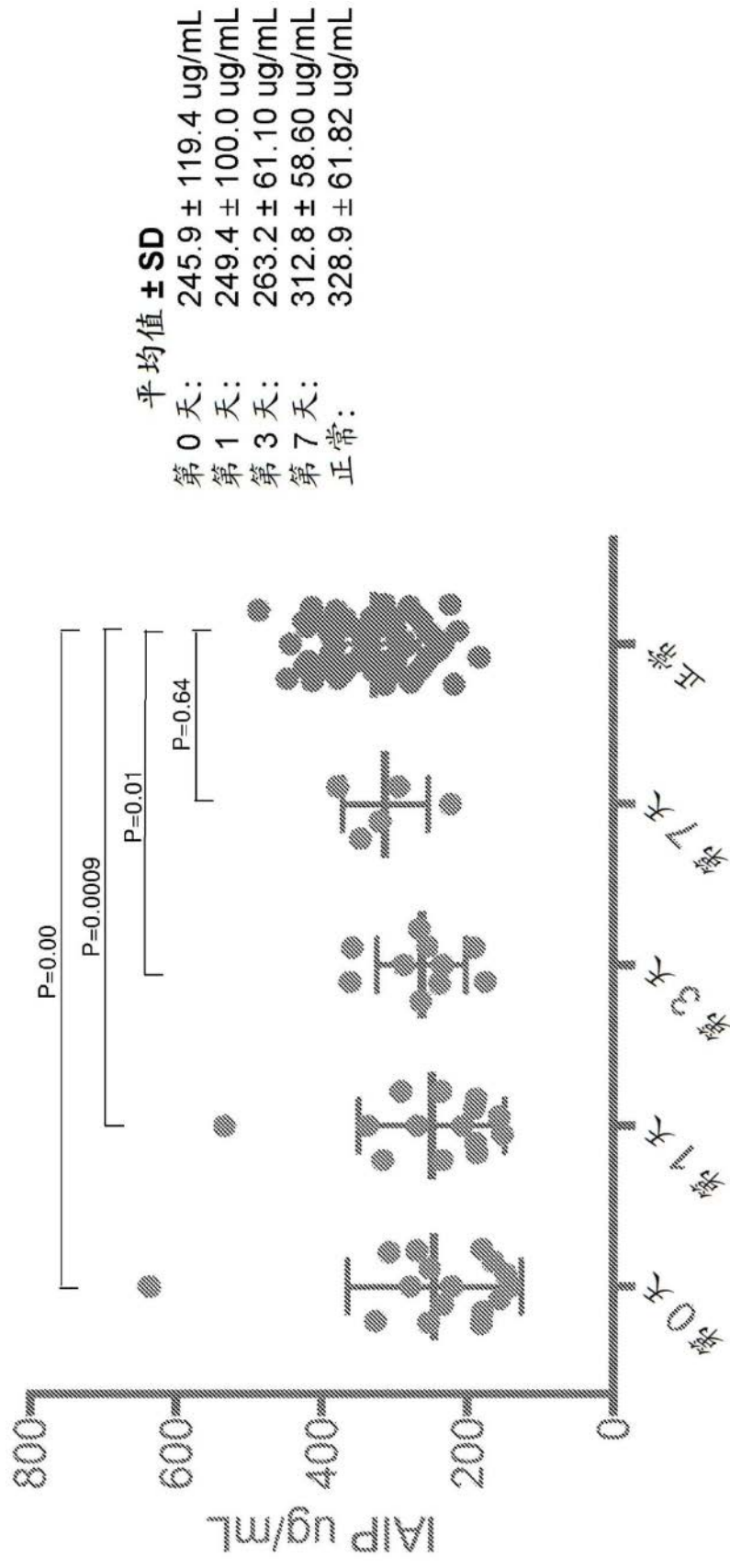
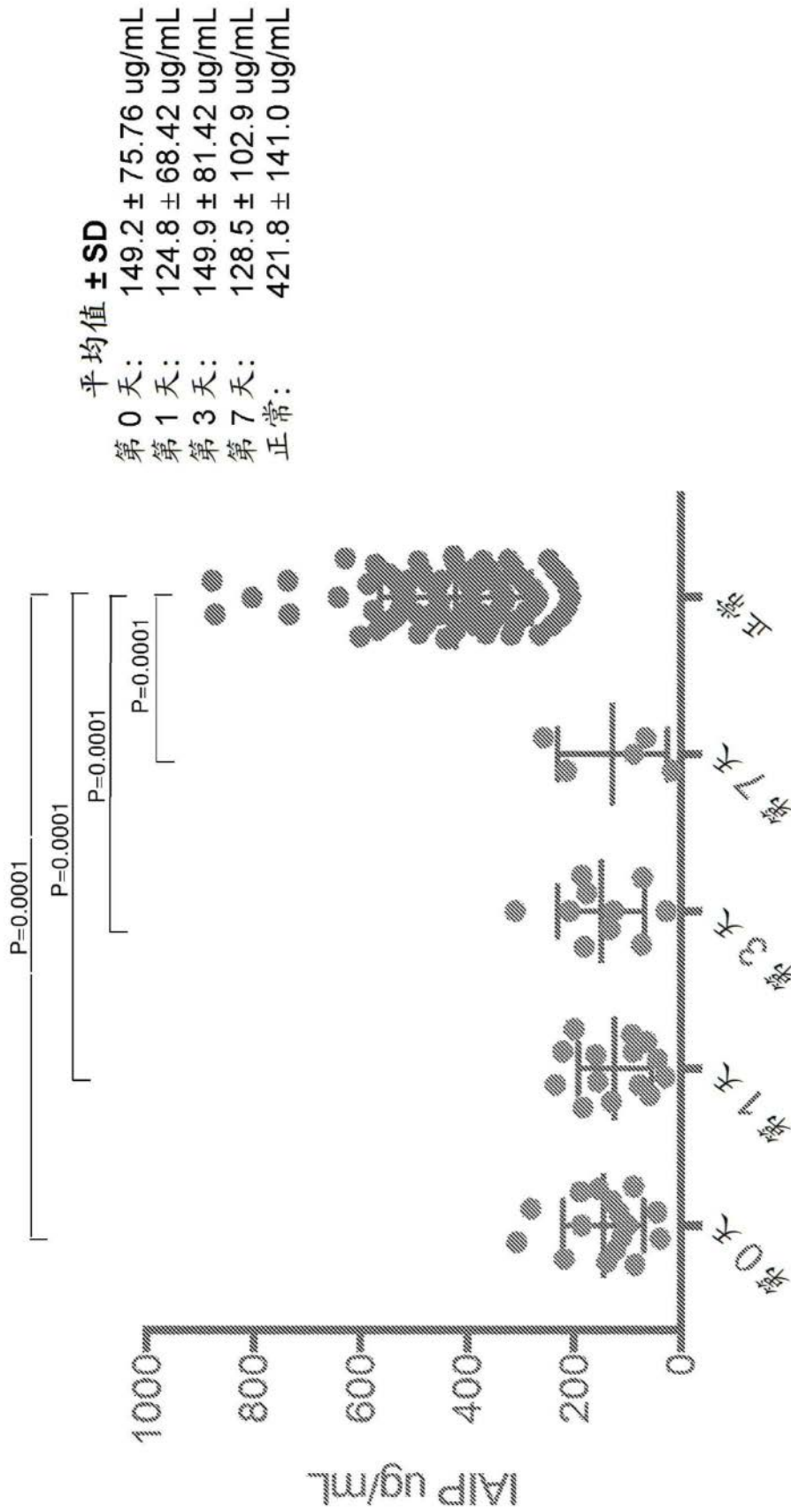
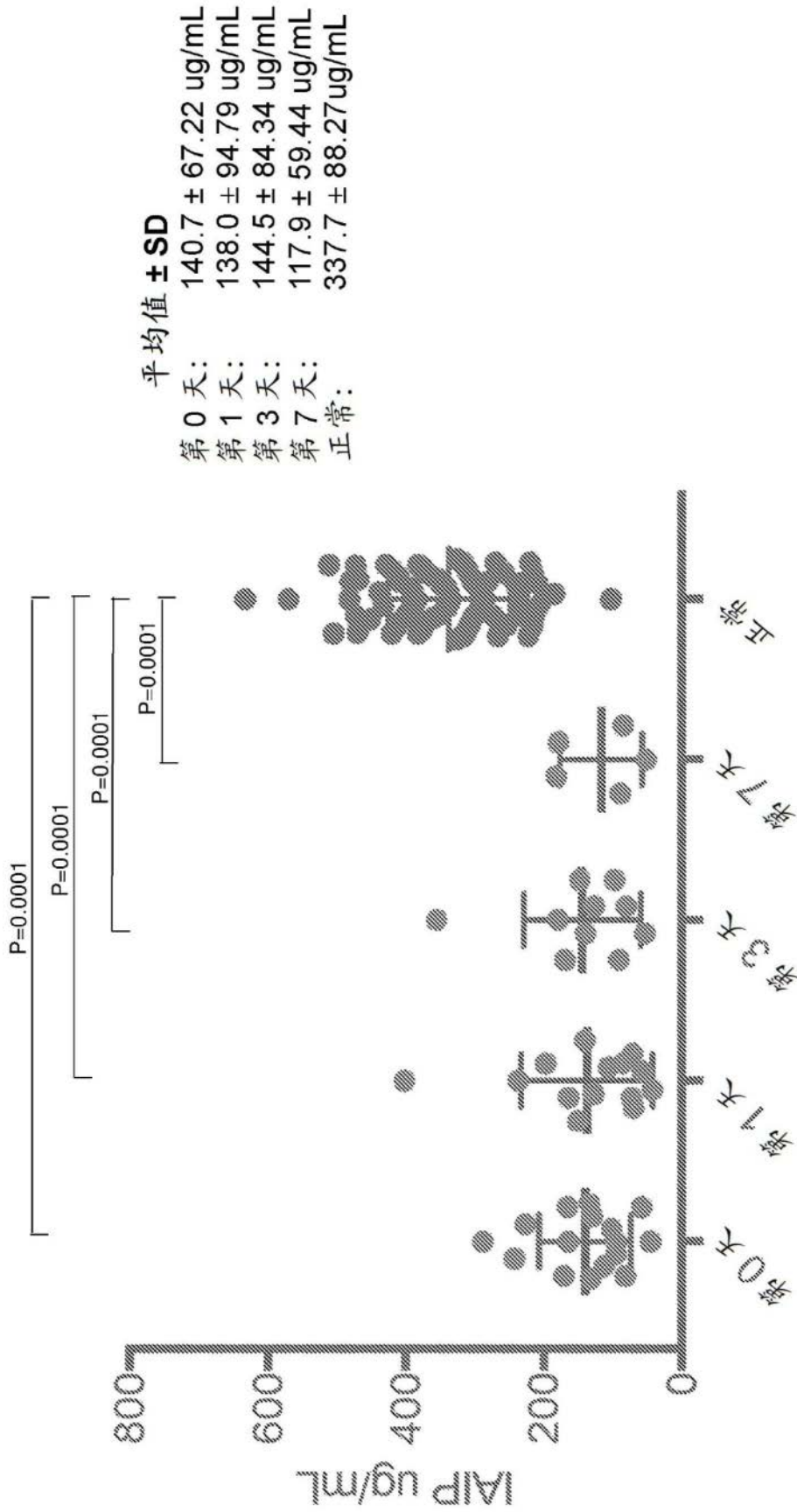


图4



平均值 \pm SD
第0天: 149.2 \pm 75.76 ug/mL
第1天: 124.8 \pm 68.42 ug/mL
第3天: 149.9 \pm 81.42 ug/mL
第7天: 128.5 \pm 102.9 ug/mL
正常: 421.8 \pm 141.0 ug/mL

图5



平均值 ± SD
第0天: 140.7 ± 67.22 ug/mL
第1天: 138.0 ± 94.79 ug/mL
第3天: 144.5 ± 84.34 ug/mL
第7天: 117.9 ± 59.44 ug/mL
正常: 337.7 ± 88.27 ug/mL

图6

1= 人血浆
2= 纯化的 IAIP
3= Bikunin (IAIP 轻链)
4= 人血清白蛋白

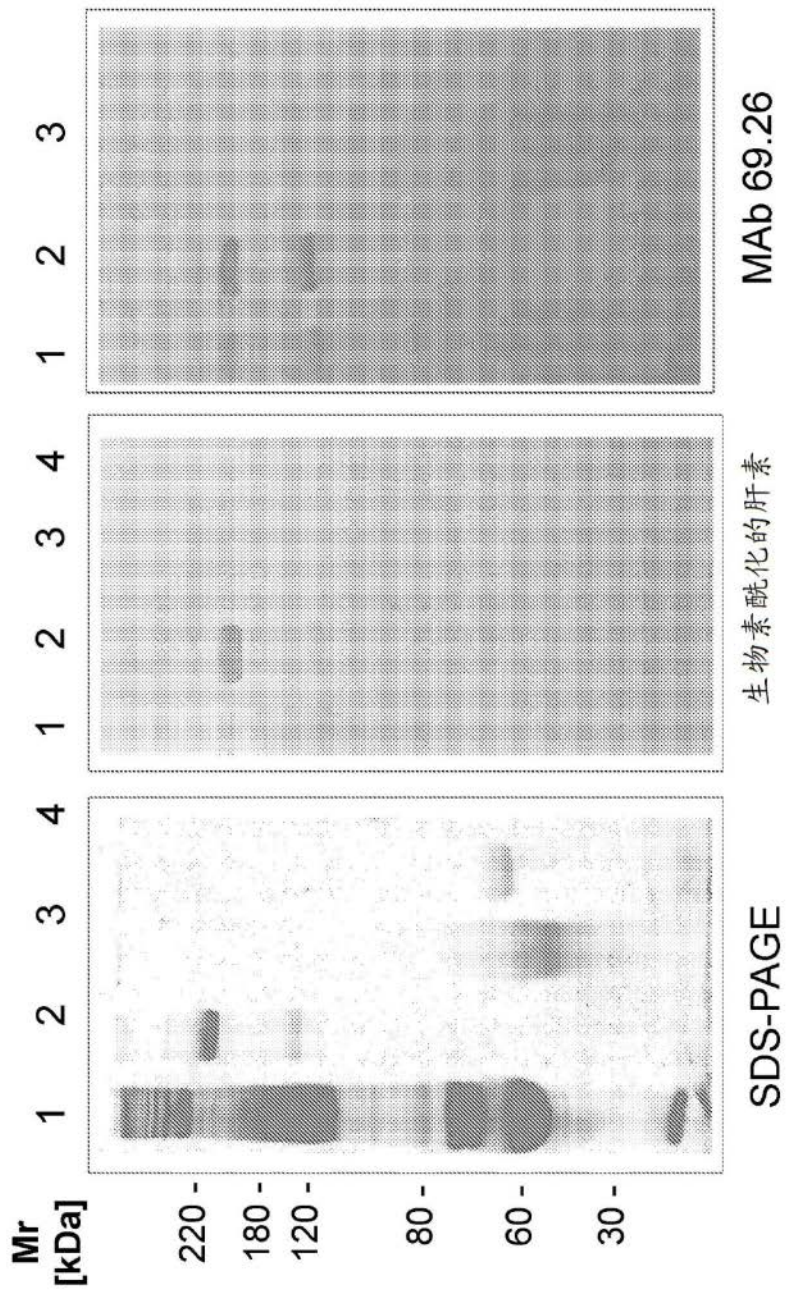


图7

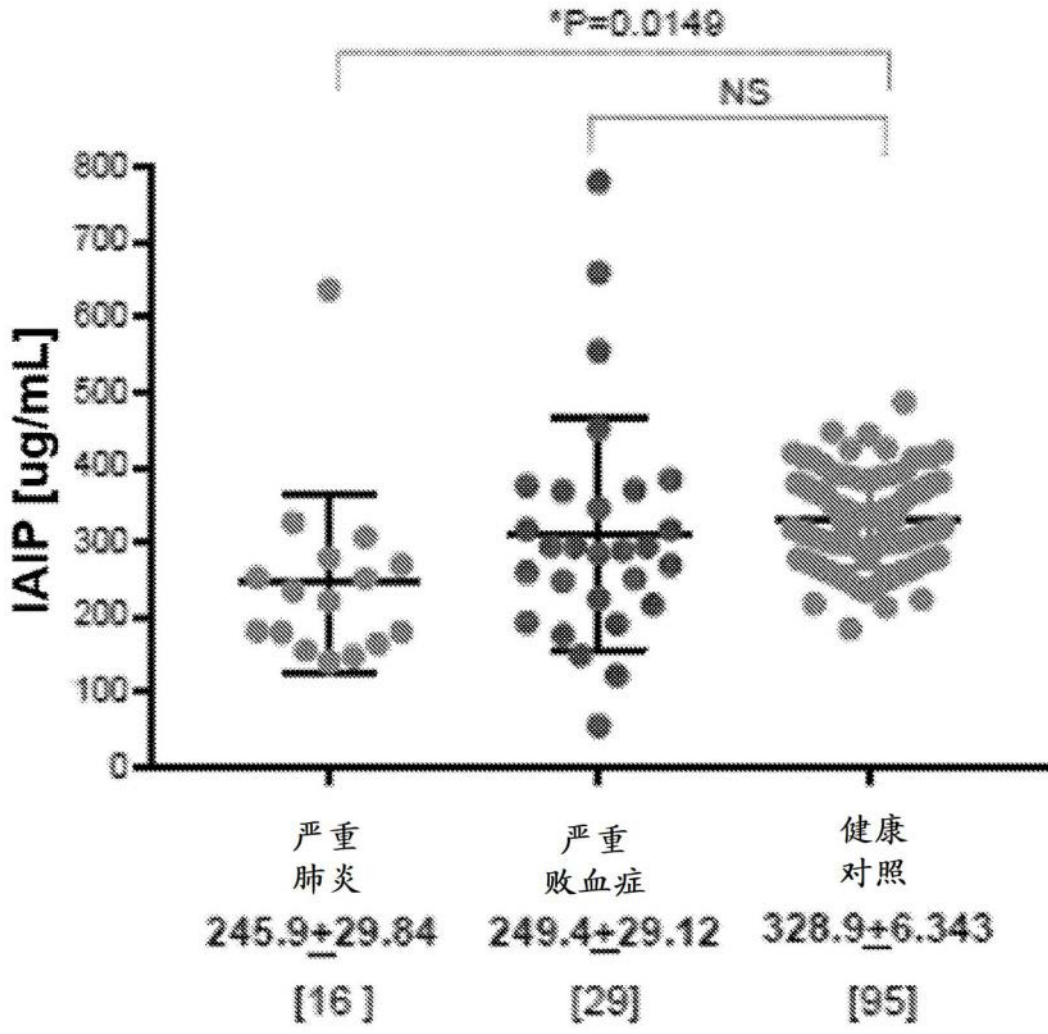


图8A

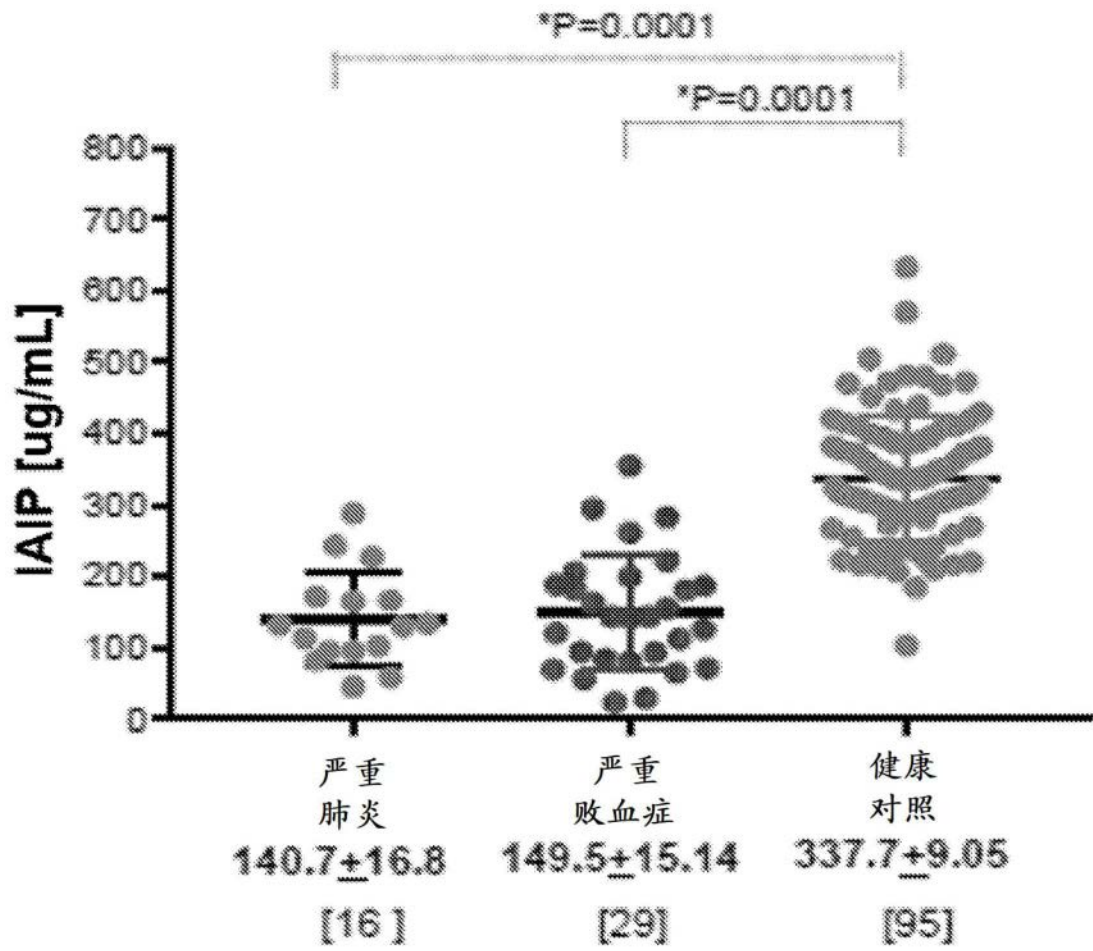


图8B

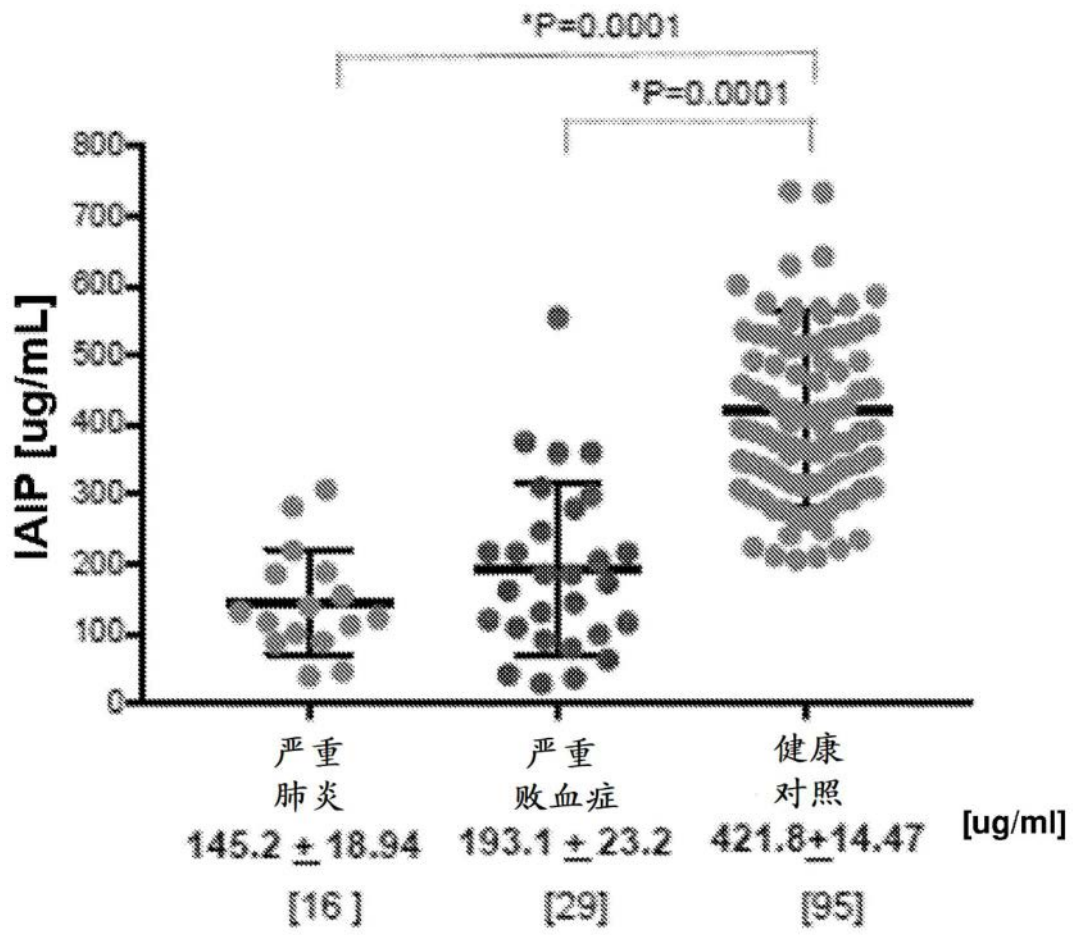


图8C

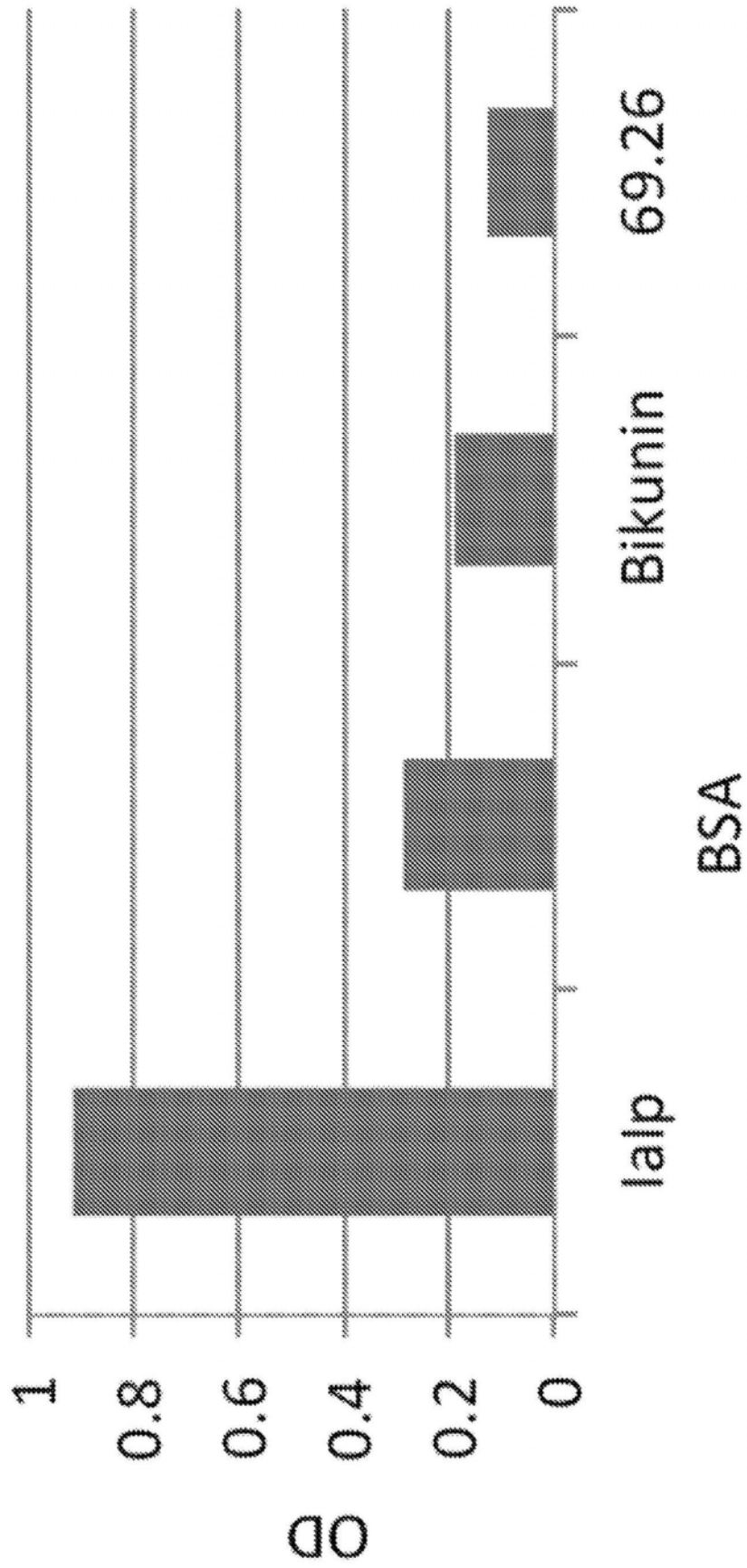


图9

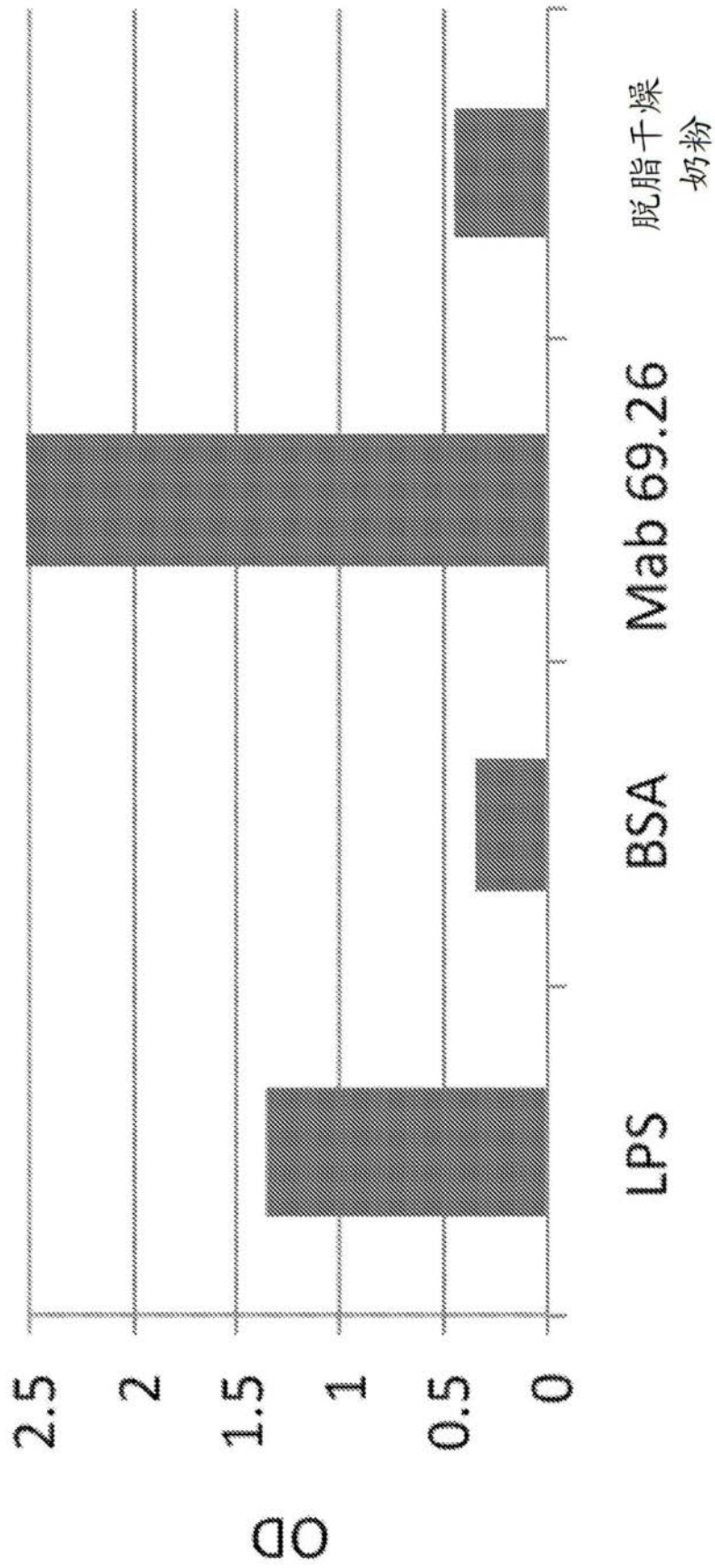


图10

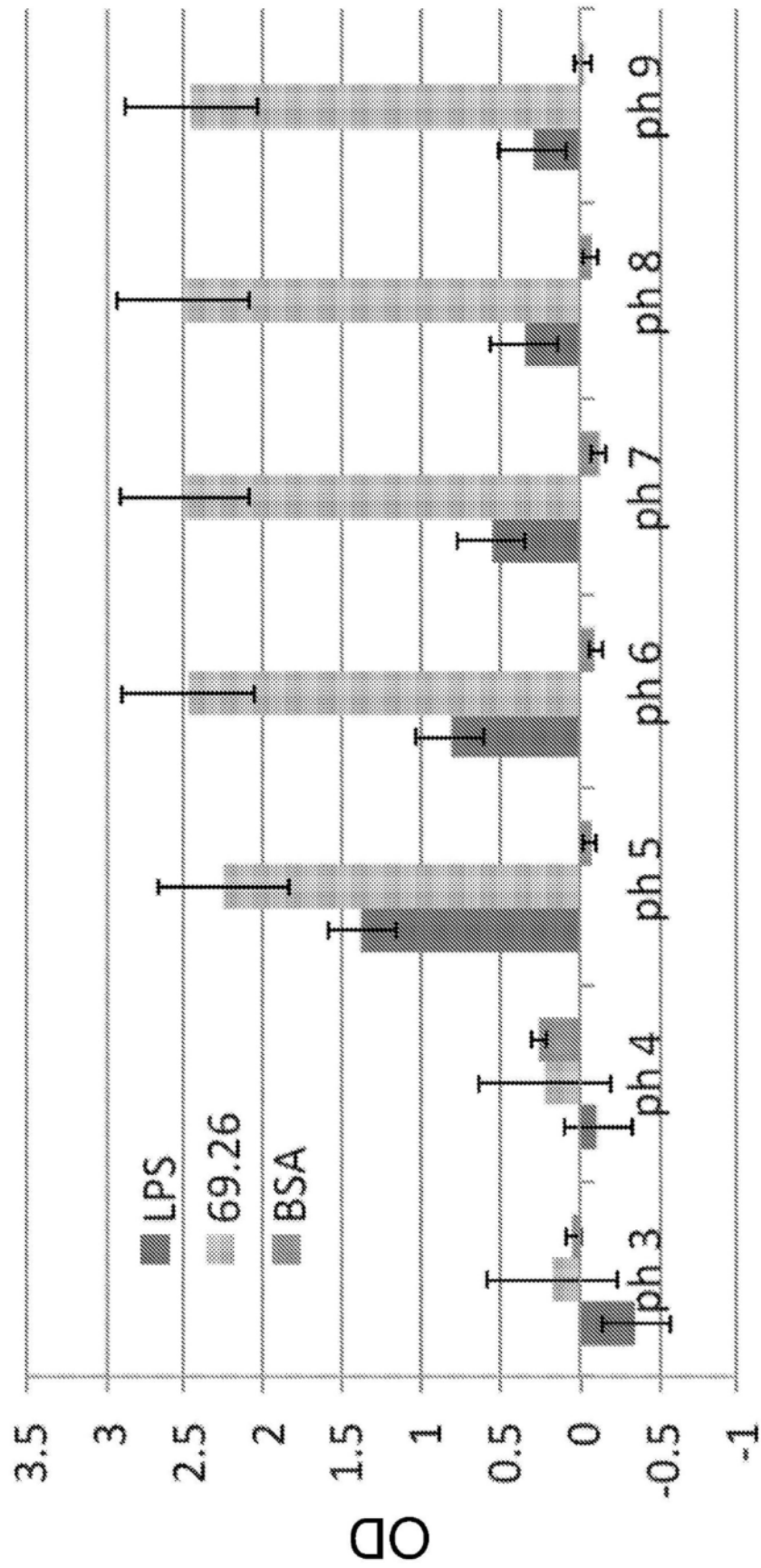


图11

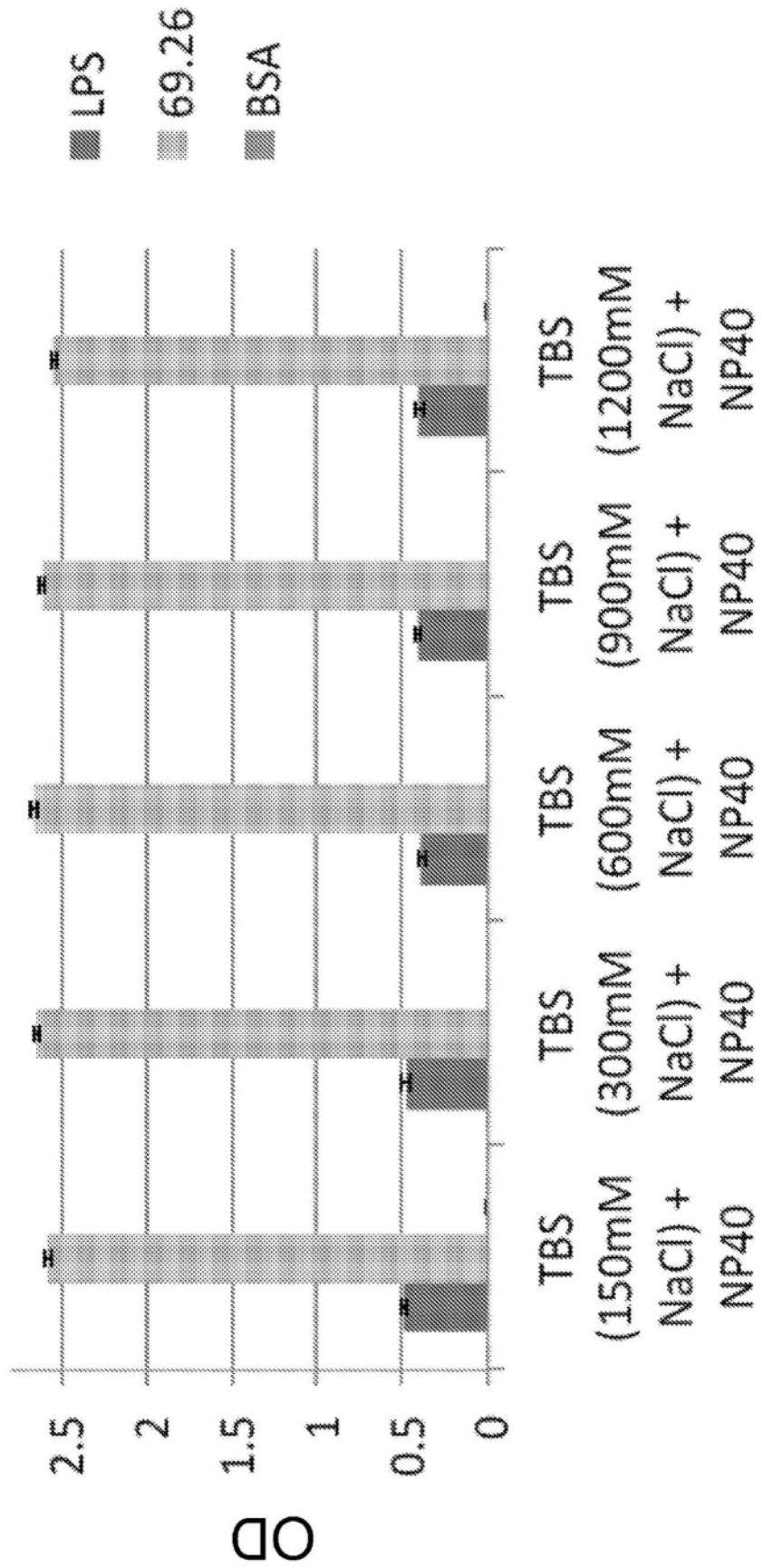


图12

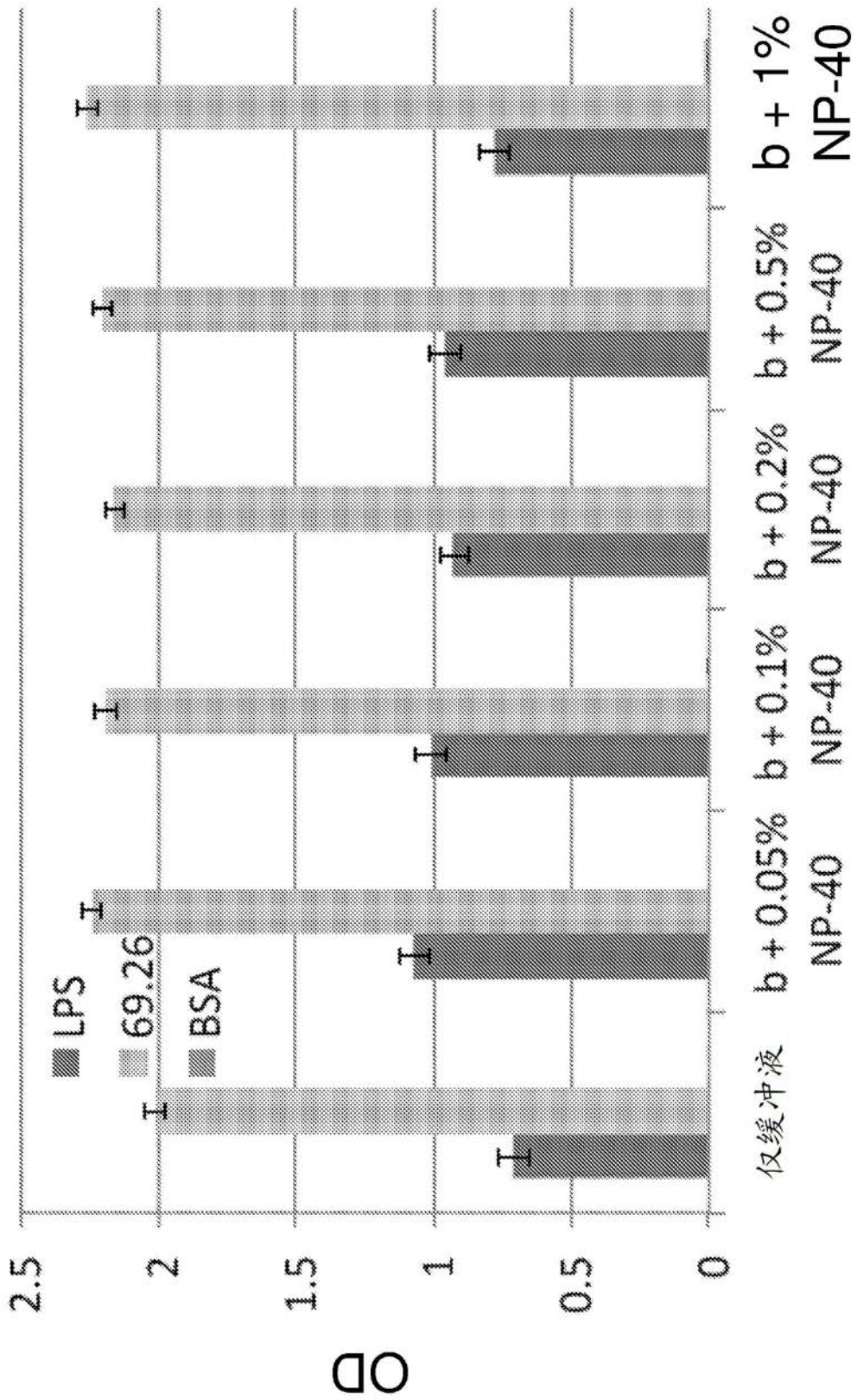


图13

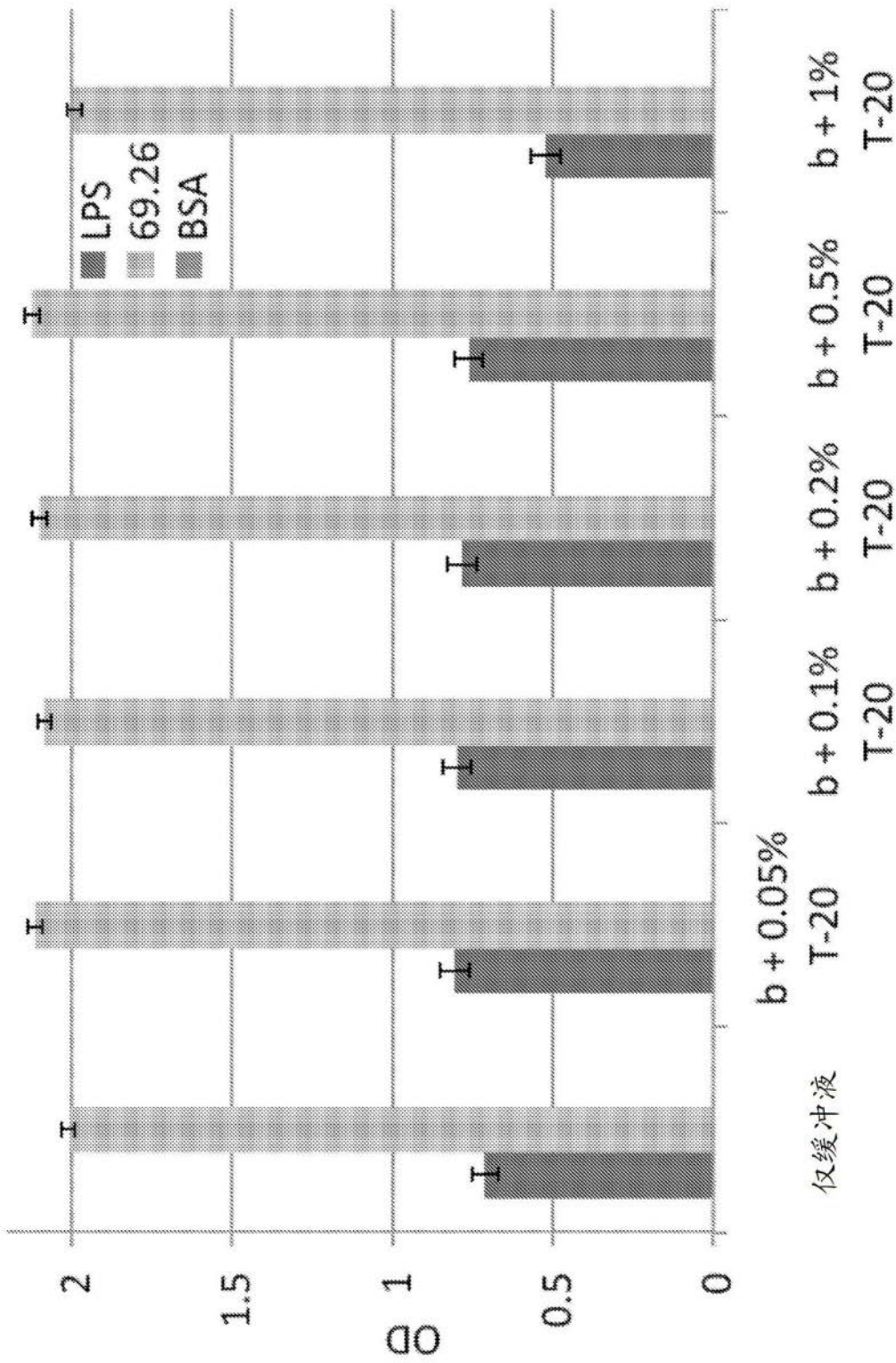


图14

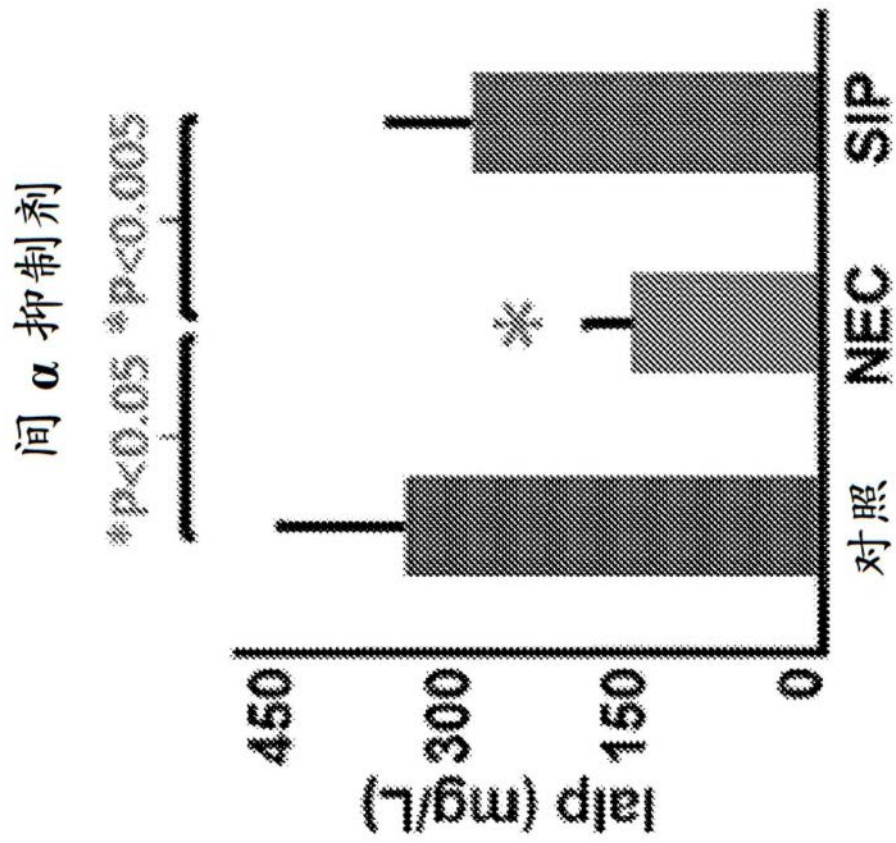


图15A

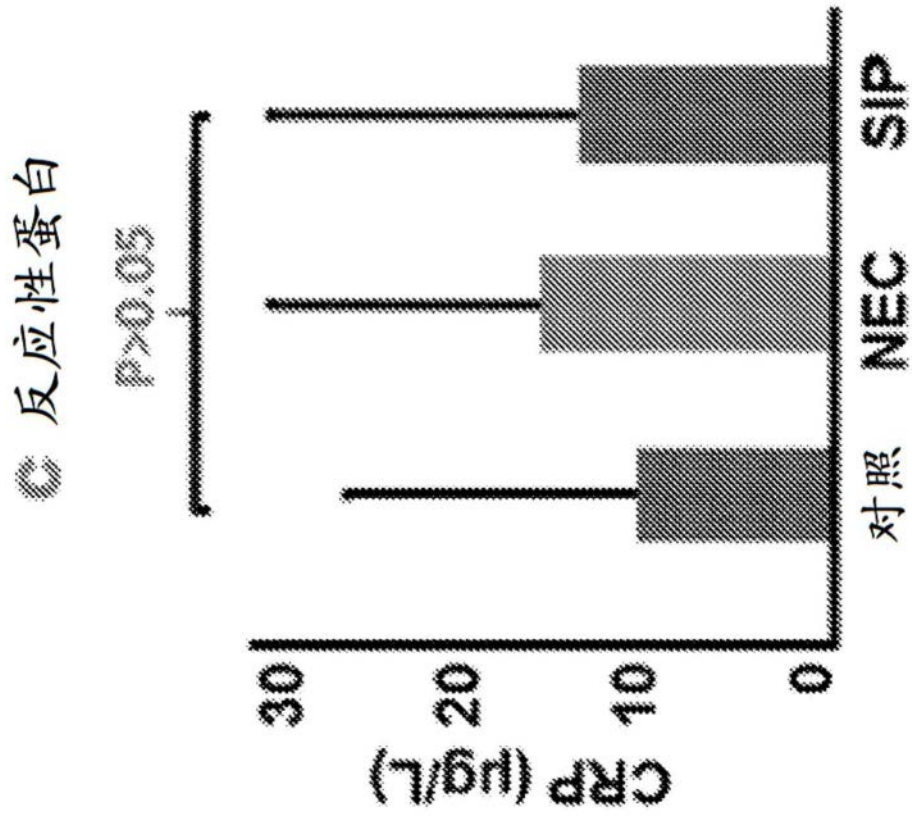


图15B

间 α 抑制剂

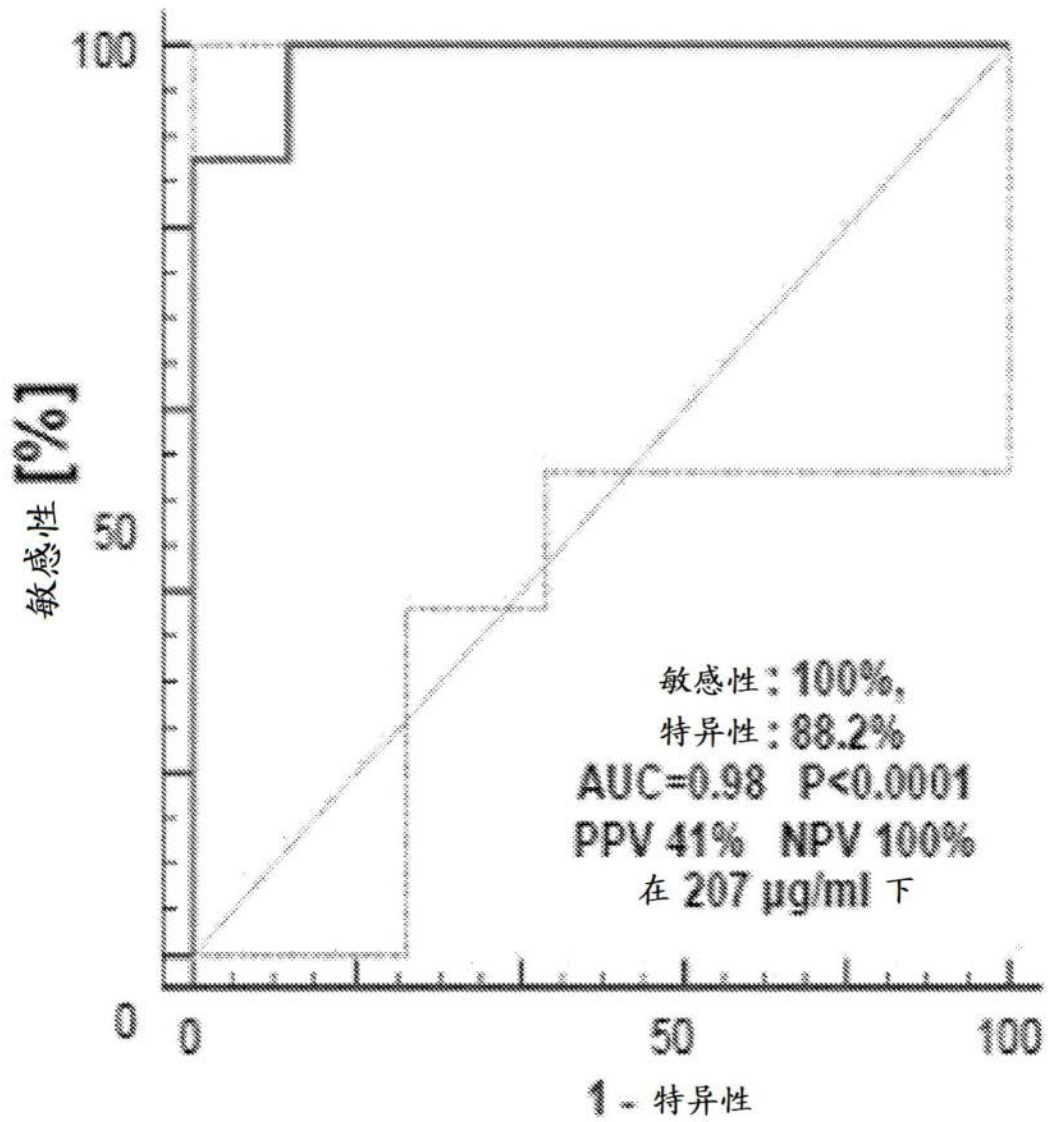


图16A

C 反应性蛋白

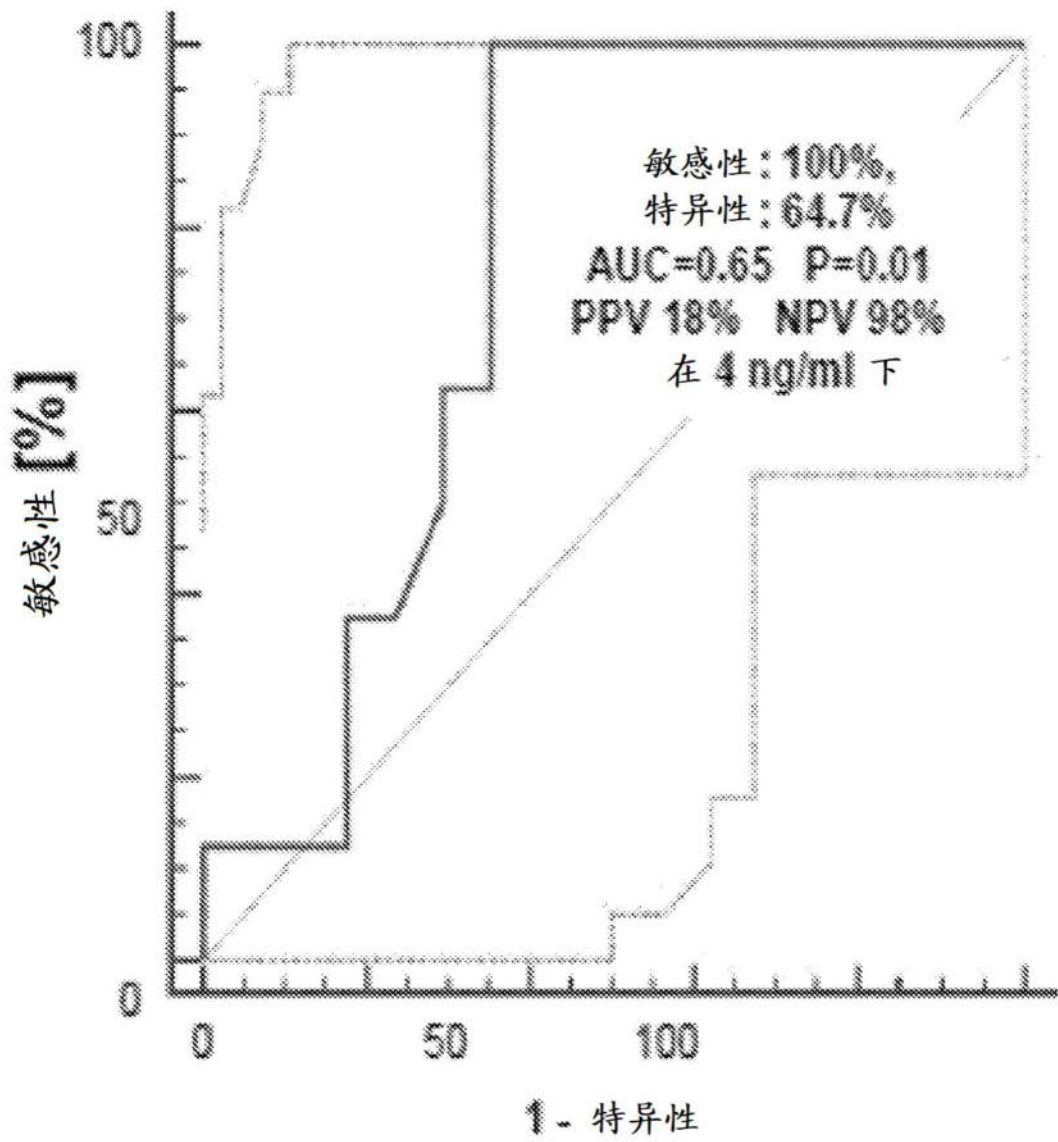


图16B

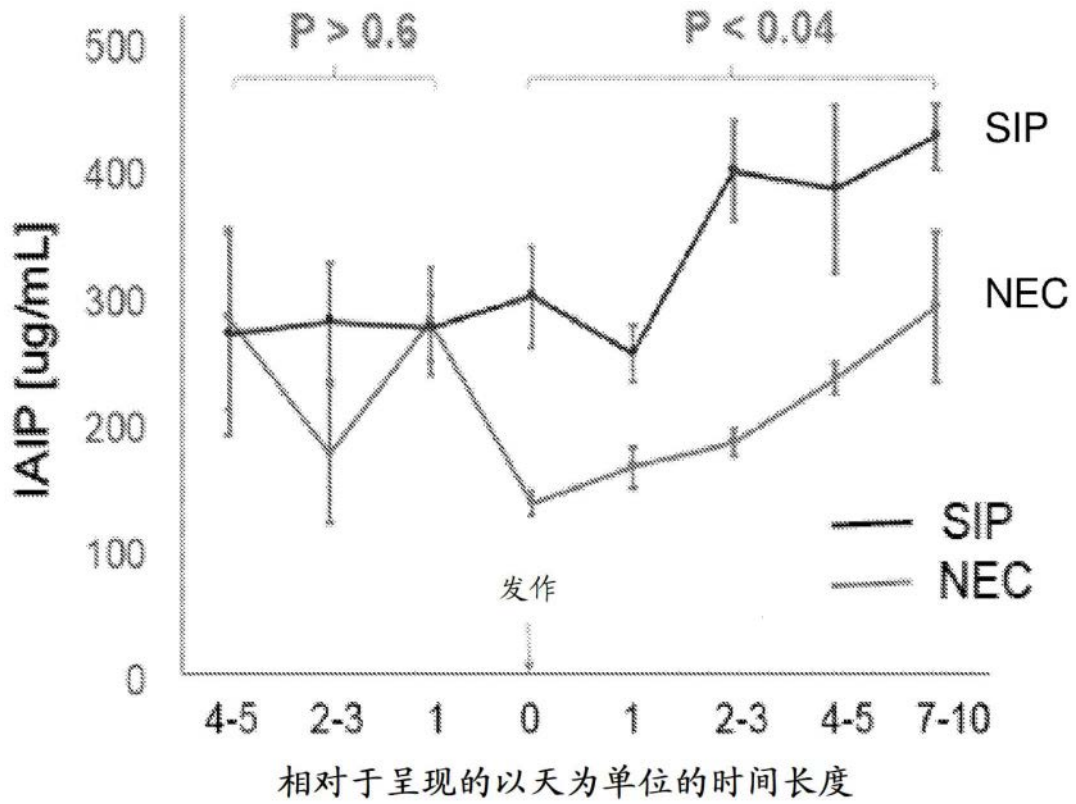


图17

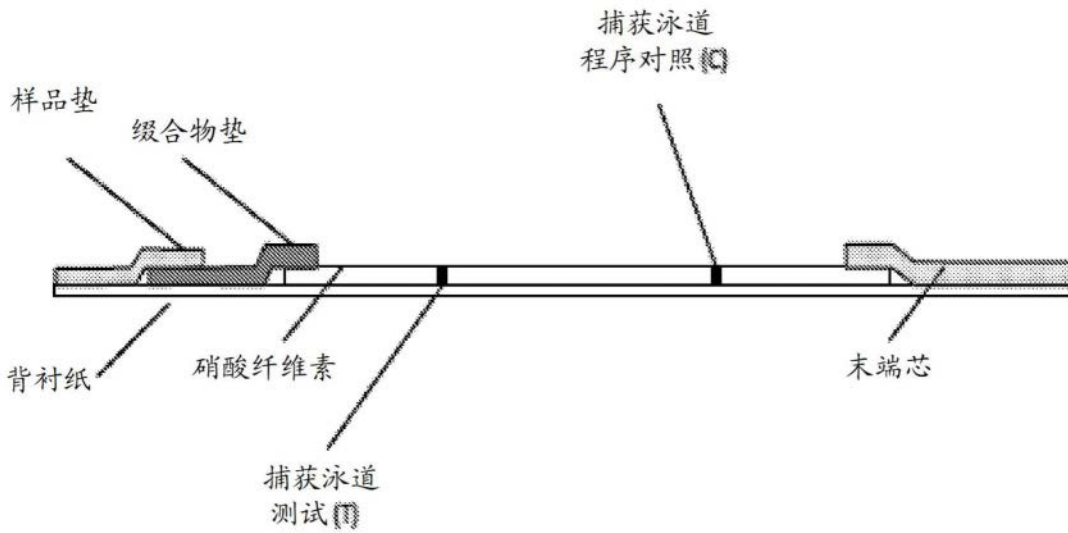


图18

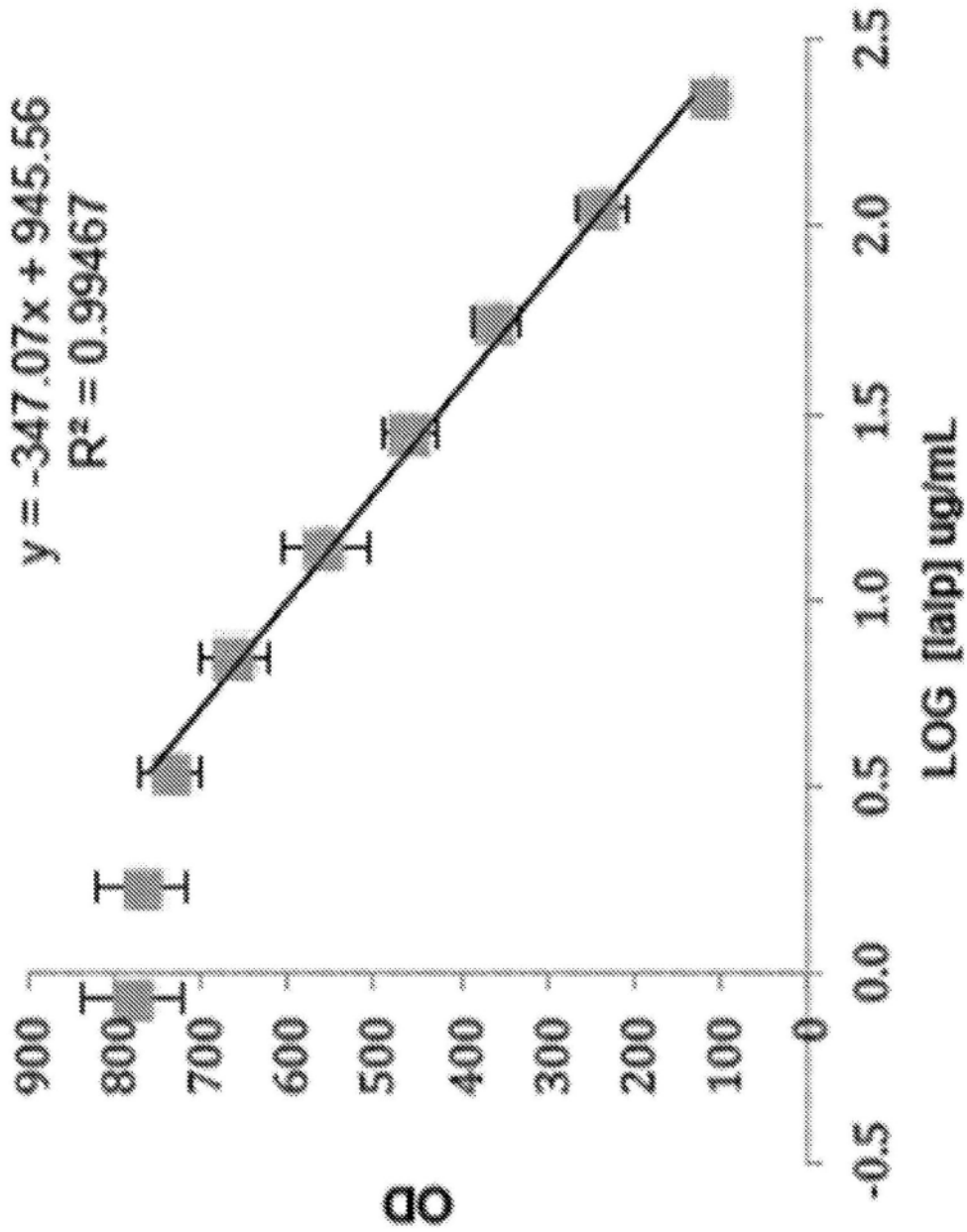


图19

快速测试 ESEQuant 读取器
相对于 ELISA

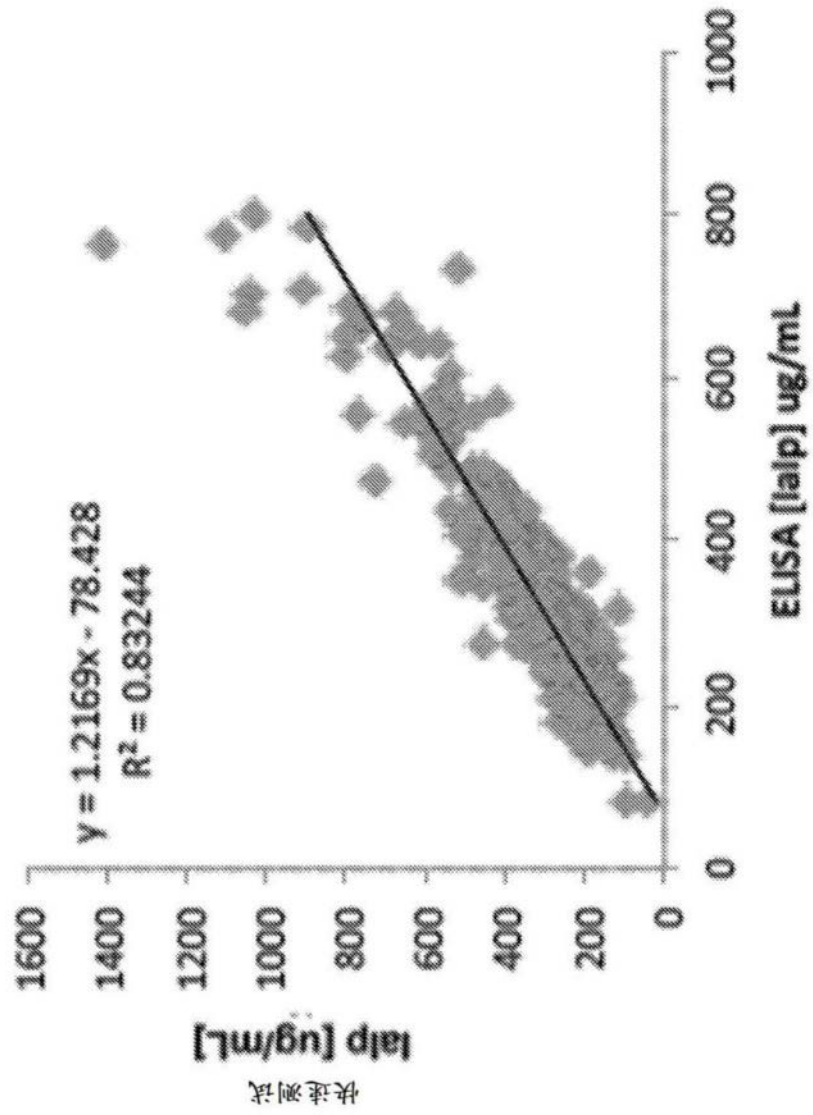


图20A

快速测试 Detekt 读取器
相对于 ELISA

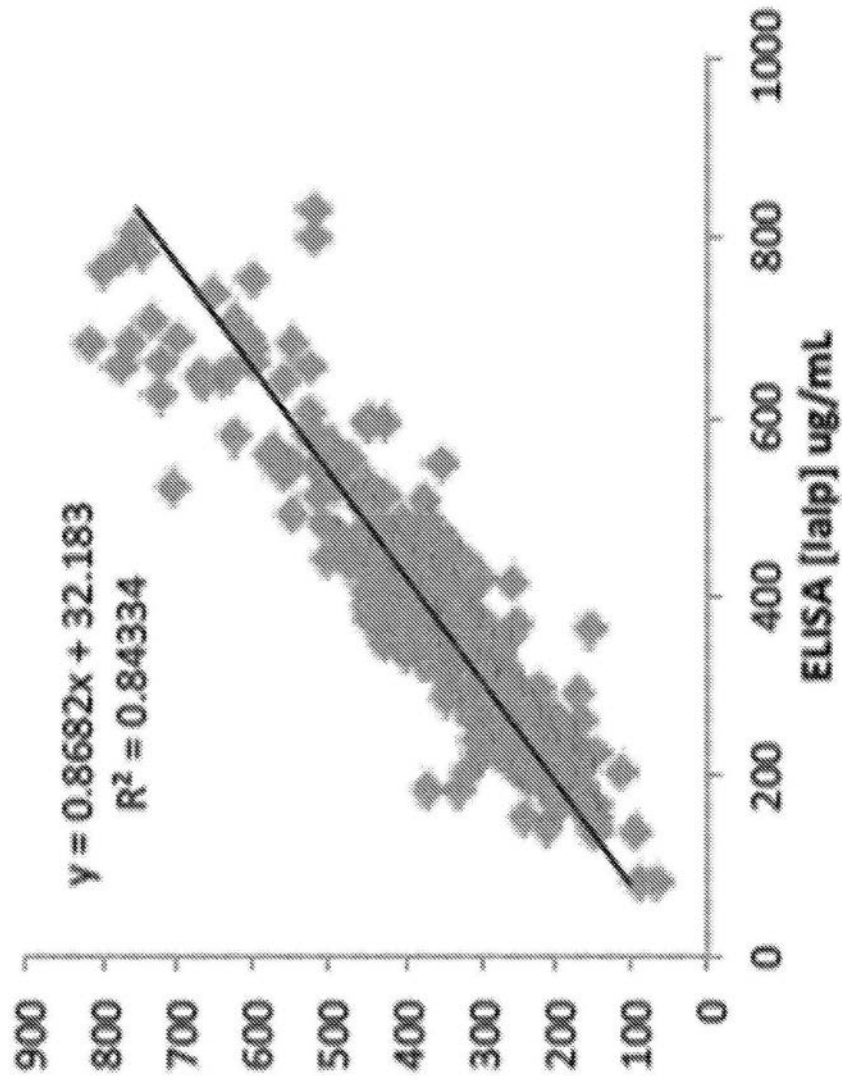


图20B

快速测试 iCalq 读取器
相对于 ELISA

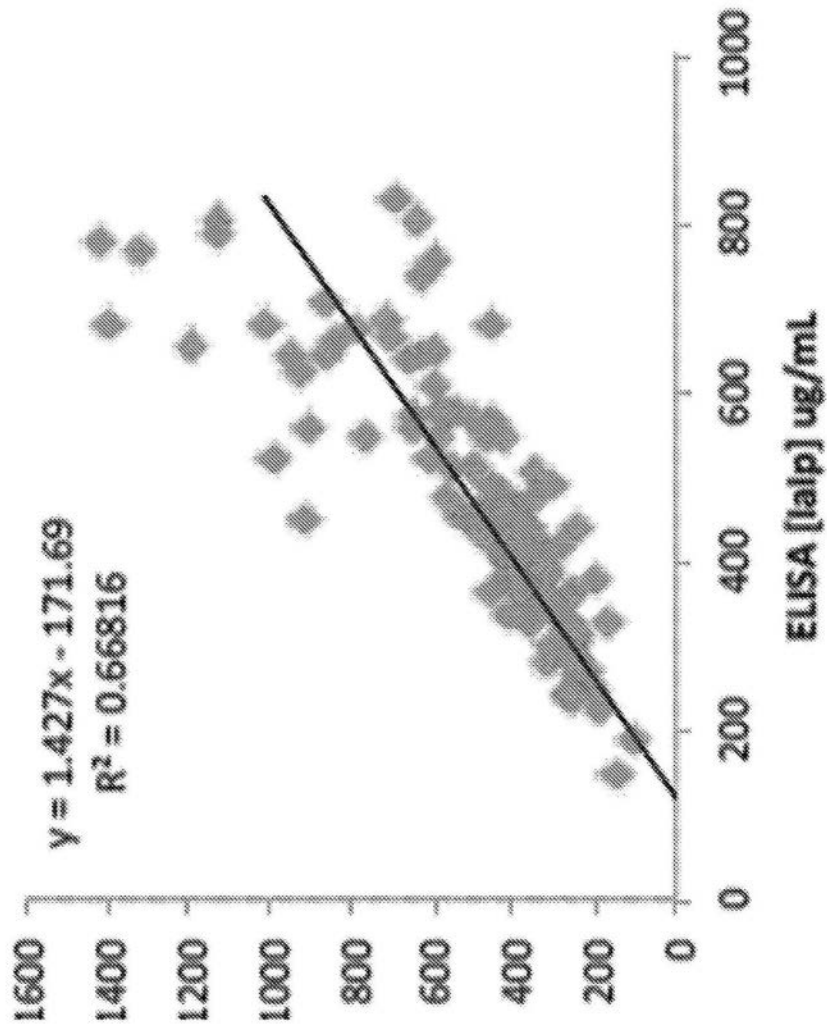


图20C

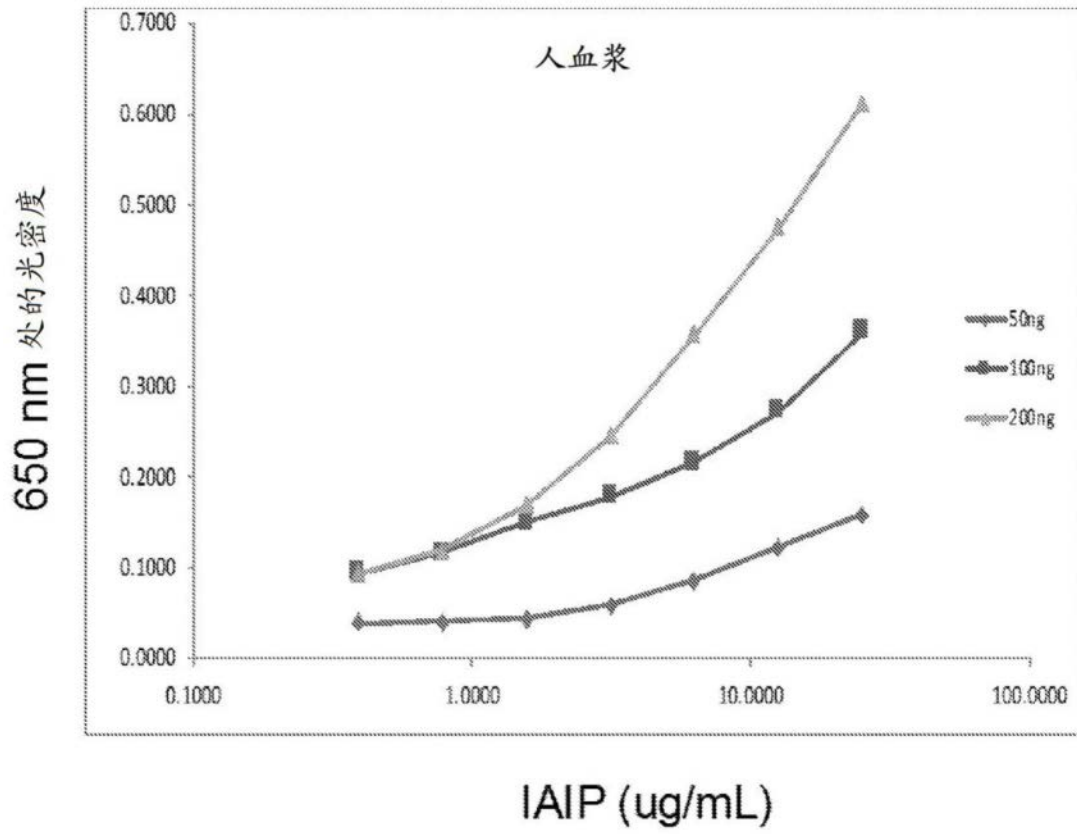


图21A

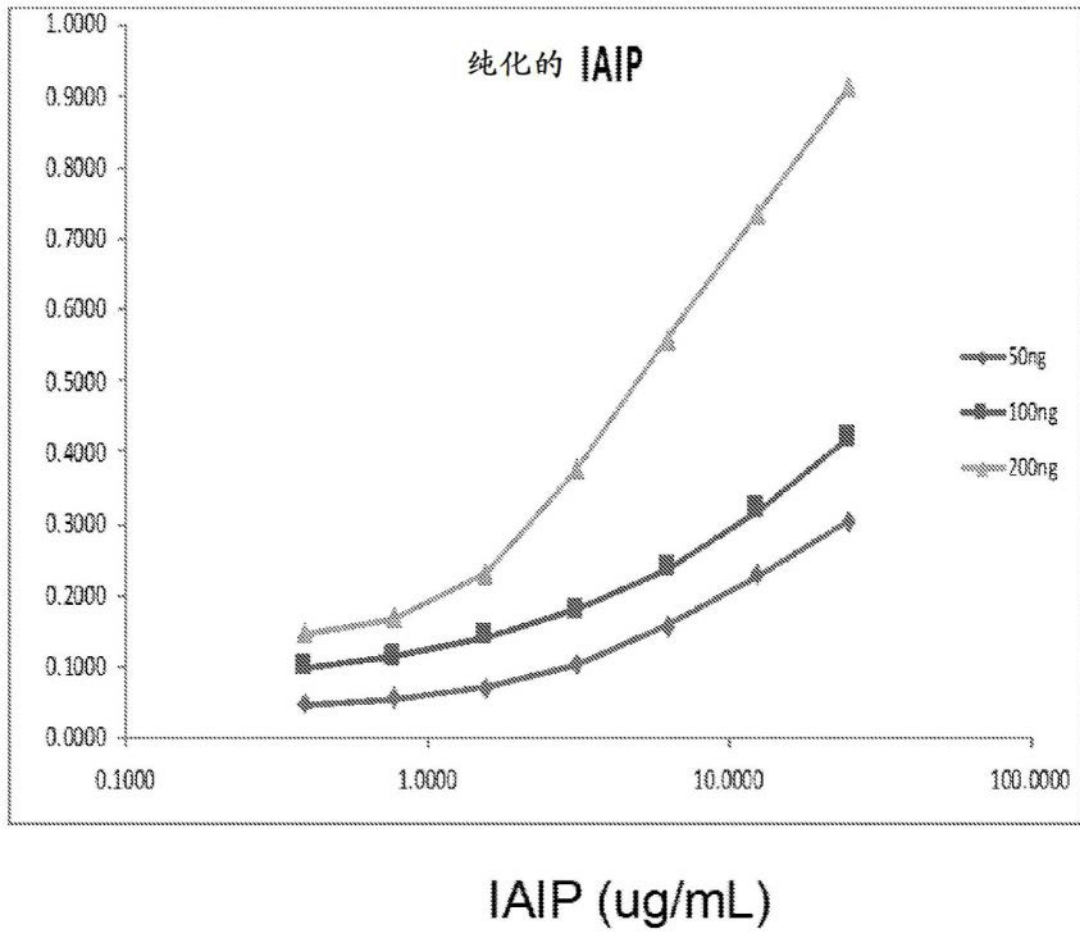


图21B