

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 045401

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.22

(21) Номер заявки
201992540

(22) Дата подачи заявки
2018.04.25

(51) Int. Cl. G01N 33/53 (2006.01)
C12Q 1/37 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕР-АЛЬФА
ИНГИБИТОРНЫХ БЕЛКОВ

(31) 62/490,003; 62/614,333

(32) 2017.04.25; 2018.01.05

(33) US

(43) 2020.08.05

(86) PCT/US2018/029436

(87) WO 2018/200722 2018.11.01

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ПРОТЕРА БАЙОЛОДЖИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Лим Йоу-Пин, Сперо Денис (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) CHAABAN et al. Inter-alpha inhibitor protein and its associated glycosaminoglycans protect against histone-induced injury. Blood, 2 April 2015, Vol 125, No 14, Pages 2286-2296. Especially pg 2286 col 2 para 1, PDF pg 15 para 1 of Supplemental Information: ELISA for IAIP-His complexes.
US-B1-6660482

(57) В данном документе описаны способы количественного определения уровней IAIP в образце (например, полученном у субъекта) с использованием анализов на основе лиганда IAIP. Также раскрыты способы измерения комплексов IAIP-лиганд IAIP и способы оценки, контроля и лечения субъектов с использованием вышеупомянутых способов количественного определения IAIP.

045401 B1

045401 B1

045401

B1

Уровень техники

IAIP (интер-альфа ингибиторные белки) представляют собой семейство природных, иммуномодулирующих белков плазмы, которые циркулируют в высоких концентрациях в крови всех млекопитающих. IAIP в основном продуцируются в печени, поступают в кровь и их субъединица (бикунин) выводится с мочой. IAIP играют важную роль в модуляции воспаления. Они оказывают обширные защитные эффекты в отношении серьезного воспаления, вызванного инфекцией, травмой, а также повреждением, и важно то, что защитные эффекты IAIP не зависят от болезнетворных микробных агентов или триггеров. Члены данного семейства состоят из тяжелых и легких полипептидных субъединиц, которые ковалентно связаны гликозаминогликаном. IAIP могут быть найдены *in vivo* в виде интер-альфа-ингибитора (I α I), молекулы размером 250 кДа, состоящей из двух тяжелых цепей (H1 и H2) и одной легкой цепи (L), и пре-альфа-ингибитора (P α I), молекулы размером 125 кДа, состоящей из одной тяжелой (H3) и одной легкой цепи (L).

Когда организм генерирует воспалительные сигналы, такие как те, которые вызываются во время травмы или инфекции, IAIP попадают в ткани и непосредственно достигают места воспаления. Тяжелые цепи IAIP усиливают противовоспалительный ответ, связываясь с белками, которые являются частью воспалительного каскада. Кроме того, когда тяжелые цепи расщепляются, высвобождается легкая цепь с ассоциированным с ней GAG (называемая бикунином из-за их двух доменов Куниц-типа) и активируется активность этой легкой цепи, ингибирующая сериновую протеазу. Бикунин ингибирует активность сериновых протеаз, таких как трипсин, эластаза, плазмин, катепсин G и фурин. IAIP оказывают свое противовоспалительное действие посредством множества механизмов. Было показано, что они связывают белки, которые усиливают воспаление, такие как белки комплемента и внеклеточные гистоны (сигналы повреждения), таким образом ослабляя воспалительные процессы. Посредством тяжелых цепей IAIP могут связывать белки внеклеточного матрикса (ECM), и было показано, что они способствуют восстановлению эпителия легких после повреждения в моделях как *in vitro*, так и *in vivo*. На нескольких моделях *in vivo* было показано, что IAIP снижает количество воспалительных цитокинов, таких как ФНО- α и ИЛ-6. Было показано, что у бикунин-дефицитных (и, следовательно, IAIP-дефицитных) мышей снижены воспалительные маркеры клеточной адгезии, VCAM-1 и ICAM-1.

У здоровых индивидуумов количество циркулирующих в крови IAIP является относительно высоким (в диапазоне 400-800 мг/л). Однако уровни IAIP быстро уменьшаются во время системного воспаления/сепсиса у новорожденных и у взрослых пациентов (Баек YW, et al. J Pediatr. 2003; 143:11-15; Lim YP, et al. J Infect Dis. 2003; 188:919-926 и Opal SM, et al. Crit Care Med. 2007; 35:387-392), и было показано, что сниженные уровни IAIP сильно коррелируют с прогрессированием заболевания. По мере того как заболевания переходят на более серьезные и опасные для жизни стадии, уровни IAIP стремительно падают, что говорит о том, что IAIP имеет клиническую ценность в качестве прогностического и лечебно-диагностического маркера, помогая клиницистам отслеживать прогрессирование заболевания и принимать обоснованные решения по лечению таких заболеваний, как тяжелые воспалительные заболевания, такие как тяжелая пневмония, сепсис и связанные с ними повреждения органов, НЭК (некротизирующий энтероколит), заживление ран, ожог, рак, инсульт, болезнь Альцгеймера, эпилепсия и другие.

Стандартизированный конкурентный иммуноанализ IAIP был использован для измерения IAIP в образцах крови, полученных у пациентов с системным воспалением после бактериальных и вирусных инфекций. Конкурентный иммуноанализ IAIP обеспечивает измерение IAIP, которое обнаруживает только легкую цепь, поэтому в этом анализе обнаруживается как интактный IAIP, так и расщепленный бикунин. Конкурентный анализ не детектирует другие ключевые части IAIP, которые очень важны для его противовоспалительных свойств и свойств восстановления тканей; а именно тяжелые цепи и гликозаминогликан. Таким образом, конкурентный иммуноанализ IAIP имеет ограничения в оценке активного IAIP в образце пациента. Учитывая важность IAIP в качестве важнейшего компонента защиты врожденной иммунной защиты организма и его потенциального использования в качестве прогностического биомаркера, существует потребность в улучшенных способах количественного определения IAIP. Идеальный анализ позволял бы измерять субъединицы как легкой цепи, так и тяжелой цепи для захвата всей молекулы.

Сущность изобретения

Данное изобретение обеспечивает способы количественного определения IAIP в образце от субъекта путем прямого обнаружения агентами, которые связываются с и детектируют IAIP (например, агенты, которые связываются с интактным IAIP, тяжелой цепью IAIP или гликозаминогликаном (GAG) из IAIP). Способы количественного определения могут использоваться для оценки, диагностики, лечения или контроля субъектов или для оценки степени тяжести заболевания или эффективности лечения у субъекта. Изобретение также обеспечивает наборы, которые можно использовать для количественной оценки IAIP в соответствии со способами, описанными в данном документе.

В первом аспекте представлен способ количественного определения интер-альфа ингибиторного белка (IAIP) в образце от субъекта путем: а) приведения в контакт образца со связывающим агентом для получения комплекса IAIP-связывающий агент, причем связывающий агент связан с подложкой; б) при-

ведения в контакт комплекса IAIP-связывающий агент с детектирующим агентом; и с) определения количества детектирующего агента, связанного с комплексом IAIP-связывающий агент, для количественного определения IAIP в образце.

В некоторых вариантах осуществления IAIP представляет собой интактный IAIP.

В некоторых вариантах осуществления связывающий агент представляет собой лиганд IAIP, который связывается с IAIP. В некоторых вариантах осуществления связывающий агент представляет собой антитело, которое специфически связывается с IAIP.

В некоторых вариантах осуществления детектирующий агент представляет собой или содержит лиганд IAIP. В некоторых вариантах осуществления детектирующий агент дополнительно содержит антитело, которое связывается с агентом, детектирующим лиганд IAIP, (например, лиганд IAIP). В некоторых вариантах осуществления детектирующий агент представляет собой антитело, которое специфически связывается с IAIP. Например, в конкретных вариантах осуществления связывающий агент представляет собой антитело, которое специфически связывается с IAIP (например, мкАт 69.26 или мкАт 69.31), а детектирующий агент представляет собой или содержит лиганд IAIP, который связывается с IAIP (например, гепарин, гиалуроновая кислота, эндотоксин (ЛПС) или гистон). В других вариантах осуществления связывающий агент представляет собой лиганд IAIP, который связывается с IAIP (например, гепарин, гиалуроновая кислота, ЛПС или гистон), и детектирующий агент представляет собой антитело, которое специфически связывается с IAIP (например, мкАт 69.26 или мкАт 69.31).

В некоторых вариантах осуществления IAIP находится в комплексе IAIP-лиганд IAIP.

В некоторых вариантах осуществления связывающий агент представляет собой лиганд IAIP, который связывается с IAIP. В некоторых вариантах осуществления лиганд IAIP комплекса IAIP-лиганд IAIP отличается от связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления связывающий агент представляет собой антитело, которое связывается с лигандом IAIP комплекса IAIP-лиганд IAIP. В некоторых вариантах осуществления связывающий агент представляет собой антитело, которое специфически связывается с IAIP комплекса IAIP-лиганд IAIP.

В некоторых вариантах осуществления детектирующий агент содержит лиганд IAIP, который связывается с IAIP. В некоторых вариантах осуществления детектирующий агент дополнительно содержит антитело, которое связывается с агентом, детектирующим лиганд IAIP. В некоторых вариантах осуществления лиганд IAIP комплекса IAIP-лиганд IAIP отличается от агента, детектирующего лиганд IAIP. В некоторых вариантах осуществления детектирующий агент представляет собой антитело, которое связывается с лигандом IAIP комплекса IAIP-лиганд IAIP. В некоторых вариантах осуществления детектирующий агент представляет собой антитело, которое специфически связывается с IAIP комплекса IAIP-лиганд IAIP.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой мкАт 69.26 или мкАт 69.31.

В некоторых вариантах осуществления лиганд IAIP выбирают из группы, состоящей из эндотоксина (ЛПС), гепарина, гистона, гиалуроновой кислоты, витронектина, фибронектина, ламинина, тенасцина С, аггрекана, фактора фон Виллебранда, пентраксина-3 (PTX3), ФНО-стимулированного гена-6 (TSG-6), фактора IX, компонента комплемента, фактора XIIIa и тканевой трансглутаминазы. В некоторых вариантах осуществления компонент комплемента представляет собой C1q, C2, C3, C4, C5, C6, C8, пропердин или фактор D.

В некоторых вариантах осуществления детектирующий агент содержит метку. В некоторых вариантах осуществления метка представляет собой биотин, фермент, субстрат фермента, радиоактивную метку, люминесцентное соединение, коллоидное золото, частицу или флуоресцентный краситель.

В некоторых вариантах осуществления подложка представляет собой планшет, частицу, наночастицу, смолу, мембрану, биочип, контейнер, тест-полоску или гранулу.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию промывки между стадиями а) и б).

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию промывки между стадиями б) и с).

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию блокирования перед стадией а) или стадией б).

В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт на стадии а) и/или б) осуществляют при pH от около 7,0 до около 3,5. В некоторых вариантах осуществления pH составляет от около 5,0 до около 3,5. В некоторых вариантах осуществления pH составляет 4,0.

В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой жидкость. В некоторых вариантах осуществления жидкость представляет собой кровь, плазму, сыворотку, мочу, спинномозговую жидкость, синовиальную жидкость, амниотическую жидкость, интерстициальную жидкость, фолликулярную жидкость, перитонеальную жидкость, жидкость бронхоальвеолярного лаважа, грудное молоко, мокроту, лимфу, желчь, или гомогенат ткани.

В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой субъекта-человека. В некоторых вариантах осуществления субъект был идентифицирован как имеющий или подверженный риску

развития воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции. В некоторых вариантах осуществления субъект не был идентифицирован как имеющий или подверженный риску развития воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции. В некоторых вариантах осуществления способ выполняют до, после или одновременно с диагностикой субъекта как имеющего или подверженного риску воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции. В некоторых вариантах осуществления способ выполняют по существу одновременно с лечением субъекта от воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции. В некоторых вариантах осуществления способ выполняют до лечения субъекта от воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции. В некоторых вариантах осуществления способ осуществляют после лечения субъекта от воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции.

В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание или патологическое состояние выбирают из группы, состоящей из сепсиса, септического шока, стерильного сепсиса, травмы, повреждения, инсульта, острого воспалительного заболевания, SIRS, острого повреждения легких, ARDS, пневмонии, некротизирующего энтероколита, острого панкреатита, заболевания почек, острого повреждения почек, повреждения печени, острой недостаточности кровообращения, преэклампсии, рака, метастаз при раке, опухолевой инвазии, заболевания периферических артерий, диабета 1-ого типа или 2-ого типа, атеросклероза сердечно-сосудистой системы, перемежающейся хромоты, критической ишемии конечностей, инфаркта миокарда, каротидной окклюзии, окклюзии пуповины, низкой массы тела при рождении, недоношенности, вызванного хирургическим вмешательством воспаления, вызванного абсцессом воспаления, рассеянного склероза, легочной недостаточности, периферической невропатии, гипоксической ишемии, бактериальной инфекции, ран, ожогов, рваных ран, ушибов, переломов костей, хирургических процедур, ишемии тканей, ревматоидного артрита, менингита, воспалительного заболевания кишечника, хронической обструктивной болезни легких, ринита, преждевременных родов или инфекционного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления инфекция вызвана грамотрицательными бактериями, такими как виды *Neisseria*, включая *Neisseria gonorrhoeae* и *Neisseria meningitidis*, виды *Branhamella*, включая *Branhamella catarrhalis*, виды *Escherichia*, включая *Escherichia coli*, виды *Enterobacter*, виды *Proteus*, включая *Proteus mirabilis*, виды *Pseudomonas*, включая *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mallei*, и *Pseudomonas pseudomallei*, виды *Klebsiella*, включая *Klebsiella pneumoniae*, виды *Salmonella*, виды *Shigella*, виды *Serratia*, виды *Acinetobacter*; виды *Haemophilus*, включая *Haemophilus influenzae* и *Haemophilus ducreyi*, виды *Brucella*, виды *Yersinia*, включая *Yersinia pestis* и *Yersinia enterocolitica*, виды *Francisella*, включая *Francisella tularensis*, виды *Pasteurella*, включая *Pasteurella multocida*, *Vibrio cholerae*, виды *Flavobacterium*, *meningosepticum*, виды *Campylobacter*, включая *Campylobacter jejuni*, виды *Bacteroides* (оральный, фарингеальный), включая *Bacteroides fragilis*, виды *Fusobacterium*, включая *Fusobacterium nucleatum*, *Calymmatobacterium granulomatis*, виды *Streptobacillus*, включая *Streptobacillus moniliformis*, и виды *Legionella*, включая *Legionella pneumophila*.

В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой новорожденного, ребенка, подростка или взрослого.

В некоторых вариантах осуществления способ выполняют один или более раз в год. В некоторых вариантах осуществления способ выполняют один или более раз в месяц. В некоторых вариантах осуществления способ выполняют один или более раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления способ выполняют один или более раз в сутки. В некоторых вариантах осуществления способ выполняют один или более раз в час.

В некоторых вариантах осуществления способ выполняют по меньшей мере один раз, по меньшей мере два раза, по меньшей мере три раза, по меньшей мере пять раз, или, по меньшей мере десять раз.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту препарата, содержащего IAIP или терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет концентрацию IAIP, равную 200 мкг/мл или ниже. В некоторых вариантах осуществления образец от субъекта имеет повышенный уровень комплекса IAIP-лиганд IAIP относительно эталонного образца. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или подвержен риску развития воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение IAIP и терапевтического агента субъекту.

В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент выбирают из группы, состоящей из антибиотического агента, противовирусного агента, противогрибкового агента, противопаразитарного агента, противовоспалительного агента, противоракового агента, антикоагулянта, иммуномодулирующего агента, бронхолитического агента, ингибитора комплемента, вазопрессора, седативного средства или искусственной вентиляции легких.

В некоторых вариантах осуществления субъект был болен в течение по меньшей мере одних суток. В некоторых вариантах осуществления субъект был болен в течение по меньшей мере одной недели. В некоторых вариантах осуществления субъект был болен в течение по меньшей мере одного месяца. В некоторых вариантах осуществления субъект был болен в течение

ние по меньшей мере одного года.

В некоторых вариантах осуществления способ предназначен для: а) оценки состояния здоровья субъекта; б) контроля состояния здоровья субъекта; с) диагностики субъекта как имеющего или подверженного риску воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции; d) оценки эффективности лечения, назначаемого субъекту; или е) оценки тяжести заболевания у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает сравнение количества IAIP и/или комплекса IAIP-лиганд IAIP, обнаруженного в образце, с количеством IAIP и/или комплекса IAIP-лиганд IAIP, найденного в образце от нормального субъекта, или с пороговым значением. В некоторых вариантах осуществления количество IAIP в образце, которое ниже, чем количество IAIP в образце от нормального субъекта или относительно порогового значения, указывает на то, что субъект имеет или подвержен риску развития воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции. В некоторых вариантах осуществления количество комплекса IAIP-лиганд IAIP в образце, которое выше, чем количество комплекса IAIP-лиганд IAIP в образце от нормального субъекта или относительно порогового значения, указывает на то, что субъект имеет или подвержен риску развития воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции. В некоторых вариантах осуществления количество IAIP в образце, полученном от нормального субъекта, или пороговое значение, составляет >250 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления количество IAIP в образце от нормального субъекта составляет от около 260 до около 540 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления определение того, что субъект имеет концентрацию IAIP, равную 250 мкг/мл или менее, указывает на то, что субъект имеет или подвержен высокому риску развития воспалительного заболевания или патологического состояния, или инфекции, или диагностируют повышенный риск заболеваемости и/или смертности.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет концентрацию IAIP от 200 до 300 мкг/мл. В других вариантах осуществления способ выполняют по меньшей мере один раз в год, по меньшей мере два раза в год, по меньшей мере один раз в месяц, по меньшей мере один раз в неделю, по меньшей мере один раз в сутки, или по меньшей мере один раз в час.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта ранее было воспалительное заболевание, или патологическое состояние, или инфекция.

В некоторых вариантах осуществления способ выполняют до лечения и/или один или более раз в течение курса лечения. В некоторых вариантах осуществления способ выполняют после начала лечения и/или после завершения лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение считается эффективным, если концентрация IAIP увеличивается у субъекта относительно результата предварительного измерения IAIP у субъекта и/или если концентрация комплекса IAIP-лиганд IAIP у субъекта уменьшается относительно результата предварительного измерения комплекса IAIP-лиганд IAIP у субъекта. В некоторых вариантах осуществления лечение считается неэффективным, если концентрация IAIP уменьшается или остается постоянной у субъекта относительно результата предварительного измерения IAIP у субъекта и/или если концентрация комплекса IAIP-лиганд IAIP увеличивается или остается постоянной у субъекта относительно результата предварительного измерения комплекса IAIP-лиганд IAIP у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает модификацию или изменение лечения.

Во втором аспекте представлен способ лечения субъекта (например, человека, такого как новорожденный, ребенок, подросток или взрослый), у которого есть или существует риск развития воспалительного заболевания или инфекции, в котором было определено, что субъект нуждается в лечении в соответствии со способом первого аспекта путем введения субъекту терапевтически эффективного количества IAIP и/или терапевтического агента, выбранного из группы, состоящей из антибиотического агента, противовирусного агента, противогрибкового агента, противопаразитарного агента, противовоспалительного агента, противоракового агента, антикоагулянта, иммуномодулирующего агента, бронхолитического агента, ингибитора комплемента, вазопрессора, седативного средства или искусственной вентиляции легких.

В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание или патологическое состояние выбирают из группы, состоящей из сепсиса, септического шока, стерильного сепсиса, травмы, повреждения, инсульта, острого воспалительного заболевания, SIRS, острого повреждения легких, ARDS, пневмонии, некротизирующего энтероколита, острого панкреатита, заболевания почек, острого повреждения почек, повреждения печени, острой недостаточности кровообращения, вызванного хирургическим вмешательством воспаления, вызванного абсцессом воспаления, рассеянного склероза, преэклампсии, рака, метастаз при раке, опухолевой инвазии, заболевания периферических артерий, диабета 1-ого типа или 2-ого типа, атеросклероза сердечно-сосудистой системы, перемежающейся хромоты, критической ишемии конечностей, инфаркта миокарда, каротидной окклюзии, окклюзии пуповины, низкой массы тела при рождении, недоношенности, легочной недостаточности, периферической невропатии, гипоксической ишемии, бактериальной инфекции, ран, ожогов, рваных ран, ушибов, переломов костей, хирургических процедур, ишемии тканей, ревматоидного артрита, менингита, воспалительного заболевания кишечника, хронической обструктивной болезни легких, ринита, преждевременных родов или инфекционного забо-

левания.

В некоторых вариантах осуществления инфекция вызвана грамотрицательными бактериями, такими как виды *Neisseria*, включая *Neisseria gonorrhoeae* и *Neisseria meningitidis*, виды *Branhamella*, включая *Branhamella catarrhalis*, виды *Escherichia*, включая *Escherichia coli*, виды *Enterobacter*, виды *Proteus*, включая *Proteus mirabilis*, виды *Pseudomonas*, включая *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mallei*, и *Pseudomonas pseudomallei*, виды *Klebsiella*, включая *Klebsiella pneumoniae*, виды *Salmonella*, виды *Shigella*, виды *Serratia*, виды *Acinetobacter*; виды *Haemophilus*, включая *Haemophilus influenzae* и *Haemophilus ducreyi*, виды *Brucella*, виды *Yersinia*, включая *Yersinia pestis* и *Yersinia enterocolitica*, виды *Francisella*, включая *Francisella tularensis*, виды *Pasteurella*, включая *Pasteurella multocida*, *Vibrio cholerae*, виды *Flavobacterium*, *meningosepticum*, виды *Campylobacter*, включая *Campylobacter jejuni*, виды *Bacteroides* (опальный, фарингеальный), включая *Bacteroides fragilis*, виды *Fusobacterium*, включая *Fusobacterium nucleatum*, *Calymmatobacterium granulomatis*, виды *Streptobacillus*, включая *Streptobacillus moniliformis*, и виды *Legionella*, включая *Legionella pneumophila*.

В третьем аспекте представлен набор для количественного определения IAIP или комплекса IAIP-лиганд IAIP в образце, причем набор содержит агент, связывающий IAIP, и агент, детектирующий IAIP, и, необязательно, одно или более из следующего: промывочный буфер, блокирующий агент, субстрат для обнаружения метки и инструкции для количественного определения уровня IAIP или комплекса IAIP-лиганд IAIP в образце. Один или более компонентов набора могут быть обеспечены в контейнере, таком как пробирка или флакон, и/или в форме, готовой к применению (например, для нанесения на подложку набора (например, на планшет или тест-полоску)).

В некоторых вариантах осуществления связывающий агент иммобилизован на подложке.

В некоторых вариантах осуществления детектирующий агент мечен.

В некоторых вариантах осуществления агент, связывающий IAIP, представляет собой IAIP-специфическое антитело или лиганд IAIP.

В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит агент, связывающий лиганд IAIP. В некоторых вариантах осуществления агент, связывающий лиганд IAIP, представляет собой антитело, которое связывается с лигандом IAIP.

В некоторых вариантах осуществления агент, детектирующий IAIP, представляет собой IAIP-специфическое антитело или лиганд IAIP.

В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит агент, детектирующий лиганд IAIP. В некоторых вариантах осуществления агент, детектирующий лиганд IAIP, представляет собой антитело, которое специфически связывается с лигандом IAIP.

В некоторых вариантах осуществления IAIP-специфическое антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой мкАт 69.26 или мкАт 69.31.

В некоторых вариантах осуществления подложка представляет собой планшет, смолу, контейнер, мембрану, биочип, частицу, наночастицу, тест-полоску или гранулу.

В некоторых вариантах осуществления метка представляет собой фермент, субстрат фермента, биотин, частицу, флуоресцентный краситель, люминесцентное соединение или радиоактивную метку.

В некоторых вариантах осуществления лиганд IAIP выбирают из группы, состоящей из эндотоксина (ЛПС), гепарина, гистона, гиалуроновой кислоты, ламинина, тенасина С, агрегана, витронектина, фибронектина, фактора фон Виллебранда, пентраксина-3 (PTX3), ФНО-стимулированного гена-6 (TSG-6), фактора IX, компонента комплемента, фактора XIIIa и тканевой транслугаминазы.

Определения.

Используемый в данном документе термин "около" относится к значению, которое не более чем на 10% больше или меньше описываемого значения. Например, термин "около 5 нМ" обозначает диапазон от 4,5 нМ до 5,5 нМ.

Используемый в данном документе термин "введение" относится к предоставлению или обеспечению субъекту терапевтического агента (например, IAIP) любым эффективным путем. Иллюстративные пути введения описаны в данном документе ниже.

Используемый в данном документе термин "антитело" (Ат) относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически связывается или является иммунологически способна реагировать с конкретным антигеном, и содержит по меньшей мере переменный домен тяжелой цепи, и обычно содержит по меньшей мере переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина. Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные включают, но не ограничиваются ими, поликлональные, моноклональные, мультиспецифичные, человеческие, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела, гетероконъюгатные антитела (например, би-, три- и тетраспецифические антитела, диатела, триатела и тетраатела), однодоменные антитела (одАт), эпитопсвязывающие фрагменты, например, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fv, одноцепочечные Fv (scFv), rIgG, одноцепочечные антитела, дисульфид-связанные Fv (sdFv), фрагменты, содержащие или домен V_L или V_H, фрагменты, продуцируемые библиотекой экспрессии Fab, и антиидиотипические (анти-Id) антитела. Молекулы антитела согласно изобретению могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, и IgY), класса (например, IgG1,

IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина. Кроме того, если не указано иное, термин "моноклональное антитело" (мкАт) включает как интактные молекулы, так и фрагменты антител (такие как, например, фрагменты Fab и F(ab')₂), которые способны специфически связываться с целевым белком. Фрагменты Fab и F(ab')₂ лишены фрагмента Fc интактного антитела, быстрее выводятся из системы кровообращения животного и могут иметь меньшее неспецифическое связывание с тканью, чем интактное антитело.

Используемый в данном документе термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с целевым антигеном. Антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Фрагменты антител могут представлять собой Fab, F(ab')₂, scFv, SMIP, диатело, триатело, аффитело, наноантитело, аптамер или доменное антитело. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающий фрагмент" антитела, включают, но не ограничиваются ими: (i) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L, V_H, C_L, и C_H1; (ii) фрагмент F(ab')₂, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов V_H и C_H1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, (v) дАт, включая домены V_L и V_H; (vi) фрагмент дА b (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), который состоит из доменов V_H; (vii) дАт, который состоит из домена V_H или V_L; (viii) выделенную определяющую комплементарность область (CDR); и (ix) комбинацию двух или более выделенных CDR, которые необязательно могут быть соединены с помощью синтетического линкера. Кроме того, хотя два домена фрагмента Fv, V_L и V_H, кодируются отдельными генами, они могут быть соединены с помощью рекомбинантных способов синтетическим линкером, который обеспечивает возможность создания ими одной белковой цепи, в которой пара областей V_L и V_H образуют моновалентные молекулы (известные как одноцепочечные Fv (scFv); см., например, Bird et al., Science 242:423-426, 1988, и Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988). Эти фрагменты антител могут быть получены с использованием общепринятых методик, известных специалистам в данной области техники, и фрагменты могут быть подвергнуты скринингу на функциональность таким же образом, что и для интактных антител.

Антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с помощью методов рекомбинантных ДНК, ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов, или, в некоторых вариантах осуществления, с помощью химических способов синтеза пептидов, известных в данной области техники.

Используемый в данном документе термин "интер-альфа ингибиторные белки" или "IAIP" относится к большим многокомпонентным гликопротеинам в семействе структурно связанных иммуномодулирующих белков. Было показано, что IAIP играют важную роль в ингибировании ряда протеаз, включая нейтрофильную эластазу, плазмин, трипсин, химотрипсин, гранзим К, пропротеинконвертазу, фурин, катепсин G и акрозин. IAIP обладает широким спектром противовоспалительных механизмов, в дополнение к ингибирующей активности сериновой протеазы, такие как связывание и инактивация комплемента, внеклеточных гистонов и факторов свертывания, уменьшение количества провоспалительных цитокинов, таких как ФНО-альфа и ИЛ-6, уменьшение количества факторов адгезии, таких как VCAM и ICAM, и уменьшение количества NFκB. IAIP также играют важную роль в содействии защите и восстановлению тканей, где тяжелые цепи переносятся в матриксные белки, чтобы способствовать клеточной миграции и пролиферации. В человеческой плазме IAIP обнаружены при относительно высоких концентрациях (400-800 мг/л). В отличие от других молекул-ингибиторов, это семейство ингибиторов обычно включает комбинацию полипептидных цепей (легких и тяжелых цепей), ковалентно связанных хондроитинсульфатной цепью. Тяжелые цепи IAIP (H1, H2 и H3) также называют белками, связывающими гиалуроновую кислоту (ГК). Основными формами IAIP, обнаруженными в плазме человека, являются интер-альфа-ингибитор (IαI), который содержит две тяжелые цепи (H1 и H2) и одну легкую цепь (L), и пре-альфа-ингибитор (PαI), который содержит одну тяжелую (H3) и одну легкую цепь (L). Другим IAIP является легкая цепь (также называемая бикунинином (ингибитор би-куница) с двумя доменами Куниц), связанная с гликозаминогликаном, которая, как известно, широко ингибирует плазменные и тканевые сериновые протеазы. Другой IAIP представляет собой молекулу, связанную с тяжелой цепью H4, которая циркулирует в крови без связи с бикунинином. Еще один IAIP представляет собой молекулу, связанную с тяжелой цепью H5. IαI и PαI, присутствующие в фракции плазмы, имеют кажущуюся молекулярную массу от около 60 кДа до около 280 кДа.

Используемый в данном документе термин "лиганд IAIP" относится к молекуле или ее фрагменту, которая связывается с IAIP *in vivo* или *in vitro*, (например, эндотоксин (ЛПС), гепарин, гистон, гиалуроновая кислота, белки внеклеточного матрикса (например, витронектин, фибронектин, тенасцин С, ламинин, аггреккан), фактор фон Виллебранда, пентраксин-3 (PTX3), ФНО-стимулированный ген-6 (TSG-6), факторы свертывания крови (например, фактор IX и фактор XIIIa), компонент комплемента, двухвалентные катионы, такие как Ca²⁺ и тканевая трансглутаминаза). Лиганды IAIP также включают молекулы, которые, по прогнозам, связываются с IAIP на основе доменной структуры (например, белки с доменами

RGD, которые связываются с доменом фактора А фон Виллебранда тяжелых цепей IAIP). Лиганды IAIP для использования в описанных в данном документе способах включают лиганды, которые связываются с тяжелой цепью IAIP, с комплексом IAIP или с GAG IAIP (например, лиганды, которые не связываются исключительно с бикунином).

Используемый в данном термин "IAIP-специфическое антитело" или "антитело, которое специфически связывается с IAIP" относится к любой молекуле, содержащей белок или пептид, которая содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, такую как по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR) тяжелой или легкой цепи или ее части, связывающей лиганд, вариабельную область тяжелой цепи или легкой цепи, константную область тяжелой цепи или легкой цепи, каркасную область или любую ее часть, которая способна связывать IAIP и которая специально не связывается с любым другим белком. Антитело, которое специфически связывается с IAIP, будет связываться с IAIP и обеспечивать сигнал, который по меньшей мере вдвое превышает фоновый сигнал или шум и, как правило, более чем в 10-100 раз превышает фоновый сигнал.

Используемый в данном документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, а не к способу, с помощью которого его получают.

Используемый в данном документе термин "фармацевтическая композиция" или "фармацевтический препарат" представляет собой композицию или препарат, обладающий фармакологической активностью или другим прямым эффектом в отношении смягчения, лечения или предотвращения заболевания, и/или готовую лекарственную форму или препарат. Композиция, например, указана для использования человеком (например, согласно нормативным требованиям к лекарственным или биологическим препаратам, таким как те, которые опубликованы FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) и/или EMA (Европейская служба по надзору в сфере лекарственных средств)).

Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый" относится к тем соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые пригодны для контакта с тканями субъекта, такого как млекопитающее (например, человек), без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и других осложнений, соизмеримых с разумным соотношением пользы/риска.

Используемое в данном документе выражение "снижение вероятности развития" относится к профилактическому лечению пациента (например, человека), который подвержен или иным образом подвержен риску конкретного заболевания, синдрома или патологического состояния (например, описанных в данном документе патологических состояний, таких как воспалительное заболевание или инфекция), или подвержен риску увеличения степени или тяжести текущего заболевания, синдрома или патологического состояния, например, пациента с внебольничной пневмонией (CAP), который подвержен риску прогрессирования до тяжелой внебольничной пневмонии (sCAP).

Используемый в данном документе термин "эталон" относится к параметру (например, уровню белка, концентрации, уровню экспрессии нуклеиновых кислот и числу копий гена) образца или стандарта, который используется для сравнения с параметром в исследуемом образце. Например, эталонный образец может быть получен от здорового человека (например, человека, у которого нет воспалительного заболевания или инфекции). Эталонный уровень может представлять собой уровень (или его среднее значение) экспрессии или концентрации аналита (например, белка (например, IAIP), нуклеиновой кислоты, углевода и т. д.), определенной из одного или более эталонных образцов. Например, эталон может представлять собой средний уровень аналита (например, IAIP) (например, средний уровень или медианный уровень) среди множества индивидуумов (например, здоровых индивидуумов или индивидуумов, у которых нет воспалительного заболевания или инфекции). В других случаях эталонный уровень может представлять собой заранее определенный пороговый уровень, например, на основе уровня или концентрации аналита, как определено иным образом, например, с помощью эмпирических анализов.

Используемый в данном документе термин "образец" относится к образцу (например, крови, компоненту крови (например, сыворотке или плазме), моче, слюне, амниотической жидкости, бронхолегочному лаважу, спинномозговой жидкости, ткани (например, биопсии ткани или гомогенату ткани), панкреатического сока, синовиальной жидкости и клеткам), выделенному от субъекта (например, млекопитающего, такого как человек).

Используемое в данном документе выражение "специфически связывает" относится к реакции связывания, которая определяет присутствие аналита (например, белка, такого как IAIP) в гетерогенной популяции белков и других биологических молекул. Аналит может представлять собой антиген, который распознается, например, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Специфическое связывание между измеряемым аналитом и связывающим агентом (например, антителом, или антигенсвязывающим фрагментом, или лигандом) имеет K_D , равную менее 100 нМ. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с антигеном (например, IAIP), связывается с антигеном с K_D до 100 нМ (например, между 1 нМ и 100 нМ). Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который не проявляет специфического связывания с конкретным антигеном или его

эпитопом (например, IAIP), демонстрирует K_D , равную более 100 нМ (например, более 500 нМ, 1 мкМ, 100 мкМ, 500 мкМ или 1 мМ) для этого конкретного антигена или его эпитопа. Различные форматы иммуноанализа могут быть использованы для выбора антител, специфически иммунореактивных с определенным белком или углеводом. Например, твердофазные иммуноферментные анализы обычно используются для отбора антител, специфически иммунореактивных с белком или углеводом. См. Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York (1988) и Harlow & Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York (1999), для описания форматов иммуноанализа и условий, которые могут быть использованы для определения специфической иммунореактивности.

Используемый в данном документе термин "сепсис" относится к системному ответу на инфекцию (называемую в данном документе "инфекционный сепсис") или к неинфекционному процессу, связанному с острым повреждением ткани и активацией врожденного иммунитета (называемого в данном документе взаимозаменяемо как "стерильное воспаление" или "стерильный сепсис"), которые могут привести к повреждению тканей, недостаточности органов и смерти. Инфекционный сепсис может возникнуть в результате инфекции, вызванной бактериями, вирусами, грибами или другими микроорганизмами, такими как паразиты (например, простейшие паразиты). Стерильный сепсис может возникнуть после геморрагического шока, политравмы, панкреатита, отторжения трансплантата, аутоиммунного заболевания, неорганических соединений, кристаллов, химических веществ или ишемии/реперфузии, и не связан с наличием известной инфекции.

Используемый в данном документе термин "субъект" относится к млекопитающему, включая, но не ограничиваясь этим, человека или млекопитающего, отличного от человека, такого как примат, бык, лошадь, свинья, овца, кошка или собака. Субъект может представлять собой пациента.

Используемый в данном документе термин "лечение" относится к уменьшению или улучшению расстройства и/или симптомов, связанных с ним. Следует иметь в виду, что, хотя это и не исключено, лечение расстройства или патологического состояния не требует, чтобы расстройство или симптомы, связанные с ним, были полностью устранены.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлена схема, изображающая структуры циркулирующих (например, в крови) IAIP (IaI и PaI) и свободных легких цепей (LC, бикунина), например, выделяемых с мочой. Тяжелые и легкие цепи IAIP связаны только гликозаминогликаном (GAG).

На фиг. 2А представлена схема, изображающая конкурентный ИФА IAIP. В этом анализе очищенный IAIP иммобилизуется на подложке, такой как многолуночный планшет, и затем к очищенному IAIP добавляют биологический образец и меченое антитело, направленное на IAIP (например, мкАт 69.26).

На фиг. 2В представлен график, демонстрирующий стандартную кривую данных, полученных с помощью конкурентного ИФА IAIP. Данный анализ обеспечивает не прямое измерение IAIP, основанное на конкурентном связывании антител между IAIP в образце и иммобилизованным, очищенным IAIP. Более низкий сигнал указывает на более высокое количество IAIP в образце.

На фиг. 3А представлена схема, изображающая "сэндвич"-ИФА с использованием меченых лигандов IAIP (например, биотинилированный гепарин или ЛПС) и иллюстративные стандартные кривые, полученные с использованием указанного ИФА. В данном варианте анализа антитело, специфическое для IAIP (например, мкАт 69.26), иммобилизуется на подложке, такой как многолуночный планшет, и затем биологический образец добавляется к подложке, содержащей иммобилизованное антитело. Если в образце присутствует IAIP, он будет связываться с антителом, а затем обнаруживаться путем добавления меченого лиганда IAIP.

На фиг. 3В и 3С представлены графики, демонстрирующие стандартные кривые для сэндвич-ИФА для гепарин-IAIP и эндотоксин (ЛПС)-IAIP, соответственно. Данный анализ обеспечивает прямое измерение концентрации IAIP, с увеличением сигнала, указывающим на более высокие количества IAIP в образце.

На фиг. 4 представлен график, демонстрирующий измерения концентрации IAIP, полученные с использованием конкурентного ИФА, как показано на фиг. 2А. IAIP измеряли в образцах плазмы от пациентов с тяжелой внебольничной пневмонией (sCAP -severe community acquired pneumonia) в следующие друг за другом дни во время госпитализации и сравнивали с уровнями IAIP у здоровых контрольных субъектов. Конкурентный ИФА выявил среднюю концентрацию IAIP, равную 250 мкг/мл у пациентов со sCAP и 330 мкг/мл у здоровых контролей, и обнаружил значительные различия между уровнями IAIP у субъектов со sCAP и здоровыми контролями на 0-е, 1-е и 3-й сутки.

На фиг. 5 представлен график, демонстрирующий измерения концентрации IAIP, полученные с использованием "сэндвич"-ИФА лиганда-IAIP, как показано на фиг. 3А. Результаты, приведенные на фиг. 5, были получены с использованием гепарина в качестве лиганда IAIP. Те же самые образцы, оцененные с использованием конкурентного ИФА на фиг. 4, также были измерены с использованием этого анализа. ИФА гепарина-IAIP выявил среднюю концентрацию IAIP между 125 и 150 мкг/мл у пациентов со sCAP и 422 мкг/мл у здоровых контролей и обнаружил различия между уровнями IAIP у субъектов со sCAP и здоровыми контролями, которые были более статистически значимыми, чем различия, наблюдаемые при

использовании конкурентного ИФА во все моменты времени.

На фиг. 6 представлен график, демонстрирующий измерения концентрации IAIP, полученные с использованием "сэндвич"-ИФА лиганда-IAIP, как показано на фиг. 3А. Результаты, приведенные на фиг. 6, были получены с использованием ЛПС в качестве лиганда IAIP. Те же самые образцы, оцененные с использованием конкурентного ИФА на фиг. 4 и ИФА гепарина-IAIP на фиг. 5, также были измерены с использованием этого анализа. ИФА ЛПС-IAIP выявил среднюю концентрацию IAIP между 118 и 145 мкг/мл у пациентов со sCAP и 338 мкг/мл у здоровых контролей и обнаружил различия между уровнями IAIP у субъектов со sCAP и здоровыми контролями, которые были более статистически значимыми, чем различия, наблюдаемые при использовании конкурентного ИФА во все моменты времени. ИФА ЛПС-IAIP выполняли сравнимо с ИФА гепарина-IAIP с точки зрения повышенной чувствительности и более поддающейся измерению разницы между уровнями IAIP у субъектов со sCAP и здоровых контролей.

На фиг. 7 представлена серия блотов, демонстрирующих связывание гепарина и IAIP-специфического антитела (мкАт 69.26) к IAIP. Как показано на среднем блоте, биотинилированный гепарин связывался с очищенным IAIP (250 кДа IaI и 125 кДа PαI), но не связывался с легкой цепью IAIP, бикунинном, или с отрицательным контролем сывороточного альбумина человека. Напротив мкАт 69.26 связывался как с очищенным IAIP, так и с бикунинном. Эти данные предполагают, что гепарин связывается с тяжелой цепью IAIP, что может привести к более точному измерению циркулирующего интактно-го IAIP в ИФА гепарина-IAIP.

На фиг. 8А-8С представлена серия графиков, демонстрирующих измерения концентрации IAIP, полученные с использованием конкурентного ИФА, как показано на фиг. 2А и "сэндвич"-ИФА лиганда IAIP, как показано на фиг. 3А. IAIP измеряли в образцах плазмы крови пациентов с тяжелой пневмонией, тяжелым сепсисом и у здоровых контрольных субъектов. Ниже каждого графика показано среднее значение $\pm$ СОС концентрации IAIP и количество протестированных образцов от пациентов (в скобках). Как показано на фиг. 8А, конкурентный ИФА выявил среднюю концентрацию IAIP, равную 246 мкг/мл у пациентов с тяжелой пневмонией, 250 мкг/мл у пациентов с тяжелым сепсисом и 330 мкг/мл у здоровых контролей, и обнаружил значительные различия между уровнями IAIP у субъектов с тяжелой пневмонией и здоровых контролей, но не между субъектами с тяжелым сепсисом и здоровыми субъектами. Как показано на фиг. 8В, ИФА ЛПС-IAIP выявил среднюю концентрацию IAIP, равную 141 мкг/мл у пациентов с тяжелой пневмонией, 150 мкг/мл у пациентов с тяжелым сепсисом и 338 мкг/мл у здоровых контролей, и обнаружил значительные различия между уровнями IAIP у субъектов с тяжелой пневмонией или тяжелым сепсисом и здоровыми контролями. Как показано на фиг. 8С, конкурентный ИФА гепарина-IAIP выявил среднюю концентрацию IAIP, равную 145 мкг/мл у пациентов с тяжелой пневмонией, 193 мкг/мл у пациентов с тяжелым сепсисом и 422 мкг/мл у здоровых контролей, и обнаружил значительные различия между уровнями IAIP у субъектов с тяжелой пневмонией и здоровых контролей, но не между субъектами с тяжелым сепсисом и здоровыми субъектами. ИФА ЛПС-IAIP выполняли сравнимо с ИФА гепарина-IAIP с точки зрения повышенной чувствительности и обеспечения более статистически значимых результатов по сравнению с конкурентным ИФА.

На фиг. 9 представлена гистограмма, демонстрирующая связывание биотинилированных ЛПС с иммобилизованным полученным из плазмы IAIP, бычьим сывороточным альбумином (БСА), и IgG IAIP-специфического антитела мкАт 69.26. ЛПС продемонстрировал существенное связывание с IAIP и практически полное отсутствие связывания с мкАт 69.26, что служило отрицательным контролем. Примечательно, что ЛПС не проявлял связывания с легкой цепью IAIP, бикунинном, что указывает на то, что тяжелая цепь IAIP может способствовать связыванию с ЛПС.

На фиг. 10 представлена гистограмма, демонстрирующая связывание биотинилированного IAIP с ЛПС, БСА, IgG IAIP-специфического антитела мкАт 69.26 и обезжиренного сухого молока. Как и ожидалось, IAIP связывался с мкАт 69.26 и ЛПС и продемонстрировал минимальное связывание с БСА и обезжиренным сухим молоком. Эти данные подтверждают результаты фиг. 9.

На фиг. 11 представлена гистограмма, демонстрирующая влияние pH на связывание биотинилированного IAIP с ЛПС, БСА и IgG IAIP-специфического антитела мкАт 69.26. Эти данные демонстрируют, что IAIP наиболее сильно связывался с ЛПС при pH 5, с пониженным связыванием при pH 6 и pH 7 и слабым связыванием или отсутствием связывания при pH 8 или выше или pH 4 или ниже. Напротив, IAIP связывался с IgG мкАт 69.26 при pH 5-pH 9, но не связывался при pH 4 или ниже. Как и в предыдущих экспериментах, IAIP не связывался с БСА.

На фиг. 12 представлена гистограмма, демонстрирующая влияние концентрации соли (NaCl) на связывание биотинилированного IAIP с ЛПС, БСА и IgG IAIP-специфического антитела мкАт 69.26. Эти данные демонстрируют, что соль не влияла на связывание IAIP как с ЛПС, так и с мкАт 69.26, что указывает на сильное и специфическое связывание. Связывание с БСА не наблюдали ни при одной из испытанных концентраций соли.

На фиг. 13 представлена гистограмма, демонстрирующая влияние концентрации неионного детергента NP-40 на связывание биотинилированного IAIP с ЛПС, БСА и IgG IAIP-специфического антитела мкАт 69.26. Связывание IAIP с ЛПС усиливалось добавлением 0,05% NP-40 и все еще наблюдалось в

присутствии 1% NP-40, что указывает на сильное взаимодействие связывания. Связывание с БСА не наблюдали ни при одной из испытанных концентраций NP-40.

На фиг. 14 представлена гистограмма, демонстрирующая влияние концентрации неионного детергента Твин-20 на связывание биотинилированного IAIP с ЛПС, БСА и IgG IAIP-специфического антитела мкАт 69.26. Связывание IAIP с ЛПС усиливалось добавлением 0,05% Твин-20 и все еще наблюдалось в присутствии 1% Твин-20, что указывает на сильное взаимодействие связывания. Связывание с БСА не наблюдали ни при одной из испытанных концентраций Твин-20.

На фиг. 15A-15B представлены гистограммы, отображающие уровень IAIP в крови (фиг. 15A) и СРБ (С-реактивный белок) (фиг. 15B) у младенцев с НЭК (n=14) и СПК (спонтанной перфорации кишечника) (n=13), а также у здоровых контролей, сопоставляемых по полу, весу и гестационному возрасту (n=26) при начальном проявлении. Снижение уровня IAIP было обнаружено у младенцев с установленным НЭК (среднее значение $\pm$ СО: 139 ± 21 мкг/мл), в то время как уровни у здоровых контролей (276 ± 110 мкг/мл) или у младенцев с СПК (319 ± 72 мкг/мл) были значительно выше ($p < 0,05$ и $p < 0,005$). Напротив, статистически значимой разницы между уровнями IAIP у младенцев с СПК и контролями не выявлено ($p > 0,4$). При исследовании уровней СРБ не было обнаружено достоверных различий между СПК, НЭК и контрольной группой ($p > 0,05$).

На фиг. 16A-16B представлены графики, изображающие ROC-кривые IAIP и СРБ у младенцев с НЭК. Прогностическая ценность уровня IAIP выше при чувствительности 100%, специфичности 88,2%, PPV 41% и NPV 100%, (фиг. 16A) по сравнению с СРБ (фиг. 16B) с чувствительностью 100%, специфичностью 64,7%, PPV 18% и NPV 98%.

На фиг. 17 представлен график, отражающий результаты лонгитюдных исследований уровней IAIP в плазме крови у младенцев с НЭК (n=8) и СПК (n=9). Кровь отбирали последовательно в момент до и после начала проявления заболевания. Никаких существенных различий в уровнях IAIP не было обнаружено в обеих группах младенцев с СПК и НЭК до начала заболевания ($p > 0,6$), но уровни IAIP у младенцев с НЭК были достоверно ниже по сравнению с уровнями у детей с СПК ($p < 0,04$) вплоть до 10 суток после начала заболевания.

На фиг. 18 представлена схема экспресс-теста IAIP на основе иммунохроматографического анализа.

На фиг. 19 представлен график, изображающий стандартную кривую экспресс-теста IAIP с использованием ридера ESEQuant. Значения каждой точки были построены как среднее значение $\pm$ СО в общей сложности из 13 независимых анализов. Стандартная кривая экспресс-теста подходит для образцов плазмы с уровнем IAIP, который находится в диапазоне от 17,5 до 1100 мкг/мл.

На фиг. 20A-20C представлена серия графиков, отображающих корреляции между результатами, полученными с помощью экспресс-теста IAIP с использованием ридера ESEQuant, ридера Detekt, ридера iCalQ, и результатами, полученными с помощью установленного конкурентного формата ИФА.

На фиг. 21A-21B представлена серия графиков, изображающих количественное определение IAIP с использованием "сэндвич"-ИФА, в котором гиалуоновая кислота иммобилизована на 96-луночном планшете для захвата IAIP, и IAIP детектируют с использованием конъюгированного с биотином мкАт 69.26 (моноклональное антитело против человеческого IAIP). Анализ может быть использован для количественного определения IAIP в серийных разведениях как человеческой плазмы (фиг. 21A), так и очищенного IAIP (фиг. 21B) с использованием 50 нг, 100 нг или 200 нг гиалуоновой кислоты на лунку.

Подробное описание изобретения

Описаны способы измерения концентрации IAIP в образце (например, образец от субъекта, такой как образец крови) с использованием реагента, который может быть использован для измерения количества IAIP в образце (например, реагент, который непосредственно связывается с IAIP в образце, такой лиганд IAIP, или реагент, который связывается с лигандом IAIP, который связан с IAIP). Реагент может быть измерен с помощью детектируемой метки. Эти способы могут быть использованы для идентификации субъектов, имеющих или подверженных риску развития воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции, для определения состояния здоровья или тяжести заболевания у субъекта и для контроля лечения патологического состояния у субъекта (например, воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции), которому вводят терапевтический агент (например, IAIP или агент для лечения воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции).

Анализ для количественного определения IAIP.

Представлены методы количественного определения IAIP в образце (образцах), собранных у субъекта. Предыдущие способы обнаружения IAIP опирались на конкурентные ИФА на основе антител, которые обеспечивают не прямое измерение концентрации IAIP в образце. Этот способ обнаруживает как интактные комплексы IAIP (например, IAIP, содержащие одну или более тяжелых цепей (H1-H5) и легкую цепь, бикунин), так и только бикунин. Напротив, способы, описанные в данном документе, используют реагент (например, лиганд IAIP), который обнаруживает IAIP в образце непосредственно путем связывания с тяжелой цепью IAIP, тяжелой и легкой цепью комплекса интактного IAIP или GAG комплекса IAIP, но не связывает только бикунин.

Не желая быть связанными теорией, анализы на основе лиганда IAIP, описанные в данном документе, демонстрируют большую чувствительность и надежность, чем конкурентный ИФА из-за обнаружения тяжелой цепи IAIP или комплексов интактного IAIP. Данные способы обеспечивают улучшенное считывание количества функционального IAIP в образце относительно анализов на основе антител, которые обнаруживают расщепленную или разрушенную легкую цепь IAIP.

Способы, описанные в данном документе, включают применение лиганда IAIP для обнаружения IAIP, например IAIP, захваченного подложкой (например, твердой подложкой, например, планшетом, смолой, частицей, контейнером, мембраной или гранулой) с использованием, например, IAIP-специфического агента, такого как антитело, применение лиганда IAIP для захвата IAIP для последующего обнаружения с помощью IAIP-специфического антитела и применение лиганда IAIP для захвата IAIP для последующего обнаружения с помощью второго, отличного от других лиганда IAIP.

Первый способ, который можно применять для обнаружения интактного IAIP в образце, включает связывающий агент IAIP (например, IAIP-специфическое антитело или лиганд IAIP), который прикрепляют к подложке и используют для захвата IAIP в образце. Затем добавляют агент, детектирующий IAIP, (например, лиганд IAIP или IAIP-специфическое антитело), который связывается с IAIP, который образовал комплекс со агентом, связывающим IAIP. Затем концентрацию IAIP можно определить количественно, например, путем обнаружения наличия метки, которая или прикреплена непосредственно к агенту, детектирующему IAIP, или прикреплена к реагенту, который связывается с агентом, детектирующим IAIP.

Второй способ, который можно применять для определения количества IAIP в образце, включает обнаружение комплексов IAIP-лиганд IAIP, которые образовались *in vivo* и которые присутствуют в образце. Данный способ также начинается с применения связывающего агента, который прикреплен к подложке. Связывающий агент может связываться или с IAIP, или с лигандом IAIP. Затем добавляется детектирующий агент, который связывается с другим компонентом комплекса IAIP-лиганд IAIP (например, если связывающий агент направлен на IAIP, детектирующий агент направлен на лиганд IAIP и, наоборот, если связывающий агент направлен на лиганд IAIP, детектирующий агент направлен на IAIP). Затем концентрацию IAIP можно измерить, например, путем обнаружения наличия метки, которая или прямо, или косвенно прикреплена к детектирующему агенту.

Реагенты, используемые в способах, и стадии способа подробно обсуждаются ниже.

Лиганды IAIP.

Лиганды IAIP для применения в описанных в данном документе способах включают лиганды, которые связываются с одной или более тяжелыми цепями IAIP, с тяжелой(ыми) цепью(ями) IAIP и легкой цепью, бикунинном (например, интактного IAIP) или с GAG IAIP (например, GAG в интактном IAIP). Интактный IAIP представляет собой комплекс, содержащий по меньшей мере одну тяжелую цепь IAIP (H1, H2, H3, H4 и/или H5) и легкую цепь IAIP (бикунин). Любой лиганд, который связывается с тяжелой цепью IAIP или интактным IAIP, можно использовать в описанных в данном документе способах, включая, например, эндотоксин (липополисахарид, ЛПС), гепарин, гистон, гиалуроновую кислоту, витронектин, фибронектин, тенасцин С, ламинин, агрекан, фактор фон Виллебранда, пентраксин-3 (РТХ3), ФНО-стимулированный ген-6 (TSG-6), коагуляционные белки (например, фактор IX и фактор XIIIa), белки комплемента (например, C1q, C2, C3, C4, C5 C6, C8, пропердин и фактор D), двухвалентные катионы (например, Ca^{2+}) и тканевую трансглутаминазу. Лиганды IAIP можно метить в соответствии со стандартными методиками, известными в данной области техники (например, с использованием одной или более детектируемых меток, описанных ниже).

Антитела к IAIP.

Антитела, которые специфически связываются с IAIP, могут быть использованы в качестве связывающих агентов или детектирующих агентов в способах, описанных в данном документе. Антитела, которые специфически связываются с IAIP, являются антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, которые специфически не связываются ни с какими белками, кроме IAIP (например, взаимодействие IAIP-специфического антитела с белками, не являющимися IAIP, дает сигнал, подобный фоновому). Антитело, которое специфически связывается с IAIP, может связываться с тяжелой цепью IAIP, легкой цепью IAIP, или с обоими, или с GAG IAIP. Предпочтительно, антитело связывается с тяжелой цепью IAIP или с интактным IAIP, содержащим тяжелые и легкие цепи. Может быть получено антитело против IAIP человека или против IAIP от другого млекопитающего (например, примата, не являющегося человеком, коровы, свиньи, овцы, козы, кошки, собаки, крысы, мыши, кролика, морской свинки или любого другого млекопитающего, не являющегося человеком, которое экспрессирует IAIP). Антитело, которое специфически связывается с IAIP, может связывать только человеческий IAIP или может быть способным связывать IAIP людей и других млекопитающих. Антитело может быть получено путем иммунизации животного, обычно используемого для получения антител к IAIP (например, кролика, морской свинки, крысы, мыши, овцы, осла, козы, хомяка и курицы). IAIP-специфическое антитело может быть поликлональным (например, пкАт R16, пкАт P20, пкАт P21), моноклональным (например, мкАт 69.26 или мкАт 69.31), химерным, или рекомбинантным.

Метки.

Метки для определения концентрации IAIP в способах, описанных в данном документе, могут быть присоединены или конъюгированы с лигандами IAIP, IAIP-специфическими антителами или с другими реагентами, описанными в данном документе. Метки, подходящие для обнаружения лигандов IAIP, специфических к лиганду IAIP антител, и/или IAIP-специфических антител, включают биотин, ферменты (например, пероксидазу хрена (ПХ), щелочную фосфатазу (ЩФ), β -галактозидазу, ацетилхолинэстеразу и каталазу), субстраты ферментов, радиоактивные метки (например, радиоизотопы), люминесцентные вещества, частицы (например, коллоидное золото (например, наночастицы золота), магнитные частицы, или латексные частицы) и флуоресцентные красители. Метка может быть затем оценена непосредственно (например, с помощью визуализации флуоресцентных красителей, обнаружения радиоактивности или обнаружения частиц), с помощью конъюгированного с ферментами авидина или стрептавидина (например, авидина или стрептавидина, конъюгированного с ЩФ или ПХ, для обнаружения биотина) и/или посредством использования субстрата, и может быть визуализирована при помощи известных способов и устройств, включая, например, спектрофотометр, флуорометр, люминометр или жидкостный сцинтилляционный счетчик. Субстраты могут быть колориметрическими (например, PNPP для обнаружения ЩФ; или ABTS, OPD или TMB для обнаружения ПХ), хемилюминесцентными или флуоресцентными. Субстраты также включают жидкие сцинтилляторы для обнаружения радиоактивности. Стандартные способы обнаружения, известные в данной области техники, могут быть использованы для обнаружения описанных в данном документе меток.

Образцы.

Описанные в данном документе способы могут быть выполнены с использованием образца от субъекта (например, человека). Подходящие образцы включают образцы жидкости. Например, IAIP может быть измерен в образце крови или плазмы от субъекта (например, субъекта с воспалительным заболеванием или патологическим состоянием, таким как сепсис, или субъекта с риском развития воспалительного заболевания или патологического состояния, такого как сепсис). Описанные в данном документе способы также могут быть выполнены с использованием образца других жидкостей организма, таких как моча, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, амниотическая жидкость, интерстициальная жидкость, фолликулярная жидкость, перитонеальная жидкость, жидкость бронхоальвеолярного лаважа, грудное молоко, мокрота, лимфа и желчь. Образцы тканей (например, биопсии) от субъекта могут быть гомогенизированы в соответствующем буфере для создания "жидкости" для количественного определения IAIP с использованием этих способов.

Объем образца, используемого в анализе, будет варьироваться в зависимости от типа выполняемого анализа (например, ИФА, иммунохроматографического анализа или другого анализа) и подложки (например, планшета, мембраны, тест-полоски или другой подложки). Объем используемого образца может составлять от около 1 мкл до около 500 мкл (например, от около 1 мкл до около 150 мкл, например, от 1 мкл до около 30 мкл для анализа, такого как иммунохроматографический анализ, или от около 50 мкл до около 200 мкл для анализа, такого как ИФА). Образец может быть разбавлен перед использованием в анализе буфером, который не будет мешать связыванию со связывающим или детектирующим агентом (например, водой, PBS или буфером, используемым в способах анализа), и может быть разбавлен 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:100 или более.

Способ обнаружения интактного IAIP.

Первый количественный анализ IAIP включает приведение в контакт образца, содержащего IAIP, с агентом, связывающим IAIP, (например, антителом, которое специфически связывается с IAIP или лигандом IAIP) с образованием комплекса IAIP-связывающий агент. Агент, связывающий IAIP, может быть присоединен к подложке (например, твердой подложке). Подходящие подложки включают планшеты (например, многоруночные планшеты), частицы (например, магнитные частицы, наночастицы, магнитные наночастицы), биочипы, смолы, мембраны (например, нитроцеллюлозные мембраны, мембраны из ПВДФ), контейнеры (например, пробирки), тест-полоски (например, целлюлозу, стекловолокно, нитроцеллюлозу) и гранулы (например, гранулы из белка А или белка G, магнитные гранулы, стеклянные гранулы, пластиковые гранулы). Подложка предпочтительно может быть промыта один или более раз (например, с использованием буфера, такого как TBS, TBS-T, PBS или PBS-T) для удаления материала, который не связывается с агентом, связывающим IAIP.

Комплекс IAIP-связывающий агент затем вводят в контакт с агентом, детектирующим IAIP, (например, лиганд IAIP или антитело, которое специфически связывается с IAIP). Детектирующий агент IAIP может быть конъюгирован с меткой (например, с одной или более метками, описанными выше), которая затем может быть обнаружена с использованием известных способов обнаружения. Альтернативно, агент, детектирующий IAIP, можно сразу обнаружить без использования метки. После добавления агента, детектирующего IAIP, можно выполнить дополнительную стадию промывки (например, один или более) для удаления несвязанного детектирующего агента.

Затем IAIP может быть измерен на основе сигнала от конъюгированной метки или присоединенного детектирующего агента (например, активности фермента или флуоресценции) с использованием стандартных способов, известных в данной области техники. Если фермент используется в качестве метки, субстрат может быть добавлен для получения сигнала (например, изменения цвета) и может быть считан

устройством, подходящим для обнаружения сигнала, таким как спектрофотометр. Сигнал (например, оптическая плотность или флуоресценция) может быть нанесен на стандарт с известной концентрацией IAIP для установления стандартной кривой или может быть сравнен с известной эталонной концентрацией. Неизвестная концентрация в образцах может быть рассчитана и определена на основе установленной стандартной кривой или эталонного значения концентрации.

Перед добавлением образца к агенту, связывающему IAIP, можно выполнить стадию блокирования для предотвращения или уменьшения неспецифического связывания. Блокирующие агенты для применения в способах, описанных в данном документе, включают, например, молоко, БСА, казеин, желатин (например, рыбий желатин) и сыворотку (например, козью сыворотку, ослиную сыворотку, лошадиную сыворотку, фетальную бычью сыворотку).

Стадии способа могут быть выполнены при pH от 7,0 до 3,5 (например, pH от 5,0 до 3,5, например, pH 4,0). Например, стадия связывания и/или стадия обнаружения могут быть выполнены при pH от 7,0 до 3,5 (например, pH от 5,0 до 3,5, например, pH 4,0). Агент, связывающий IAIP, может быть приготовлен в буфере с pH от 7,0 до 3,5 (например, pH от 5,0 до pH 3,5, например, pH 4,0) и/или агент, детектирующий IAIP, (например, лиганд IAIP) может быть приготовлен в буфере с pH от 7,0 до 3,5 (например, pH от 5,0 до pH 3,5, например, pH 4,0). Для улучшения обнаружения IAIP можно использовать буфер с низким pH (например, pH 5,0 или ниже, например, pH 4,0).

Кроме того, для стабилизации IAIP во время анализа в образец двухвалентные катионы (например, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} и др.) могут быть добавлены до или во время контакта с агентом, связывающим IAIP, и/или добавлены в буфер, содержащий детектирующий агент, до или во время контакта с комплексом связывающий агент-IAIP. Двухвалентные катионы могут быть получены в концентрациях от 1 мкМ до 1 М (например, от 100 мкМ до 100 мМ, от 1 мМ до 10 мМ).

Агент, связывающий IAIP-специфическое антитело, и агент, детектирующий лиганд IAIP.

В одном примере способа, описанного в данном документе, агент, связывающий IAIP, представляет собой антитело, которое специфически связывается с IAIP (например, мкАт 69.26 или мкАт 69.31), и детектирующий агент представляет собой меченый лиганд IAIP (например, гепарин, гиалуроновую кислоту или ЛПС). Альтернативно, лиганд может быть немечен и обнаружен с использованием меченого антитела, которое является специфическим для лиганда IAIP, или немеченый лиганд может быть обнаружен с использованием немеченого антитела, которое является специфическим для лиганда IAIP, который затем обнаруживается с использованием меченого вторичного антитела (например, меченое вторичное антитело, которое связывается с антителом, которое является специфическим для лиганда IAIP, но не связывается с антителом IAIP, (например, антитело к IAIP и антитело к лиганду IAIP генерируются у разных видов хозяев). Если лиганд не является меченым и обнаруживается с использованием меченого лиганд-специфического антитела или лиганд-специфического антитела и меченого вторичного антитела, дополнительные стадии промывки могут быть выполнены до и/или после инкубации с каждым антителом.

Агент, связывающий лиганд IAIP, и агент, детектирующий IAIP-специфическое антитело.

В другом примере способа, описанного в данном документе, связывающий агент IAIP представляет собой лиганд IAIP (например, гепарин, гиалуроновую кислоту или ЛПС), а детектирующий агент представляет собой антитело, которое является специфическим для IAIP (например, мкАт 69.26 или мкАт 69.31). В данном примере антитело, которое является специфическим для IAIP, может быть конъюгировано непосредственно с меткой, или антитело может быть обнаружено с помощью меченого вторичного антитела, которое связывается с IAIP-специфическим антителом. Если используется меченое вторичное антитело, стадию промывки можно выполнить после инкубации с вторичным антителом, чтобы минимизировать неспецифический сигнал до измерения IAIP.

Агент, связывающий лиганд IAIP, и агент, детектирующий лиганд IAIP.

В третьем примере способа, описанного в данном документе, связывающий агент представляет собой лиганд IAIP (например, гиалуроновую кислоту), и детектирующий агент представляет собой меченый лиганд IAIP, который связывается с другой областью IAIP (например, гепарин, гиалуроновая кислота или ЛПС). Данный способ может быть выполнен с любыми двумя лигандами IAIP, которые не связываются с одной и той же областью IAIP (например, два лиганда IAIP, которые не конкурируют за связывание с IAIP или для которых связывание одного из лигандов IAIP стерически не препятствует связыванию второго лиганда IAIP с IAIP). Лиганд, который действует как агент, детектирующий IAIP, может быть немечен и обнаружен с использованием меченого антитела, которое является специфическим для лиганда IAIP, который действует как детектирующий агент, или он может быть обнаружен с помощью меченого вторичного антитела, которое связывается с немеченым антителом, которое является специфическим для лиганда IAIP, который действует как детектирующий агент. Если меченые антитела используются для обнаружения лиганда IAIP, который действует как детектирующий агент, дополнительные стадии промывки могут быть выполнены до и/или после инкубации с каждым антителом.

Агент, связывающий IAIP-специфическое антитело, и агент, детектирующий IAIP-специфическое антитело.

В четвертом примере способа, описанного в данном документе, связывающий агент представляет собой IAIP-специфическое антитело, и детектирующий агент представляет собой меченое IAIP-

специфическое антитело. В данном примере, по меньшей мере одно из IAIP-специфических антител способно связываться или с интактным IAIP или IAIP, который содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь (например, антитело не связывается с бикунинном, если хотя бы одна тяжелая цепь IAIP, например, антитело не связывается с расщепленным или разрушенным IAIP, в котором отсутствует бикунин). Кроме того, два IAIP-специфических антитела, используемые в анализе, связывают различные эпитопы IAIP (например, антитела не конкурируют за связывание с IAIP). Если два IAIP-специфических антитела генерируются с использованием разных видов хозяев, то IAIP-специфическое антитело, используемое в качестве детектирующего агента, может быть мечено и детектировано с использованием меченого вторичного антитела. Если используется меченое вторичное антитело, дополнительные стадии промывки могут быть выполнены до и/или после инкубации с меченым вторичным антителом.

Количественное определение IAIP с использованием быстрого иммунохроматографического анализа (ИХА).

В пятом примере способы, описанные в данном документе, могут быть выполнены с использованием теста на основе иммунохроматографического анализа. В данном примере небольшой объем образца (например, 1-30 мкл, например, 15 мкл) может быть нанесен на тест-полоску (например, целлюлозу, стекловолокно или нитроцеллюлозу) в неразбавленном виде или в разбавленном виде (например, разбавленном 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:100 или более, например, с буфером (например, PBS) или водой) и затем добавляют буфер для проталкивания образца через полоску. Полоска содержит агент, связывающий IAIP, (например, IAIP-специфическое антитело или лиганд IAIP) для связывания с IAIP в образце. IAIP может быть обнаружен с помощью агента, детектирующего IAIP, (например, меченого IAIP-специфического антитела или меченого лиганда IAIP), который может быть добавлен к полоске до, после или одновременно с добавлением образца. Тест-полоска может быть считана с помощью соответствующего ридера для количественного определения метки, прикрепленной к агенту, детектирующему IAIP, (например, портативного настольного ридера для тест-полосок, ридера на основе портативного КПК или ридера на основе смартфона/планшета, в частности). Выбор комбинации связывающего и детектирующего агента может быть осуществлен на основе параметров, описанных в данном документе. Этот анализ может быть выполнен быстро (например, за 15 минут или менее, например, за 15, 10 или 7 минут или менее) и обеспечивает количественное и быстрое измерение IAIP в небольшом объеме образца.

Обнаружение комплексов природный IAIP-лиганд IAIP.

Также предлагаются способы обнаружения комплексов природный IAIP-лиганд IAIP (например, комплексов IAIP-лиганд IAIP, которые образовались *in vivo* у субъекта (например, у субъекта-человека) и присутствуют в образце от субъекта). Данный способ включает приведение в контакт образца (например, образца жидкости, такой как плазма, сыворотка, кровь, бронхоальвеолярная жидкость, спинномозговая жидкость, мокрота, моча или другие жидкости организма) со связывающим агентом, например, связывающим агентом, который прикреплен к подложке (например, твердой подложке). Связывающий агент может представлять собой связывающий агент IAIP (например, антитело, которое специфически связывается с IAIP, например, мкАт 69.26 или мкАт 69.31, или лиганд IAIP), или связывающий агент может представлять собой антитело, которое специфически связывается с представляющим интерес лигандом IAIP (например, лигандом IAIP, который предположительно образовал комплекс IAIP-лиганд IAIP *in vivo*). Подходящие подложки включают планшеты (например, многолуночные планшеты), частицы (например, магнитные частицы, наночастицы, магнитные наночастицы), биочипы, смолы, контейнеры (например, пробирки), мембраны (например, нитроцеллюлозные мембраны, мембраны из ПВДФ), тест-полоски (например, целлюлозу, стекловолокно или нитроцеллюлозу) и гранулы (например, гранулы из белка А или белка G, магнитные гранулы, стеклянные гранулы, пластиковые гранулы). Подложка предпочтительно может быть промыта один или более раз (например, с использованием буфера, такого как TBS, TBS-T, PBS или PBS-T) для удаления материала, который не связывается со связывающим агентом.

Если связывающий агент, используемый в анализе, представляет собой агент, связывающий IAIP, (например, антитело, которое специфически связывается с IAIP, например, мкАт 69.26 или мкАт 69.31, или лиганд IAIP), комплекс IAIP-лиганд IAIP может быть обнаружен с использованием детектирующего агента, который представляет собой антитело, направленное против представляющего интерес лиганда IAIP, путем приведения в контакт антитела с комплексом IAIP-связывающий агент. Если связывающий агент, используемый в анализе, представляет собой антитело, которое специфически связывается с представляющим интерес лигандом IAIP, комплекс IAIP-лиганд IAIP может быть обнаружен с использованием детектирующего агента, который специфически связывается с IAIP (например, антителом, которое специфически связывается с IAIP, например, мкАт 69.26 или мкАт 69.31 или другим лигандом IAIP) путем приведения в контакт детектирующего агента с комплексом IAIP-связывающий агент.

Стадия промывки (например, одна или более) может быть выполнена после инкубации с детектирующим агентом. Кроме того, перед добавлением образца к агенту, связывающему IAIP или лиганд IAIP, можно выполнить стадию блокирования для предотвращения или уменьшения неспецифического связывания. Блокирующие агенты для применения в способах, описанных в данном документе, включают,

например, молоко, БСА, казеин, желатин (например, рыбий желатин) и сыворотку (например, козью сыворотку, ослиную сыворотку, лошадиную сыворотку, фетальную бычью сыворотку).

Если детектирующий агент представляет собой антитело (например, антитело, специфическое для IAIP, или антитело, специфическое к лиганду IAIP), детектирующий агент может быть непосредственно конъюгирован с меткой (например, меткой, описанной выше), или детектирующий агент может быть визуализирован путем добавления меченого вторичного антитела, которое не связывается с любым другим антителом, используемым в анализе (например, связывающим агентом, если это антитело).

Если детектирующий агент представляет собой лиганд (например, лиганд IAIP, такой как лиганд IAIP, отличный от того, который обнаруживается в анализе), детектирующий агент может быть непосредственно конъюгирован с меткой (например, меткой, описанной выше) или обнаружен с использованием меченого лиганд-специфического антитела, которое затем детектируют. Альтернативно, детектирующий агент может быть обнаружен с использованием немеченого лиганд-специфического антитела и меченого вторичного антитела, которое не связывается с любым другим антителом, используемым в анализе (например, связывающим агентом, если это антитело). Если детектирующий агент является немеченым и используются дополнительные реагенты (например, меченые первичные или вторичные антитела), одна или более стадий промывки могут быть выполнены после инкубации с дополнительными реагентами, чтобы минимизировать неспецифический сигнал. Метку можно использовать для измерения концентрации комплекса IAIP-лиганд IAIP с использованием тех же субстратов и способов визуализации, упомянутых выше. Сигнал от образца можно сравнить с сигналом, измеренным в образце (образцах) с известной концентрацией комплекса IAIP-лиганд IAIP (например, для установления стандартной кривой). Неизвестная концентрация в образцах может быть рассчитана на основе установленной стандартной кривой или на основе известного эталонного значения концентрации.

Если идентичность лиганда IAIP в комплексе IAIP-лиганд IAIP неизвестна, способ может быть выполнен с использованием антитела, которое специфически связывается с IAIP (например, антитело, которое связывается с интактным IAIP и/или тяжелой цепью IAIP) в качестве связывающего агента. Стадию обнаружения можно затем выполнить путем добавления меченых вторичных антител, специфических к различным лигандам IAIP, промывки после инкубации с мечеными вторичными антителами и детектирования сигнала от метки для определения идентичности лиганда IAIP в комплексе IAIP-лиганд IAIP. Меченые антитела могут быть добавлены и оценены по отдельности для идентификации лиганда IAIP, или они могут быть добавлены одновременно, если к каждому антителу прикреплены или конъюгированы различные метки (например, различные флуоресцентные красители). Как только лиганд IAIP идентифицирован, количество комплекса IAIP-лиганд IAIP в образце может быть количественно определено, как описано в данном документе.

Количественное определение IAIP, захваченного в анализах IAIP или комплекс IAIP-лиганд IAIP можно определить количественно, выполнив способы обнаружения, описанные в данном документе, с использованием представляющего интерес образца по сравнению с образцами, содержащими известные количества IAIP или комплекс IAIP-лиганд IAIP, которые используются для получения стандартной кривой. Образец от субъекта может быть измерен одновременно с известными количествами IAIP или комплекса IAIP-лиганд IAIP, так что можно определить концентрацию IAIP или комплекса IAIP-лиганд IAIP в образце. Концентрацию в образце от субъекта можно сравнить со средней концентрацией IAIP или комплекса IAIP-I лиганд AIP, измеренной с использованием того же анализа в контрольной популяции, такой как здоровые контроли, чтобы определить, падает ли концентрация IAIP в образце в пределах нормального диапазона, или больные контроли, чтобы определить, находится ли концентрация IAIP в образце в пределах диапазона для патологического состояния.

Концентрацию IAIP или комплекса IAIP-лиганд IAIP в образце от субъекта также можно сравнить с концентрацией IAIP или комплекса IAIP-лиганд IAIP в здоровом контроле путем измерения IAIP или комплекса IAIP-лиганд IAIP как в исследуемом образце, так и в контрольном образце, в то же время, используя способы, описанные в данном документе. Контрольные образцы включают образцы, полученные из одного и того же исходного материала (например, и исследуемый образец, и контрольный образец получены из одной и той же жидкости организма или одного и того же типа ткани). В дополнение к тому, что он получен из одного и того же исходного материала, исследуемый образец и контрольный образец также могут быть собраны у субъектов того же возраста и/или того же пола, чтобы минимизировать возможные различия между субъектами. Если концентрации IAIP непосредственно сравниваются между субъектом и здоровым контролем, снижение концентрации IAIP у субъекта на 25% или более по сравнению со здоровым контролем будет указывать на то, что субъект имеет или подвержен риску развития воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции.

Альтернативно, концентрацию IAIP или комплекса IAIP-лиганд IAIP в образце от субъекта можно сравнить с предварительно определенным пороговым значением для концентрации IAIP или комплекса IAIP-лиганд IAIP в известных условиях (например, в здоровом состоянии или патологическом состоянии). Пороговое значение может представлять собой среднюю концентрацию IAIP или комплекса IAIP-лиганд IAIP, определенной из популяции здоровых субъектов или больных субъектов.

Используя способы, описанные в данном документе, было обнаружено, что здоровые контрольные

субъекты имеют 400 ± 140 мкг/мл IAIP в плазме, хотя более высокие концентрации также наблюдаются у здоровых субъектов. У пациентов с тяжелым воспалительным заболеванием была обнаружена средняя концентрация IAIP ниже около 200 мкг/мл. Концентрация IAIP около 250 мкг/мл может быть использована в качестве порогового значения для классификации субъектов как имеющих или подверженных риску развития заболевания или патологического состояния (например, воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции). Затем эта классификация может быть использована для рекомендации субъектов для лечения или для дальнейшего диагностического тестирования. Субъекты с умеренным или низким уровнем IAIP (например, от 300 до 200 мкг/мл) могут выиграть от повторного тестирования во времени (например, один раз в неделю, два раза в месяц, один раз в месяц, один раз в два месяца, три раза в год или два раза в год) для определения того, являются ли уровни IAIP постоянными или изменяются (например, увеличиваются или уменьшаются), поскольку эти уровни могут указывать на риск развития воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции, наличия воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции, или они могут представлять нормальный исходный уровень для субъекта.

Способы определения патологического состояния или риска заболевания с использованием способов определения IAIP и комплекса IAIP-лиганд IAIP.

Описанные в данном документе способы обнаружения IAIP и комплексов IAIP-лиганд IAIP могут использоваться для измерения IAIP и/или комплексов IAIP-лиганд IAIP у различных субъектов, таких как субъект, имеющий или подозреваемый на наличие заболевания или патологического состояния (например, воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекция (например, бактериальная инфекция)). Уровень IAIP и комплекса IAIP-лиганд IAIP у такого субъекта может быть определен с использованием любого из вышеуказанных анализов, например, с целью диагностики наличия заболевания, или патологического состояния у субъекта или риска развития субъекта или будет развиваться заболевание или патологическое состояние, или контроль субъекта в отношении развития или устранения заболевания или патологического состояния.

Воспалительные заболевания или патологические состояния, которые можно, например, диагностировать или контролировать с использованием способов анализа, включают, например, острое воспалительное заболевание, сепсис, септический шок, синдром системного воспалительного ответа (SIRS), травму и/или повреждение (например, раны, ожоги, рваные раны, ушибы, переломы костей, хирургические процедуры), инсульт (например, ишемический инсульт, геморрагический инсульт), острое повреждение легких, острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), пневмонию (например, тяжелую пневмонию, тяжелую или нетяжелую внебольничную пневмонию, пневмонию, приобретенную в домах престарелых), некротизирующий энтероколит, острый панкреатит, заболевания почек (например, острое повреждение почек, повреждение печени, острую недостаточность кровообращения), презеклампсию, рак, метастаз при раке, опухолевую инвазию, заболевание периферических артерий, диабет 1-ого типа или 2-ого типа, атеросклероз сердечно-сосудистой системы, перемежающуюся хромоту, критическую ишемию конечностей, инфаркт миокарда, окклюзию сонной артерии, окклюзию пуповины, низкую массу тела при рождении, недоношенность, вызванное хирургическим вмешательством воспаление, воспаление, связанное с абсцессом, легочную недостаточность, периферическую невропатию, гипоксическую ишемию (например, гипоксически-ишемическое поражение головного мозга новорожденного или гипоксически-ишемическую энцефалопатию), ишемию тканей (например, ишемию скелетной мускулатуры, гладкой мускулатуры, сердечной мышцы, мозга, кожной мезенхимы, соединительной ткани, ткани желудочно-кишечного тракта или кости), ревматоидный артрит, менингит, рассеянный склероз, воспалительное заболевание кишечника (например, болезнь Крона), хроническую обструктивную болезнь легких, ринит, преждевременные роды или инфекционное заболевание (например, грипп или вирусную инфекцию, например, лихорадку Денге или лихорадку Западного Нила).

Инфекции, которые можно, например, диагностировать или контролировать с помощью способов анализа, включают, например, инфекции, вызванные грамотрицательными бактериями, такими как виды *Neisseria*, включая *Neisseria gonorrhoeae* и *Neisseria meningitidis*, виды *Branhamella*, включая *Branhamella catarrhalis*, виды *Escherichia*, включая *Escherichia coli*, виды *Enterobacter*, виды *Proteus*, включая *Proteus mirabilis*, виды *Pseudomonas*, включая *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mallei*, и *Pseudomonas pseudomallei*, виды *Klebsiella*, включая *Klebsiella pneumoniae*, виды *Salmonella*, виды *Shigella*, виды *Serratia*, виды *Acinetobacter*, виды *Haemophilus*, включая *Haemophilus influenzae* и *Haemophilus ducreyi*, виды *Bruceella*, виды *Yersinia*, включая *Yersinia pestis* и *Yersinia enterocolitica*, виды *Francisella*, включая *Francisella tularensis*, виды *Pasteurella*, включая *Pasteurella multocida*, *Vibrio cholerae*, виды *Flavobacterium*, *meningosepticum*, виды *Campylobacter*, включая *Campylobacter jejuni*, виды *Bacteroides* (опальный, фарингеальный), включая *Bacteroides fragilis*, виды *Fusobacterium*, включая *Fusobacterium nucleatum*, *Calymatobacterium granulomatis*, виды *Streptobacillus*, включая *Streptobacillus moniliformis*, и виды *Legionella*, включая *Legionella pneumophila*.

Анализы, описанные в данном документе, могут быть использованы для измерения уровней IAIP у субъекта, подверженного риску развития воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции. Факторы риска включают иммуносупрессию, иммунодефицит (например, субъект с ос-

лабленным иммунитетом), пожилой возраст, ожоги (например, термические ожоги), травмы, хирургическое вмешательство, инородные тела, рак, недоношенность (например, новорожденный родился преждевременно), ожирение и метаболический синдром.

Описанные в данном документе способы могут быть выполнены как часть обычного физического осмотра или как общая оценка состояния здоровья.

Диагностика патологического состояния или риска заболевания.

Анализы, описанные в данном документе, могут быть использованы наряду с традиционными способами диагностики для определения того, имеет ли субъект или находится в группе риска развития воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции. Измерение IAIP, полученное с помощью анализов, может также использоваться для определения того, является ли пациент кандидатом на лечение IAIP или противовоспалительной или противоинфекционной терапией или для прогнозирования ответа на введение IAIP (например, пациент с низкими уровнями IAIP может лечиться IAIP и/или может благоприятно реагировать на лечение IAIP). Измерение IAIP может сопровождаться введением IAIP, противовоспалительной или противоинфекционной терапии субъекту, если это считается целесообразным (например, если уровни IAIP определены как низкие, например, по меньшей мере на 25% ниже, чем уровень, который считается нормальным уровнем IAIP у здорового субъекта, или если уровни IAIP ниже 200 мкг/мл).

Измерение IAIP и/или комплекса IAIP-лиганд IAIP в образце от субъекта может быть использовано для определения того, имеет ли субъект риск развития воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции. Способ включает измерение уровня IAIP и/или комплекса IAIP-лиганд IAIP с использованием одного из способов, описанных выше, и сравнение уровня с контрольным значением (например, эталонным образцом от здорового пациента или средним значением, полученным из измерений популяции клинически здоровых пациентов). Пониженный уровень IAIP у субъекта по сравнению со здоровым контролем (например, уровень, который на 25%, 30%, 40%, 50% ниже или более у субъекта по сравнению с контролем) или концентрация IAIP около 250 мкг/мл или ниже означает, что субъект имеет или подвержен риску развития воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции. Повышенный уровень комплекса IAIP-лиганд IAIP у субъекта по сравнению со здоровым контролем (например, уровень, который на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50% выше или более у субъекта по сравнению с контролем) указывает на то, что субъект имеет или подвержен риску развития воспалительного заболевания или инфекции.

Идентичность лиганда, связанного с IAIP в природном комплексе IAIP-лиганд IAIP, может также дать представление о типе воспалительного заболевания или инфекции, которую субъект имеет или риску развития которой подвержен. Например, обнаружение повышенного уровня комплекса IAIP-ЛПС в образце от субъекта может указывать на то, что субъект имеет или подвержен риску развития инфекции (например, бактериальной инфекции), и обнаружение повышенного уровня комплекса IAIP-гистон в образце от субъекта может указывать на то, что субъект имеет или подвержен риску развития острого системного воспалительного заболевания (например, сепсиса или инсульта). Такие измерения могут быть использованы для диагностики пациентов с определенными воспалительными заболеваниями или инфекциями, или для рекомендации видов терапий или курсов лечения.

Степень тяжести заболевания.

Описанные в данном документе способы также могут быть использованы для оценки степени тяжести заболевания. Субъекты с концентрацией IAIP ниже около 200 мкг/мл, измеренной с использованием описанных в данном документе анализов, могут быть классифицированы как имеющие, или имеющие высокий риск развития тяжелого воспаления или инфекции, или имеющие больший риск заболеваемости и/или смертности. Альтернативно, субъекты с повышенным уровнем комплекса IAIP-лиганд IAIP (например, субъекты с уровнем комплекса IAIP-лиганд IAIP, таким как комплекс IAIP-ЛПС, который на 10%, 20%, 30%, 40%, 50% выше или более по сравнению со здоровым контролем или известным эталонным значением концентрации), измеренным с использованием описанных в данном документе анализов, могут быть классифицированы как имеющие или имеющие высокий риск развития тяжелого воспаления, или инфекции, или имеющие больший риск заболеваемости и/или смертности. После оценки степени тяжести заболевания может быть рекомендован соответствующий курс лечения. Субъекты, имеющие концентрацию IAIP, которая указывает на тяжелое воспаление, могут быть выбраны для более частого или более агрессивного лечения, чем субъекты, концентрация IAIP которых указывает на умеренный или низкий риск наличия воспалительного заболевания или патологического состояния. Описанные в данном документе анализы могут быть использованы для измерения интактного IAIP, и, таким образом, они могут быть использованы для выявления опасных для жизни состояний и оценки необходимости соответствующего терапевтического ответа.

Мониторинг.

Субъект, который ранее имел или который подвержен риску развития воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции (например, субъект с генетической предрасположенностью, субъект, который подвергался воздействию других людей с этим заболеванием или инфекцией, или субъект, имеющий любой из факторов риска, описанных выше), может контролироваться с исполь-

зованием описанных способов. Контроль также может быть подходящим подходом для субъектов с умеренным или низким уровнями IAIP (например, от 300 до 200 мкг/мл) и/или субъектов со слегка повышенными уровнями комплекса IAIP-лиганд IAIP (например, субъектов с уровнем комплекса IAIP-лиганд IAIP, такого как комплекс IAIP-ЛПС, который на 1%, 5% или 10% выше по сравнению со здоровым контролем или известным эталонным значением концентрации), особенно если у субъектов нет явных симптомов воспаления или инфекции. Измерения IAIP и/или комплекса IAIP-лиганд IAIP могут проводиться через регулярные интервалы (например, один раз в год, два раза в год, один раз каждые три месяца, один раз в месяц, два раза в месяц или один раз в неделю), чтобы определить, являются ли уровни IAIP и/или комплекса IAIP-лиганд IAIP постоянными или изменяющимися. Повышение уровня IAIP и/или снижение уровня комплекса IAIP-лиганд IAIP может указывать на улучшение и может привести к прекращению мониторинга и/или лечения. Снижение уровня IAIP и/или повышение уровня комплекса IAIP-лиганд IAIP может указывать на рецидив у пациентов в процессе выздоровления, или развитие, или ухудшение воспалительного заболевания или инфекции и может привести к диагностическому исследованию (например, с большей частотой) и началу, или увеличению, или изменению лечения.

Эффективность лечения.

Способы, описанные в данном документе, также могут быть использованы для оценки эффективности лечения у субъекта, которого лечат (например, с помощью антибиотика, противовоспалительного агента, противомикробного агента или IAIP) от воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции. Уровни IAIP могут измеряться до или после начала лечения, а затем измеряться на постоянной основе во время лечения (например, один раз в сутки, один раз в неделю, два раза в неделю, один раз в месяц, два раза в месяц, один раз в три месяца или два раза в год). Увеличение уровней IAIP (например, увеличение на 1%, 5%, 10%, 20%, 30% или более по сравнению с предыдущим измерением) в течение курса лечения будет свидетельствовать об улучшении и демонстрировать эффективность лечения, в то время как постоянные или уменьшающиеся уровни IAIP (например, одно или более измерений, которые не демонстрируют изменения или демонстрируют уменьшение на 1%, 5%, 10%, 20%, 30% или более по сравнению с предыдущим измерением) будут указывать на отсутствие улучшения и предполагают, что курс лечения должен быть модифицирован или изменен (например, увеличен в дозе или частоте, или в том и другом, изменен на другое терапевтическое средство, или модифицирован для включения дополнительных терапевтических агентов).

В качестве альтернативы или в дополнение к измерению IAIP обнаружение комплекса IAIP-лиганд IAIP (например, IAIP-ЛПС) может использоваться для оценки эффективности лечения с помощью терапии для лечения или снижения риска воспалительного заболевания или инфекции. Способ включает измерение уровня комплекса IAIP-лиганд IAIP в качестве биомаркера у субъекта, подвергающегося терапии до или после начала лечения, и затем измерение на постоянной основе во время лечения (например, один раз в день, один раз в неделю, - еженедельно, раз в месяц, раз в два месяца, раз в три месяца или два раза в год). Уровень комплекса IAIP-лиганд IAIP можно сравнить с контрольным значением (например, эталонным образцом от здорового пациента или средним значением, полученным из измерений популяции контрольных субъектов (например, здоровых пациентов)) или с предварительным измерением, полученным от субъекта. Снижение уровня комплекса IAIP-лиганд IAIP до "нормального уровня" или снижение в более поздние моменты времени во время лечения (например, снижение на 1%, 5%, 10%, 20%, 30% или более относительно предварительного измерения) будет указывать, что терапия является эффективной. Увеличение уровня комплекса IAIP-лиганд IAIP (например, увеличение на 1%, 5%, 10%, 20%, 30% или более по сравнению с предыдущим измерением или "нормальным уровнем") указывает на то, что лечение является неэффективным и требует модификации (например, более высокая доза, более частое введение или и то и другое, или другое терапевтическое средство или комбинированная терапия).

Способы лечения.

Изобретение также обеспечивает способы лечения, предотвращения или снижения риска развития воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции (например, тяжелой инфекции) у субъекта (например, человека), который, как было определено, нуждается в помощи, согласно описанным в данном документе диагностическим способам (например, субъект с низкими уровнями IAIP и/или повышенными уровнями комплекса IAIP-лиганд IAIP по сравнению с эталоном или по сравнению с предыдущими измерениями). Субъект может получать лечение стандартным терапевтическим средством, подходящим для заболевания, или патологического состояния, и/или IAIP. Субъект может быть новорожденным, ребенком, подростком или взрослым.

Перед введением IAIP или другого терапевтического агента нуждающемуся в этом субъекту концентрацию IAIP можно измерять в образце от субъекта в соответствии со способами, описанными в данном документе. В качестве альтернативы или в дополнение к измерению уровней IAIP способ может включать обнаружение комплекса IAIP-лиганд IAIP до введения IAIP. Например, способ может включать обнаружение комплекса IAIP-ЛПС у субъекта, имеющего или подозреваемого на наличие бактериальной инфекции (например, инфекции, вызванной грамотрицательными бактериями), и/или измерение концентрации IAIP в образце от субъекта, и введение IAIP субъекту (например, введение IAIP субъекту с повышенным уровнем комплекса IAIP-ЛПС по сравнению со здоровым контролем или контрольным

значением (например, уровнем комплекса IAIP-ЛПС, который на 1%, 5%, 10%, 20%, на 30% выше или выше уровня в здоровом контроле) или введение IAIP субъекту с риском системного воспаления или шокового синдрома (например, субъекту с уровнями IAIP по меньшей мере на 25% ниже, чем у здорового контроля)).

IAIP или композиции, содержащие IAIP, можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом (например, как определено с использованием одного или более способов, описанных в данном документе). Субъекты, которых можно лечить с помощью IAIP, включают субъектов с инфекцией (например, инфекцией, вызванной грамотрицательными бактериями) или субъектов с повышенным риском развития инфекции (например, субъектов с одним или более факторами риска, включая иммуносупрессию, иммунодефицит (например, субъект с ослабленным иммунитетом), пожилой возраст, ожоги (например, термические ожоги), травмы, хирургическое вмешательство, инородные тела, рак, недавние роды (например, новорожденные), недоношенность (например, новорожденные, рожденные преждевременно), ожирение и метаболический синдром). Инфекция может возникать из-за эндотоксинов, вызванных высвобождением молекул липополисахаридов (ЛПС) при заражении грамотрицательными бактериями. Тяжелая инфекция, вызванная грамотрицательными бактериями, может привести к тяжелому системному воспалению, сепсису, шоковому синдрому и смерти. Как показано в данном документе, IAIP связывается с ЛПС, и, следовательно, введение IAIP может быть использовано для лечения субъектов, инфицированных грамотрицательными бактериями, чтобы уменьшить или предотвратить цитотоксичность, индуцированную ЛПС.

Инфекции, подходящие для лечения с помощью IAIP, включают инфекции, вызванные грамотрицательными бактериями, такими как виды *Neisseria*, включая *Neisseria gonorrhoeae* и *Neisseria meningitidis*, виды *Branhamella*, включая *Branhamella catarrhalis*, виды *Escherichia*, включая *Escherichia coli*, виды *Enterobacter*, виды *Proteus*, включая *Proteus mirabilis*, виды *Pseudomonas*, включая *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mallei*, и *Pseudomonas pseudomallei*, виды *Klebsiella*, включая *Klebsiella pneumoniae*, виды *Salmonella*, виды *Shigella*, виды *Serratia*, виды *Acinetobacter*; виды *Haemophilus*, включая *Haemophilus influenzae* и *Haemophilus ducreyi*, виды *Brucella*, виды *Yersinia*, включая *Yersinia pestis* и *Yersinia enterocolitica*, виды *Francisella*, включая *Francisella tularensis*, виды *Pasturella*, включая *Pasteurella multocida*, *Vibrio cholerae*, виды *Flavobacterium*, *meningosepticum*, виды *Campylobacter*, включая *Campylobacter jejuni*, виды *Bacteroides* (опальный, фарингеальный), включая *Bacteroides fragilis*, виды *Fusobacterium*, включая *Fusobacterium nucleatum*, *Calymmatobacterium granulomatis*, виды *Streptobacillus*, включая *Streptobacillus moniliformis*, и виды *Legionella*, включая *Legionella pneumophila*.

Субъекты, которые, как было определено, нуждаются в лечении (например, с помощью одного или более способов, описанных в документе) или которых можно лечить с помощью IAIP, после того, как такая потребность определена, также включают субъектов, имеющих или подверженных риску развития воспалительного заболевания или патологического состояния, такого как острое воспалительное заболевание, сепсис, септический шок, синдром системного воспалительного ответа (SIRS), травму/повреждение (например, раны, ожоги, с рваные раны, ушибы, переломы костей, хирургические процедуры), инсульт (например, ишемический инсульт, геморрагический инсульт), острое повреждение легких, острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), пневмонию (например, тяжелую пневмонию, тяжелую или нетяжелую внебольничную пневмонию, пневмонию, приобретенную в домах престарелых), некротизирующий энтероколит, острый панкреатит, заболевания почек, включая острое повреждение почек, повреждение печени, острую недостаточность кровообращения, преэклампсию, рак, метастаз при раке, опухолевую инвазию, заболевание периферических артерий, диабет 1-ого типа или 2-ого типа, атеросклероз сердечно-сосудистой системы, перемежающуюся хромоту, критическую ишемию конечностей, инфаркт миокарда, окклюзию сонной артерии, окклюзию пуповины, низкую массу тела при рождении, недоношенность, вызванное хирургическим вмешательством воспаление, воспаление, связанное с абсцессом, легочную недостаточность, периферическую невропатию, гипоксическую ишемию (например, гипоксически-ишемическое поражение головного мозга новорожденного или гипоксически-ишемическую энцефалопатию), ишемию тканей (например, ишемию скелетной мускулатуры, гладкой мускулатуры, сердечной мышцы, мозга, кожной мезенхимы, соединительной ткани, ткани желудочно-кишечного тракта или кости), ревматоидный артрит, менингит, рассеянный склероз, воспалительное заболевание кишечника (например, болезнь Крона), хроническую обструктивную болезнь легких, ринит, преждевременные роды или инфекционное заболевание (например, грипп или вирусную инфекцию, например, лихорадку Денге или лихорадку Западного Нила); субъектов с низкими уровнями IAIP (например, уровни IAIP, равные 250, 225, 200, 175, 150 мкг/мл или ниже) и субъектов с повышенными уровнями связанных с заболеванием комплексов IAIP-лиганд IAIP (например, IAIP-ЛПС или IAIP-гистон).

Введение.

IAIP (например, IaI и/или PaI) или композицию, содержащую такие белки и фармацевтически приемлемый наполнитель, разбавитель или носитель, можно вводить субъекту (например, человеку), имеющему или подверженному риску развития воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции, который, как было определено, нуждается в помощи в соответствии с описанными в данном документе диагностическими способами (например, субъект с низкими уровнями IAIP и/или повы-

шенными уровнями комплекса IAIP-лиганд IAIP по сравнению с эталоном или по сравнению с предыдущими измерениями) любым подходящим путем, включая, например, парентерально, с помощью ингаляционного спрея, местно, назально, буккально, сублингвально, интраназально, путем перорального введения, ингаляции, суппозитория, ректально, вагинально или путем инъекции. Введение путем инъекции включает, например, внутривенное, внутривенное, подкожное, интрадермальное, внутрикожное, внутримышечное, внутрисуставное, внутриартериальное, интрасиновиальное, интрастернальное, интра-текальное, интраназальное, интравитреальное и внутричерепное введение. Если пациент госпитализирован, предпочтительным способом введения является внутривенная инъекция.

IAIP (например, IaI и/или PaI) или композиция, содержащая такие белки, могут вводиться субъекту один или более раз каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 или 24 часа; один или более раз каждые 1, 2, 3, 4, 5 или 6 суток; или один или более раз каждые 1, 2, 3 или 4 недели. В других случаях IAIP (например, IaI и/или PaI) или композицию, содержащую такие белки, вводят в виде непрерывной инфузии.

IAIP (например, IaI и/или PaI) для применения в композициях согласно изобретению могут быть получены, например, из плазмы и крови человека способами, известными в данной области техники (см., например, патент США № 9139641, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

В частности, IAIP могут быть получены с чистотой от 80% до 100% (например, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100%) из природного источника (например, крови) и использованного для приготовления композиции согласно изобретению (см., например, патент США № 7932365, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). IAIP для использования в композициях согласно изобретению также могут подвергаться воздействию условий низкого pH (например, промывочного буфера, имеющего pH около 4,0 или ниже, например, около pH 3,6 или ниже) во время очистки (как описано в патенте США № 9139641).

Композиции могут включать любой подходящий IAIP, например, IaI, PaI, тяжелую цепь, легкую цепь или любую их комбинацию. Например, композиция может содержать IaI, PaI и/или бикунин. В некоторых случаях композиция может содержать IaI и PaI. Тяжелая цепь может представлять собой H1, H2, H3, H4 или H5. Легкая цепь может представлять собой бикунин.

Пропорция или концентрация IAIP (например, IaI и/или PaI) в композициях могут варьироваться в зависимости от ряда факторов, включая дозу, химические характеристики (например, гидрофобность) и способ введения. IAIP (например, IaI и/или PaI) могут присутствовать в композиции в физиологической пропорции. Физиологические пропорции могут быть, например, пропорциями, найденными у здорового человека или животного, и/или соотношением IaI и PaI, которое является естественным в плазме крови человека. Физиологические пропорции обычно составляют от около 60% до около 80% IaI и от около 20% до около 40% PaI.

IAIP (например, IaI и/или PaI) или их композиции могут иметь период полувыведения, например, более чем около 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 7,5, или 10 часов. IAIP (например, IaI и/или PaI) или их композиции могут иметь период полувыведения более чем около 5 часов или, предпочтительно, более чем около 10 часов. Более длительные периоды полувыведения предпочтительны, например, потому что требуется меньшее количество доз для введения субъекту с течением времени.

Дозировки.

Фармацевтически приемлемая композиция согласно изобретению для введения субъекту, имеющему или подверженному риску развития воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции, который, как было определено, нуждается в помощи в соответствии с описанными в данном документе диагностическими способами (например, субъекту с низкими уровнями IAIP и/или повышенными уровнями комплекса IAIP-лиганд IAIP по сравнению с эталоном или по сравнению с предыдущими измерениями) содержит IAIP (например, IaI и/или PaI) в дозе, известной в данной области техники (см., например, патент США № 7932365, публикацию международной патентной заявки № WO2009154695 и публикацию патентной заявки США № 2009/0190194, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Например, композиции согласно изобретению можно вводить в дозе в диапазоне от около 1 мг/кг до 50 мг/кг, предпочтительно в дозах от 10 мг/кг до 30 мг/кг. Дозу можно вводить один или более раз: каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 или 24 часа, каждые 1, 2, 3, 4, 5 или 6 суток или каждые 1, 2, 3 или 4 недели или по мере необходимости. Могут быть предпочтительными более низкие или более высокие дозы, чем те, которые указаны выше. Конкретные дозы и схемы лечения для любого конкретного субъекта будут зависеть от множества факторов, включая активность конкретной применяемой композиции, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, диету, время введения, скорость выведения, комбинацию лекарственных средств, степень тяжести и течение заболевания (например, состояние и/или симптомы пациента), предрасположенность субъекта к заболеванию и решение медицинского работника врача (например, врача). IAIP можно комбинировать с веществом-носителем для получения единичной лекарственной формы.

После улучшения состояния пациента, оцениваемого на основании улучшения симптомов или измерения IAIP и/или комплекса IAIP-лиганд IAIP, как описано в данном документе, при необходимости

можно назначать поддерживающую дозу композиции IAIP или комбинированной терапии. Впоследствии доза или частота введения, или и то и другое, могут быть снижены в зависимости от уменьшения симптомов до уровня, при котором сохраняется улучшенное состояние. Если симптомы уменьшились до желаемого уровня или уровень IAIP был увеличен и/или уровень комплексов IAIP-лиганд IAIP был уменьшен до желаемого уровня, лечение может быть прекращено. Однако субъектам может потребоваться долговременная интермиттирующая терапия при любом повторении симптомов заболевания или снижении уровней IAIP. Об улучшении состояния также можно судить по уровню IAIP в биологическом образце, полученном от пациента (например, крови (например, цельной крови, плазме или сыворотке), жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BALF), мокроте, моче, цереброспинальной жидкости (CSF) или гомогенате ткани (например, гомогенате биопсии печени). Уровень IAIP и/или комплекса IAIP-IAIP в биологическом образце может быть определен с помощью одного или более анализов, описанных в данном документе.

Составы.

Изобретение обеспечивает способы введения IAIP субъекту, имеющему или подверженному риску развития воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции, который, как было определено, нуждается в помощи, согласно описанным в данном документе диагностическим способам (например, субъекту, у которого обнаружены низкие уровни IAIP и/или повышенные уровни комплекса IAIP-лиганд IAIP, например, комплекса IAIP-ЛПС, при измерении с использованием способов, описанных в данном документе). Способы включают введение IAIP (например, IaI и/или PaI), композицию, которая содержит IAIP (например, IaI и/или PaI) и фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель, или такие композиции в комбинации со вторичным лечением, как описано в данном документе. Композиции могут быть составлены в виде твердого вещества или жидкости. Композиции могут быть составлены для введения любыми подходящими способами, включая описанные в данном документе.

Инъекционные формы IAIP для введения являются особенно предпочтительными. IAIP и композиции, содержащие их, могут быть составлены для внутривенной, внутрибрюшинной, подкожной, внутримышечной, внутрисуставной, внутриартериальной, интрасиновиальной, интрастеральной, интратекальной, интрадермальной, интравитреальной, интраназальной и внутричерепной инъекции или способов инфузии. Фармацевтические композиции могут быть в форме стерильного препарата для инъекции, например, в виде стерильной инъеклируемой водной или маслянистой суспензии. Суспензия может быть составлена в соответствии со способами, известными в данной области, с использованием подходящих диспергирующих или смачивающих агентов (такие как, например, TWEEN® 80) и суспендирующих агентов. Стерильный препарат для инъекций может находиться в виде стерильного раствора или суспензии для инъекций в нетоксичном парентерально-приемлемом разбавителе или растворителе.

Композиции также могут быть составлены для перорального введения в любой перорально приемлемой лекарственной форме, включая, но не ограничиваясь этим, капсулы, таблетки, пилюли, эмульсии и водные суспензии, дисперсии и растворы. Для приготовления твердых композиций, таких как таблетки, IAIP могут быть смешаны с фармацевтическим наполнителем для образования твердой композиции до придания ей лекарственной формы, содержащей гомогенную смесь. Этот твердый предварительный состав может быть затем разделен на единичные лекарственные формы описанного выше типа, содержащие, например, от 1 мг/кг до около 50 мг/кг IAIP (например, IaI и/или PaI). Твердый предварительный состав может содержать от 10 мг/кг до 30 мг/кг IAIP (например, IaI и/или PaI). Таблетки или пилюли согласно данному изобретению могут быть покрыты оболочкой или иным образом смешаны для получения лекарственной формы, обеспечивающей преимущество пролонгированного действия.

Жидкие формы, в которые могут быть включены композиции, для перорального или инъекционного введения, включают водные растворы, подходящие ароматизированные сиропы, водные или масляные суспензии и ароматизированные эмульсии с пищевыми маслами, такими как хлопковое масло, кунжутное масло, кокосовое масло или арахисовое масло, а также эликсиры и аналогичные фармацевтические носители.

Композиции для ингаляции или инсуффляции включают растворы и суспензии в фармацевтически приемлемых водных или органических растворителях, или их смесях, и порошки. Жидкие или твердые композиции могут содержать подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, описанные в данном документе и/или известные в данной области техники. Композиции можно вводить пероральным или назальным дыхательным путем для местного или системного действия. Композиции можно распылять с использованием инертных газов.

Местное применение композиций полезно, когда желаемое лечение включает области или органы, легко доступные для местного применения. Для местного нанесения на кожу композиция должна быть составлена с подходящей мазью, содержащей активные компоненты, суспендированные или растворенные в носителе. Альтернативно, фармацевтическая композиция может быть составлена с подходящим лосьоном или кремом, содержащим активную композицию, суспендированную или растворенную в носителе с подходящими эмульгирующими агентами.

Фармацевтические композиции также можно вводить в форме суппозитория для ректального введения. Эти композиции могут быть получены путем смешивания композиции согласно данному изобретению с подходящим нераздражающим наполнителем, который является твердым при комнатной температуре, но жидким при температуре прямой кишки и, следовательно, будет плавиться в прямой кишке для высвобождения активных компонентов. Местно-трансдермальные пластыри также включены в данное изобретение.

Композиции, вводимые субъекту, могут быть в форме одной или более фармацевтических композиций, описанных выше. Эти композиции могут быть стерилизованы обычными способами стерилизации или стерильно отфильтрованы. Водные растворы могут быть упакованы для использования как есть или лиофилизированы, причем лиофилизированный препарат перед введением объединяют со стерильным водным носителем.

Другие системы доставки могут включать системы доставки с замедленным высвобождением, с отсроченным высвобождением или пролонгированным высвобождением. Повторные введения композиций согласно изобретению можно избежать при помощи таких систем, увеличивая удобство для субъекта и врача. Многие типы систем доставки с контролируемым высвобождением доступны и хорошо известны обычному специалисту в данной области техники. Они включают системы на полимерной основе, такие как описанные в (патенте США № 3773919; европейском патенте № 58481, европейском патенте № 133988, Sidman, K.R. et al., *Biopolymers* 22: 547-556, и Langer, R. et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 15:267-277; Langer, R. *Chem. Tech.* 12:98-105). Другие примеры композиций с замедленным высвобождением включают полупроницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Системы доставки также включают неполимерные системы, которые представляют собой: липиды; гидрогелевые системы высвобождения; системы из силиката; системы на основе пептидов; восковые покрытия; прессованные таблетки с использованием обычных связывающих веществ и наполнителей; частично слитые имплантаты; и тому подобное. Способы приготовления таких составов будут очевидны для специалистов в данной области техники (см., например, патенты США № 4452775, 4667014, 4748034 и 5239660, 3832253 и 3854480).

Способы получения фармацевтических средств известны в данной области техники, например, Niaz, *Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations (Second Edition)*, CRC Press 2009, описывает разработку составов для жидких, стерильных, прессованных, полупрессованных и безрецептурных форм. Трансдермальная и мукозальная доставка, доставка в лимфатическую систему, наночастицы, системы с контролируемым высвобождением лекарственного средства, тераностика, белковые и пептидные препараты, и доставка биопрепаратов описаны Wang et al., *Drug Delivery: Principles and Applications (Second Edition)*, Wiley 2016; приготовление лекарственной формы и доставка пептидных и белковых агентов описаны, например, в Banga, *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems (Third Edition)*, CRC Press 2015.

Комбинированные терапии.

Способы согласно изобретению также включают введение или совместное введение второго лекарственного средства (например, в качестве отдельной терапии или в дополнение к IAI (например, IαI и/или PαI) или их композиции) для лечения воспалительного заболевания или патологического состояния (например, сепсиса, септического шока, стерильного сепсиса, SIRS, травмы/повреждения (например, ран, ожогов, рваных ран, ушибов, переломов костей, хирургических процедур), инсульта (например, ишемического инсульта, геморрагического инсульта), острого повреждения легких, ARDS, пневмонии (например, тяжелой пневмонии, тяжелой или нетяжелой внебольничной пневмонии, пневмонии, приобретенной в домах престарелых), некротизирующего энтероколита, острого панкреатита, заболевания почек, включая острое повреждение почек, повреждение печени, острую недостаточность кровообращения, преэклампсию, рак, метастаз при раке, опухолевую инвазию, заболевание периферических артерий, диабет 1-ого типа или 2-ого типа, атеросклероз сердечно-сосудистой системы, перемежающуюся хромоту, критическую ишемическую конечностей, инфаркт миокарда, окклюзию сонной артерии, окклюзию пуповины, низкую массу тела при рождении, недоношенность, вызванное хирургическим вмешательством воспаление, воспаление, связанное с абсцессом, легочную недостаточность, периферическую невропатию, гипоксическую ишемию, ишемию тканей, ревматоидный артрит, менингит, рассеянный склероз, воспалительное заболевание кишечника (например, болезнь Крона), хроническую обструктивную болезнь легких, ринит, преждевременные роды или инфекционное заболевание) или инфекцию (например, бактериальную инфекцию). Например, второе лечение может включать введение антибиотического агента, если субъект имеет или подвержен риску развития бактериальной инфекции, противовирусного агента, если субъект имеет или подвержен риску развития вирусной инфекции (например, лихорадки Денге или лихорадки Западного Нила), противогрибкового агента, если субъект имеет или подвержен риску развития грибковой инфекции, противопаразитарного средства, если субъект имеет или подвержен риску развития паразитарной инфекции, противовоспалительного агента, если субъект имеет или подвержен риску развития воспалительного заболевания или патологического состояния, описанного в данном документе, противоракового агента, если субъект имеет или подвержен риску развития рака или метастаз

при раке, антикоагулянта, если субъект имеет или подвержен риску развития инсульта или инфаркта миокарда, иммуномодулирующего агента, если субъект имеет рак, или аутоиммунное заболевание, или патологическое состояние (например, воспалительное заболевание кишечника или ревматоидный артрит), и бронхолитического агента, ингибитора комплемента, вазопрессора, седативного средства, искусственной вентиляции легких, если субъект имеет или подвержен риску развития острого повреждения легких, ARDS или пневмонии.

Когда способ включает введение комбинации IAIP (например, IαI и/или PαI), или композиции, содержащей IAIP (например, IαI и/или PαI) и фармацевтически приемлемый наполнитель, разбавитель или носитель, и одного или более вторых лечебных агентов, каждый агент присутствует при уровнях дозы от 1 до 100%, и более предпочтительно от около 5 до 95% от дозы, обычно применяемой в курсе монотерапии. Агент(ы) из второго лечения можно вводить отдельно, как часть схемы введения многократных доз, от IAIP (например, IαI и/или PαI) или их композиции. IAIP и агент(ы) из второго лечения могут вводиться одновременно или последовательно в любом порядке. Альтернативно, агент(ы) из второго лечения может быть частью единичной лекарственной формы, например, смешанный с IAIP (например, IαI и/или PαI) в одной композиции.

Агенты, которые могут вводиться в комбинации с IAIPs (например, IαI с и/или PαI), включают ди-доксинуклеозиды, например, зидовудин (AZT), 2',3'-дидеоксиинозин (ddI) и 2',3'-дидеоксицитидин (ddC), ламивудин (3TC), ставудин (d4T), и TRIZIVIR (абакавир+зидовудин+ламивудин); ненуклеозиды, например, эфавиренц (DMP-266, DuPont Pharmaceuticals/Bristol Myers Squibb), невирапин (Boehringer Ingelheim), и делавиридин (Pharmacia-Upjohn); антагонисты TAT такие как Ro 3-3335 и Ro 24-7429; ингибиторы протеазы, например, ингибиторы фурина, индинавир (Merck), ритонавир (Abbott), саквинавир (Hoffmann LaRoche), нелфинавир (Agouron Pharmaceuticals), 141 W94 (Glaxo-Wellcome), атазанавир (Bristol Myers Squibb), ампренавир (GlaxoSmithKline), фосампренавир (GlaxoSmithKline), типранавир (Boehringer Ingelheim), KALETRA (лопинавир+ритонавир, Abbott), и другие агенты, такие как 9-(2-гидроксизэтоксиметил)гуанин (ацикловир); интерферон, например, альфа-интерферон, интерлейкин II и фосфоноформат (Foscarnet); или ингибиторы проникновения в клетку, например, T20 (энфувиртид, Roche/Trimeris) или UK-427857 (Pfizer), левамизол или тимозин, цисплатин, карбоплатин, доцетаксел, паклитаксел, фторурацил, капецитабин, гемцитабин, иринотекан, топотекан, этопозид, митомицин, гефитиниб, винкристин, винбластин, доксорубин, циклофосфамид, целекоксиб, рофекоксиб, вальдекоксиб, ибупрофен, напроксен, кетопрофен, дексаметазон, преднизон, преднизолон, гидрокортизон, ацетаминофен, мизонидазол, амифостин, тамсулозин, феназопиридин, ондансетрон, гранисетрон, алосетрон, палонсетрон, прометазин, прохлорперазин, триметобензамид, апрепитант, дифеноксилат с атропином, и/или лоперамид; и антикоагулянты, например, антитромбин III и активированный белок C.

Дополнительные иллюстративные агенты, которые могут вводиться в комбинации с IAIP (например, IαI и/или PαI) или их композициями, обсуждаются ниже.

Антибиотики.

Если субъект имеет или подвержен риску развития бактериальной инфекции (например, некротизирующего энтероколита или инфекции, вызванной грамотрицательными бактериями), второе лечение может включать антибиотик, который используется для лечения бактериальной инфекции. Неограничивающие примеры антибиотиков включают: амоксициллин, пенициллин, доксициклин, кларитромицин, бензилпенициллин, азитромицин, даптомицин, линезолид, левофлоксацин, моксифлоксацин, гатифлоксацин, гентамицин, макролиды, цефалоспорины, азитромицин, ципрофлоксацин, цефуросим, амоксициллин/клавуланат калия, эритромицин, сульфаметоксазол-триметоприм, доксициклина моногидрат, цефепим, ампициллин, цефподоксим, цефтриаксон, цефазолин, этилсукцинат эритромицина, меропенем, пиперациллин-тазобактам, амикацин, эритромицина стеарата, цефепим в декстрозе, доксициклина гидрохлорид, ампициллин/сульбактам, цефтазидим, гемифлоксацин, гентамицина сульфат, эритромицина лактобионат, имипенем/циластатин, цефокситин, цефдиторен пивоксил, эртапенем, доксициклин-бензоилпероксид, ампициллин/сульбактам, меропенем, цефуросим, цефотетан, пиперациллин/тазобактам, фторхинолоны широкого спектра действия (которые могут быть использованы, например, для лечения пневмонии, вызванной атипичными патогенами, такими как *Mycoplasma pneumoniae* или *Chlamydia pneumoniae*), и другие известные в данной области техники.

Противовирусные агенты.

Если субъект имеет или подвержен риску развития вирусной инфекции (например, лихорадки Денге или лихорадки Западного Нила), второе лечение может включать противовирусный агент, который используется для лечения вирусной инфекции. Неограничивающие примеры противовирусных агентов включают занамивир, осельтамивир, пермивир, рибавирин, ацикловир, ганцикловир, фоскарнет, цидофовир и другие известные в данной области техники.

Противогрибковые агенты.

Если субъект имеет или подвержен риску развития грибковой инфекции, второе лечение может включать противогрибковый агент, который используется для лечения грибковой инфекции. Неограничивающие примеры противогрибковых агентов включают амфотерицин, каспофунгин, вориконазол, ит-

раконазол, позаконазол, флуконазол, флуцитозин и другие известные в данной области техники.

Противопаразитарные агенты.

Если субъект имеет или подвержен риску развития паразитарной инфекции, второе лечение может включать противопаразитарный агент, который используется для лечения паразитарной инфекции (например, инфекции, вызванной простейшими паразитами). Неограничивающие примеры противопаразитарных агентов включают нитазоксанид, меларсопрол, эфлорнитин, метронидазол, тинидазол, милтефозин, мебендазол, пирантела памоат, тиабендазол, диэтилкарбамазин, ивермектин, альбендазол, празиквантел, рифампицин и другие известные в данной области техники.

Противовоспалительные агенты.

Если субъект имеет или подвержен риску развития воспалительного заболевания или патологического состояния, описанного в данном документе, второе лечение может включать противовоспалительный агент, который используется для лечения или уменьшения воспаления. Неограничивающие примеры противовоспалительных агентов включают кортикостероиды, статины, стероиды, нестероидные противовоспалительные средства, глюкокортикоиды и другие известные в данной области техники.

Бронхолитические средства.

Если субъект имеет или подвержен риску развития острой травмы легких, ARDS или пневмонии, второе лечение может включать бронхолитическое средство, которое используется для расслабления бронхиальных мышц, позволяя дыхательным путям быть больше и проходить воздух через легкие. Неограничивающие примеры бронходилататоров включают бета-2 агонисты, ксантины, ипратропий, окситропий, антагонисты мускариновых рецепторов, ипратропий, окситропий, теофиллин, теобромин, кофеин, сальбутамол, изопротеренол, альбутерол, левалбутерол, пирбутерол, метапротеренол, тербуталин, сальметерол, формотерол и другие известные в данной области техники.

Вазопрессоры.

Если субъект имеет или подвержен риску развития острой травмы легких, ARDS, пневмонии или травмы/повреждения (например, ран, ожогов или хирургических процедур), второе лечение может включать вазопрессор, который вызывает сужение сосудов и/или повышение артериального давления. Неограничивающие примеры вазопрессоров включают адреналин, изопротеренол, фенилэфрин, норадrenalин, добутамин, эфедрин, доксидамин и другие известные в данной области техники.

Седативные средства.

Второе лечение может включать седативное средство. Неограничивающие примеры седативных средств включают пропофол, диприван, морфин, фентанил, мидазолам, лоразепам, пресед, инфуморф, дексмететомидин, альфентанил и другие известные в данной области техники.

Ингибиторы комплемента.

Если субъект имеет или подвержен риску развития острого повреждения легких, ARDS или пневмонии, второе лечение может включать ингибитор активации комплемента. Композиция может ингибировать активацию одного или более компонентов комплемента, таких как C1, C2, C3 (например, C3a и C3b), C4 (например, C4b), C5 (например, C5a и C5b), C6, C7, C8, C9, мембраноатакующий комплекс, фактор В, фактор D, MASP-1 и MASP-2 или их фрагменты. Ингибиторы комплемента могут включать ингибиторы протеазы, такие как C1-INH и Rhucin/rhC11NH, растворимые регуляторы комплемента, такие как sCR1/TP10, CAB-2/MLN-2222, терапевтические антитела, такие как экулизумаб/SOLIRIS®, пекселизумаб, офатумумаб, ингибиторы компонентов комплемента, такие как компстатин, антагонисты рецепторов, такие как PMX-53 и rhMBL.

Наборы.

Изобретение также включает наборы для применения при измерении IAIP в образце (например, образце жидкости) пациента (например, пациента-человека, такого как новорожденный, ребенок, подросток или взрослый). Набор может включать один или более из следующих компонентов: подложку (например, планшет (например, многоруночный планшет)), частицы (например, магнитные частицы, например, наночастицы, магнитные наночастицы), биочипы, смолы, контейнеры (например, пробирки), мембраны (например, нитроцеллюлозные мембраны, мембраны из ПВДФ), тест-полоски (например, целлюлозу, стекловолокно или нитроцеллюлозу) или гранулы (например, гранулы из белка А или белка G, магнитные гранулы, стеклянные гранулы, пластиковые гранулы), содержащие иммобилизованный агент, связывающий IAIP, (например, IAIP-специфическое антитело или лиганд IAIP), меченый агент, детектирующий IAIP (например, лиганд IAIP или IAIP-специфическое антитело), промывочный буфер, блокирующий агент, субстрат для обнаружения метки, разбавляющий агент и инструкции по выполнению анализа обнаружения. Связывающий агент и детектирующий агент могут быть предоставлены в контейнерах, или связывающий агент может быть предоставлен предварительно прикрепленным к подложке (например, связывающий агент уже прикреплен к планшету или тест-полоске).

Изобретение также включает наборы для применения при измерении комплекса IAIP-лиганд IAIP в образце (например, образце жидкости) пациента. Набор может включать один или более из следующих компонентов: подложку (например, планшет (например, многоруночный планшет)), частицы (например, магнитные частицы, например, наночастицы, магнитные наночастицы), биочипы, смолы, контейнеры (например, пробирки), мембраны (например, нитроцеллюлозные мембраны, мембраны из ПВДФ), тест-

полоски (например, целлюлозу, стекловолокно или нитроцеллюлозу) или гранулы (например, гранулы из белка А или белка G, магнитные гранулы, стеклянные гранулы, пластиковые гранулы), содержащие иммобилизованный связывающий агент (например, IAIP-специфическое антитело, другой лиганд IAIP или антитело, которое специфически связывается с лигандом IAIP), меченый детектирующий агент (например, другой лиганд IAIP, IAIP-специфическое антитело или антитело, которое специфически связывается с лигандом IAIP), промывочные буферы, блокирующий агент, субстрат для обнаружения метки, агент дилатации и инструкции для выполнения анализа обнаружения. Связывающий агент и детектирующий агент могут быть предоставлены в контейнерах, или связывающий агент может быть предоставлен предварительно прикрепленным к подложке (например, связывающий агент может быть уже прикреплен к планшету или тест-полоске).

Примеры

Следующие примеры представлены для дополнительной иллюстрации некоторых вариантов осуществления данного изобретения, но не предназначены для ограничения объема изобретения; из их иллюстративного характера будет понятно, что альтернативно могут использоваться другие процедуры, методологии или методики, известные специалистам в данной области техники.

Пример 1. Анализ гепарин-IAIP.

Получение биотинилированного гепарина.

Гепарин (гепарин натрия инъекционный (Ф.США), Sagent Pharmaceuticals, кат. № NDC 25021-400-30) конъюгировали с биотином с использованием реагента гидразида биотина (ApExBIO, кат. № A87007) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, 1000 МЕ раствор гепарина смешивали с 0,25 мг сшивающего реагента EDC (1-(3-диметиламинопропил)-3-3-этилкарбодиимида гидрохлорида, Alfa Aesar, кат. № A10807) и 0,5 мМ гидразида биотина, который предварительно растворяли в ДМСО в 0,1 м MES буфере pH 4,7 при осторожном перемешивании при комнатной температуре в течение 3 часов. Удаление неконъюгированного биотина и замену буфера осуществляли ультрафильтрацией на ультрацентрифужном фильтрующем устройстве Amicon с фильтрующей мембраной с отсечением 5 кДа (Millipore). После разведения в d-H₂O биотинилированный гепарин был готов к применению в анализе.

"Сэндвич"-ИФА гепарин-IAIP.

Очищенное мышинное моноклональное антитело против легкой цепи IAIP человека (мкАт 69.26) иммобилизовали на 96-луночном микропланшете (Immulon 600, Greiner BioOne) в концентрации 200 нг/лунка при 32°C в течение 2 часов. После блокирования 5% обезжиренным сухим молоком в течение 1 ч и промывания с использованием TBS-T (TBS+0,05% Твин-20) неизвестные образцы и известный стандарт IAIP разводили в TBS+0,1% Твин-20 и добавляли к микропланшету (конечный объем 50 мкл/лунка).

Образцы и последовательно разбавленный стандартный раствор IAIP инкубировали в течение 1 ч при температуре 32°C. После нескольких промывок микропланшета TBS-T биотинилированный гепарин разводили в буфере, содержащем 20 мМ уксусной кислоты+25 мМ NaCl, pH 4,0 (1:2500) и добавляли 50 мкл на лунку. Биотинилированный гепарин инкубировали в течение 30 минут при 32°C, а затем микропланшет промывали не менее трех раз с использованием TBS-T. Наконец, к микропланшету добавляли ПХ-конъюгированный стрептавидин (Pierce), разведенный в соотношении 1:5000 (50 мкл/лунка). После промывки добавляли 50 мкл субстрата TMB (субстрат TMB Neogen Enhanced K-Blue) и реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М HCl, а изменение цвета считывали на спектрофотометре (Molecular Devices) при длине волны 450 нм. Стандартную кривую создавали с использованием четырехточечной логистической регрессии (программное обеспечение SoftMax Pro, Molecular Devices), а семиточечную кривую строили от максимальной концентрации IAIP 2,0 мкг/мл до 0,03125 мкг/мл с последовательным двукратным разведением, как показано на фиг. 3В. Концентрация IAIP неизвестных образцов была рассчитана на основе полученной стандартной кривой.

Пример 2. Анализ ЛПС- IAIP.

Получение биотинилированного эндотоксина/ЛПС (липополисахарида):

Липополисахарид (ЛПС/эндотоксин) из Escherichia coli 055:B5 (Sigma, кат. № L2280) метили с использованием реагента гидразида биотина (ApExBIO, кат. № A87007) в соответствии с инструкциями производителя и аналогично протоколу, используемому для гепарина. 10 мг ЛПС восстанавливали в 0,1 М MES буфере и 2,5 мМ гидразида биотина и 2,5 мг EDC (1-(3-диметиламинопропил)-3-3-этилкарбодиимида гидрохлорида, Alfa Aesar, кат. № A10807) осторожно перемешивали в течение 3 часов при комнатной температуре. Удаление неконъюгированных ЛПС и замену буфера осуществляли ультрафильтрацией на ультрацентрифужном фильтрующем устройстве Amicon с фильтрующей мембраной с отсечением 5 кДа (Millipore). После разведения в d-H₂O биотинилированный ЛПС был готов к применению в анализе.

"Сэндвич"-ИФА ЛПС-IAIP.

Аналогично описанному выше протоколу для гепарина-IAIP очищенное мышинное моноклональное антитело против легкой цепи IAIP человека (мкАт 69.26) иммобилизовали на 96-луночном микропланшете (Immulon 600, Greiner BioOne) в концентрации 50 нг/лунка при 32 °C в течение 2 часов. После блокирования 5% обезжиренным сухим молоком в течение 1 ч и промывания с использованием TBS-T

(TBS+0,05% Твин-20) неизвестные образцы и известный стандарт IAIP разводили в TBS+0,1% Твин-20 и добавляли к микропланшету (конечный объем 50 мкл/лунка). Образцы и последовательно разбавленный стандартный раствор IAIP инкубировали в течение 1 ч при температуре 32°C. После нескольких промывок микроплшета TBS-Т биотинилированный ЛПС разводили в буфере, содержащем 20 мМ уксусной кислоты+25 мМ NaCl, pH 4,0 (1:32000) и добавляли 50 мкл на лунку. Биотинилированный ЛПС инкубировали в течение 30 минут при 32°C, а затем микропланшет промывали не менее трех раз с использованием TBS-Т. Наконец, к микропланшету добавляли ПХ-конъюгированный стрептавидин (Pierce), разведенный в соотношении 1:10000 (50 мкл/лунка). После промывки добавляли 50 мкл субстрата TMB (субстрат TMB Neogen Enhanced K-Blue) и реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М HCl, а изменение цвета считывали на спектрофотометре (Molecular Devices) при длине волны 450 нм. Стандартную кривую создавали с использованием четырехточечной логистической регрессии (программное обеспечение SoftMax Pro, Molecular Devices), а семиточечную кривую строили от максимальной концентрации IAIP 2,0 мкг/мл до 0,03125 мкг/мл с последовательным двукратным разведением, как показано на фиг. 3С.

Пример 3. Анализ образцов крови пациентов с диагнозом тяжелая внебольничная пневмония (sCAP).

Серийные образцы крови были взяты у пациентов с подтвержденным диагнозом sCAP, которые были госпитализированы в отделение интенсивной терапии больницы штата Род-Айленд (Rhode Island Hospital). В исследование были включены 16 пациентов, и плазму собирали на 0-е (время поступления в ОИТ (отделение интенсивной терапии)), 1-е, 3-е и 7-е сутки. Уровень IAIP определялся с помощью установленного конкурентного ИФА (фиг. 2А) и оба сэндвич-ИФА с использованием биотинилированного гепарина или биотинилированного ЛПС в качестве детектирующих молекул (фиг. 3А). Образцы крови от 95 здоровых контролей в возрасте от 17 до 71 года (полученные от здоровых доноров крови и приобретенные в Центре крови штата Род-Айленд (Rhode Island Blood Center)) были включены в это исследование для сравнения уровней IAIP в здоровых контролях с уровнями, измеренными у пациентов со sCAP. Результаты приведены на фиг. 4, 5 и 6.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что уровень IAIP у пациентов со sCAP был достоверно ниже по сравнению со здоровыми контролями на момент госпитализации и во время прогрессирования заболевания (вплоть до 7 суток). Таким образом, уровни IAIP могут использоваться для руководства врачами при оценке прогноза и принятии терапевтических решений. Хотя конкурентный ИФА продемонстрировал снижение уровней IAIP у пациентов со sCAP, анализы на основе "сэндвич"-ИФА с использованием биотин-конъюгированного гепарина и/или ЛПС в качестве специфических связывающих лигандов дали результаты, которые были более статистически значимыми (значение $p=0,0001$ между уровнем IAIP на 0-е, 1-е, 3-й 7-е сутки по сравнению со здоровыми контролями). Анализы на основе "сэндвич"-ИФА с использованием биотин-конъюгированного гепарина и/или ЛПС также выявил более низкую концентрацию IAIP у пациентов со sCAP, что привело к большей разнице между уровнями IAIP, измеренными у пациентов со sCAP и здоровыми контролями. Эти данные указывают на то, что анализы на основе "сэндвич"-ИФА с использованием меченых лигандов IAIP обладают повышенной чувствительностью и потенциально более высокой точностью, чем конкурентные ИФА.

Эти же анализы использовались также для оценки образцов от пациентов с сепсисом, поступивших в отделение интенсивной терапии больницы штата Род-Айленд.

Эти анализы дали сходные результаты. В то время как значения IAIP нормальных здоровых контролей аналогичны в конкурентном ИФА (среднее значение $\pm$ СОС=328,9+6,34 мкг/мл) и как в анализе ЛПС, так и в анализе гепарин-IAIP (337,7 $\pm$ 9,05 и 421,8 $\pm$ 14,47 мкг/мл), уровни IAIP в группах пневмонии и сепсиса были значительно выше в конкурентном ИФА, что привело к статистически менее значимым различиям или отсутствию различий между группами больных и здоровыми контролями (фиг. 8А-8С).

Пример 4. Анализ связывания гепарина с IAIP.

Оценку специфического связывания гепарина с IAIP проводили с использованием вестерн-блоттинга. Высокоочищенный IAIP (1 мкг), нормальная человеческая плазма (1 мкл), очищенный бикунин (улинастатин для инъекций, Techpool, 2 мкг) и человеческий сывороточный альбумин (ЧСА, 2 мкг) в качестве отрицательного контроля разделяли на 7,5%-ном геле ДСН-ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. После блокирования 5% обезжиренным сухим молоком нитроцеллюлозную мембрану инкубировали с биотин-конъюгированным гепарином (1:500 в TBS) в течение ночи при комнатной температуре. После нескольких промывок с TBS+0,05% Твин добавляли HRP-конъюгированный стрептавидин (1:15000) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки добавляли усиленную металлом подложку DAB (Pierce) для визуализации реактивных полос.

Биотин-конъюгированный гепарин специфически связывался с очищенным IAIP (250 кДа IaI и 125 кДа RaI), как показано на полосе 2 (фиг. 7), подобно мкАт 69.26 (моноклональное антитело против человеческого IAIP). В отличие от мкАт 69.26, который связывается с легкой цепью (бикунин) (полоса 3), биотин-конъюгированный гепарин не связывается с легкой цепью IAIP, что позволяет предположить, что гепарин связывается с IAIP через тяжелую цепь. Тяжелые цепи IAIP, по-видимому, связаны именно с гепарином.

Множественные полосы реактивного белка были обнаружены биотин-конъюгированным гепарином в плазме крови человека (фиг. 7, полоса 1), и связывание с ЧСА не была обнаружена.

Кроме того, свободный бикунин не был обнаружен в ИФА гепарин-IAIP или ЛПС-IAIP, что позволяет предположить, что только комплексы IAIP с интактной тяжелой цепью измеряются с использованием ИФА для гепарина или ЛПС-IAIP. Эти данные указывают на то, что сэндвич-ИФА с использованием гепарина и/или ЛПС (или других лигандов IAIP) обеспечивает оценку циркулирующего комплекса IAIP у субъекта (например, субъекта с патологическим состоянием), который имеет повышенную точность и надежность по сравнению с другими известными анализами IAIP, такими как конкурентный анализ IAIP (фиг. 2A).

Пример 5. Связывание биотинилированных ЛПС с иммобилизованным IAIP, полученным из плазмы крови.

Для исследования прямого связывания ЛПС с IAIP *in vitro*, IAIP и другие контрольные белки (БСА=бычий сывороточный альбумин; бикунин (легкая цепь IAIP); и очищенный IgG моноклонального антитела мкАт 69.26) в концентрации 1000 мкг/лунка иммобилизовали на 96-луночном микропланшете (Greiner Microlon 600) и блокировали обезжиренным сухим молоком (5% в TBS+0,1% Твин-20). После промывки в каждую лунку добавляли 100 мкг биотинилированных ЛПС (липополисахаридов из *Escherichia coli* O55:B5, приобретенных у Sigma, кат. № L2880) и инкубировали в буфере TBS+150 мМ CaCl₂ в течение 1 ч при комнатной температуре. После нескольких промывок с TBS+0,1% Твин добавляли ПХ-конъюгированный стрептавидин и инкубировали в течение 1 часа. Наконец, добавляли субстрат ТМВ и реакцию останавливали добавлением 1 М раствора HCl. Изменение цвета и оптическую плотность измеряли с помощью спектрометрии при 450 нм. Было обнаружено значительное связывание биотинилированных молекул ЛПС с IAIP по сравнению с БСА, который служил в качестве положительного контроля, как было описано, для связывания ЛПС (David SA, et al., *Innate Immunity* 1995; 2(2):99-106), или IgG мкАт 69.26 (отрицательного контроля) (фиг. 9). ЛПС существенно не связывался с легкой цепью IAIP (бикунином), что свидетельствует о том, что тяжелая цепь IAIP облегчает связывание с ЛПС. Связывание также может быть опосредовано цепями гликозаминогликанов.

Пример 6. Связывание биотинилированных IAIP с иммобилизованным ЛПС.

В обратном порядке предыдущего эксперимента биотинилированный IAIP (4 мкг/лунка) добавляли и инкубировали в течение 1 ч к иммобилизованным ЛПС (100 мкг/лунка), БСА (2 мкг/лунка), IgG мкАт 69.26 (2 мкг/лунка) в качестве положительного контроля, и обезжиренному сухому молоку (2 мкг/лунка) в качестве отрицательного контроля (холостая проба). После нескольких промывок добавляли ПХ-конъюгированный стрептавидин, а затем в лунки микропланшетов добавляли субстрат ТМВ. Было обнаружено значительное связывание биотинилированного IAIP с иммобилизованным ЛПС, в то время как наблюдали значительно более низкое связывание IAIP с иммобилизованным БСА или обезжиренным сухим молоком. 10). IgG мкАт 69.26 (моноклональное антитело, специфическое к IAIP человека), который служил в качестве положительного контроля в этом эксперименте, сильно связывался с биотинилированным IAIP.

Пример 7. Анализ влияния pH на связывание IAIP-ЛПС.

Для дальнейшей характеристики связывания IAIP и ЛПС были проведены аналогичные эксперименты по твердофазному связыванию. Биотинилированный IAIP инкубировали с иммобилизованными ЛПС, IgG мкАт 69.26 (положительный контроль) или БСА (отрицательный контроль) при различных условиях pH. Ацетатный буфер (50 мМ) использовали для раствора с низким pH (pH 3-6), а Трис-HCl буфер (50 мМ) использовали для получения раствора с нейтральным или более высоким pH (pH 7-9). В то время как биотинилированный IAIP сильно связывался при pH 5, связывание не наблюдали при pH 3 или 4 (фиг. 11). Сниженное связывание IAIP наблюдали при увеличении pH выше pH 5. Связывание IAIP с его специфическим моноклональным антителом мкАт 69.26 достигло максимума при pH 7, но, что интересно, существенно не изменилось при увеличении pH до pH 9. Аналогично, при pH 3 и 4 связывание IAIP с моноклональным антителом было незначительным. Связывание между биотинилированными IAIP и БСА не наблюдали. Результаты ясно указывают на то, что оптимальное связывание между IAIP и ЛПС происходит в диапазоне pH 4-7, и в частности, примерно при pH 5.

Пример 8. Анализ влияния концентрации соли на связывание IAIP-ЛПС.

Влияние концентрации соли исследовали путем добавления увеличивающихся количеств соли.

(NaCl) в буфер во время инкубации биотинилированного IAIP с иммобилизованными ЛПС на микропланшете. Связывание IAIP с ЛПС уменьшалось с увеличением концентрации соли, однако это снижение не было значительным даже при концентрации соли 1200 мМ, что свидетельствует о том, что связывание IAIP с ЛПС было относительно сильным и специфическим, подобным специфическому связыванию IAIP с моноклональным антителом (мкАт 69.26) против человеческого IAIP, которое использовали в качестве положительного контроля в данном эксперименте (фиг. 12).

Пример 9. Анализ влияния неионных детергентов (NP-40 и Твин-20) на связывание IAIP-ЛПС.

Дальнейшие исследования были проведены для изучения влияния возрастающих концентраций неионных детергентов нонилфеноксиполиэтоксилэтанола (NP-40) (фиг. 13) и Твин-20 (фиг. 14) на связывание биотинилированного IAIP с иммобилизованными ЛПС. Повышенное связывание наблюдали при

добавлении 0,05% (мас./мас.) NP-40 или Твин-20 к реакции связывания IAIP с ЛПС, по сравнению с одним только буфером TBS без добавления детергента. Низкое количество детергента может способствовать связыванию с ЛПС, предполагая, что липидсвязывающий домен молекулы ЛПС может быть вовлечен в это взаимодействие. Даже когда количество детергента было увеличено до 1%, связывание IAIP все еще было относительно сильным, поскольку большая часть IAIP все еще была связана с ЛПС, что указывает на сильное взаимодействие между IAIP и ЛПС *in vitro*. Аналогичным образом, биотинилированный IAIP прочно связывается с мкАт 69.26 с высокой специфичностью и аффинностью, и добавление детергента до 1% не приводит к значительному изменению связывания. Напротив, отрицательный контроль (БСА) не продемонстрировал никакого связывания с IAIP.

Пример 10. Количественное определение IAIP с использованием быстрого иммунохроматографического анализа (ИХА).

Описанные в данном документе способы могут быть использованы для быстрого количественного определения IAIP с использованием иммунохроматографического анализа (ИХА). Описанный и используемый в примерах 1-3 "сэндвич"-ИФА IAIP может быть адаптирован к ИХА на месте оказания медицинской помощи (РОС), быстрому, надежному, количественному и удобному для пользователя тесту, который может быть использован для идентификации субъектов высокого риска (например, младенцев, подростков или взрослых) с угрожающими жизни тяжелыми воспалительными состояниями (например, неонатальным сепсисом (НС) и некротизирующим энтероколитом (НЭК)). ИХА может а) измерять линейный диапазон от 20 до 700 мкг/мл IAIP; б) демонстрировать высокую точность (например, вариабельность или погрешность <5%) для уровней IAIP около 150 мкг/мл (например, от 100 до 200 мкг/мл); в) получать результаты в течение часа или менее (например, 15 минут или менее, например, менее чем 10, 7 или 5 минут или менее); и d) обходиться небольшим объемом образца <150 мкл образца плазмы или цельной крови (например, 150, 100, 75, 50, 25, 15, мкл или менее).

Тест может быть использован для быстрого выявления неуправляемой воспалительной реакции у субъектов (например, недоношенных новорожденных, младенцев, подростков или взрослых). Известно, что вмешательство на ранней стадии имеет важное значение для улучшения выживаемости пациентов, страдающих воспалительным заболеванием или инфекцией.

Например, у новорожденных способность применять протоколы вмешательства на ранней стадии часто ограничивается трудностью идентификации таких патологических состояний (например, НС и НЭК) от других менее серьезных заболеваний. Отличная прогностическая ценность отрицательного результата IAIP может помочь клиницистам принимать трудные решения, такие как, например, раннее прекращение лечения антибиотиками у субъекта (например, младенца, подростка или взрослого), у которого текущие тесты неинформативны. Кроме того, в качестве терапевтических белков IAIP может быть полезен у критически больных субъектов (например, младенцев, подростков или взрослых), а уровни в крови могут служить полезным прогностическим и лечебно-диагностическим маркером, помогающим врачам принимать обоснованные решения о заместительной терапии IAIP или другими вспомогательными терапевтическими агентами и контролировать прогрессирование заболевания.

Экспресс-тест на месте оказания медицинской помощи на основе IAIP, который может быть использован для влияния на терапевтические решения, такие как начало и продолжительность лечения (например, лечение антибиотиками), с использованием простого, удобного и портативного устройства с точными количественными результатами, читаемыми в течение короткого периода времени (например, 15 мин или менее) является не только инновационным, но и клинически полезным для снижения заболеваемости и смертности.

ИХА включает добавление образца от субъекта к тест-полоске (например, целлюлозе, стекловолкну или нитроцеллюлозе), который затем проталкивается в полоску с помощью буфера. Полоска содержит агент, связывающий IAIP, (например, IAIP-специфическое антитело или лиганд IAIP). Меченый детектирующий агент (например, IAIP-специфическое антитело или лиганд IAIP) может быть добавлен к полоске до, после или одновременно с образцом и визуализирован с использованием стандартных методов для быстрого количественного определения IAIP.

а) Золото-конъюгированные реагенты: наночастицы золота могут быть использованы для мечения реагентов в формате (ИХА) благодаря своей превосходной коллоидной стабильности. Стабильный состав наночастиц золота, функционализированных гидразидами, является коммерчески доступным (Innova Bioscience). В то время как обычно антитела ковалентно присоединены к коллоидному золоту в качестве детектирующих реагентов, гепарин или ЛПС могут быть аналогичным образом конъюгированы через их сахарные цепи с использованием наночастиц золота InnovaCoat Gold. Конъюгацию золота с ЛПС и гепарином можно проводить в небольших масштабах и тестировать на их стабильность и эффективность в ИХА.

б) Оптимизация захвата, обнаружения, реагентов для образца и условий ИХА: Основываясь на опыте разработки конкурентного ИХА, описанном ниже, можно выбрать состав и условия покрытия мкАт 69.26 на полосе захвата и другие факторы, такие как блокирующие агенты, поверхностно-активные вещества и углеводы, для уменьшения неспецифического связывания и улучшения характеристик потока. Можно также определить оптимальный коэффициент разбавления и подходящий разба-

витель, который уменьшает интерференцию и неспецифическое связывание. Многофакторный план экспериментов (DoE) может быть использован для определения взаимодействия следующих параметров: 1) концентрация связывающего агента, 2) pH покрытия и тип буфера (диапазон=4-10), 3) продолжительность покрытия и 4) тип блокирующего агента (например, бычий сывороточный альбумин, рыбий желатин и т.д.).

с) Компоненты тест-полоски, корпус и ридер: тест-полоска может быть размещена в пластиковой кассете с лунками для образцов и тестовыми зонами для считывания, расположенными над соответствующими участками полоски. Может быть использовано разнообразие унифицированных пространственных конфигураций полосок. Можно выбрать подходящий корпус, например, адаптированный к ридеру Detekt или ESEQuant. Состав мембраны для нанесения образца и для конъюгата, а также размер пор нитроцеллюлозной мембраны можно выбрать для достижения желаемой скорости капиллярного эффекта, следовательно, времени реакции образца с детектирующим реагентом.

Целевые характеристики ИХА могут быть оптимизированы путем изменения, например, составов и процессов для условий чередования реагента тестовой линии, метода конъюгации детектирующих молекул (например, ЛПС или гепарина) и титрования детектирующих агентов, а также оптимального материала и размеров мембран и абсорбирующих мембран, как описано ниже:

а. Оптимизация тестовых и контрольных линий. Условия образования полос на мембране могут быть оптимизированы как для тестовой линии (мкАт 69.26), так и для контрольной линии (ЛПС-связывающие белки или гепарин-связывающие белки (например, фактор свертывания IX) тест-полоски. Время высыхания в течение 30 минут при 37°C можно использовать для того, чтобы лишить подвижности контрольные и тестовые линии, в качестве надежных технологических процедур для мембран ИХА. Многофакторный DoE может быть использован для определения взаимодействия следующих параметров образования полос на мембране: 1) концентрация связывающего агента, 2) pH и тип буфера (диапазон=pH 4-10), 3) концентрация соли и 4) объем для образования полос (1-3 мкл/полоса) и скорость струи. Включение улучшений образования полос на мембране из начальных исследований оптимизации. Многофакторный DoE может также использоваться для определения эффективности совместного покрытия мембраны различными концентрациями (0-1 мкг/полоса) белковых блокаторов, поверхностно-активных веществ, углеводов и других агентов, которые могут уменьшить неспецифическое связывание частиц золота или улучшить характеристики подвижности по мембране. Основываясь на наших исследованиях твердофазного связывания, ЛПС и гепарин связываются значительно сильнее с IAIP при pH ниже 5. Аналогичные условия могут быть использованы и в ИХА.

б. Оптимизация параметров тест-полосок. Состав мембраны для нанесения образца и мембраны для конъюгата, а также размер пор нитроцеллюлозной мембраны могут влиять на скорость капиллярного эффекта, а следовательно, и на время реакции образца с реагентом, детектирующим золото, и, таким образом, могут быть выбраны для достижения желаемых результатов. Мы определили, что NC (нитроцеллюлоза) быстрого потока (HF090, Millipore) соответствует проектным характеристикам чувствительности и времени до результата. DoE может быть использована для оценки типов фильтров, и материалов мембраны или абсорбирующей мембраны для анализа. Аналогично, размер и геометрия мембраны для нанесения образца и мембраны для конъюгата могут быть скорректированы для достижения желаемых результатов.

Мембрана для нанесения образца может быть оптимизирована для: 1) приема неразбавленного образца, 2) обеспечения необходимого состава для минимизации неспецифического связывания и 3) приема образцов цельной крови. В прототипном конкурентном экспресс-тесте IAIP, описанном ниже, использовали разбавленный образец (1:5), который уменьшал потребность в объеме свежего образца, поступающего на тест-полоску, и содержащего блокирующие белки и поверхностно-активные вещества, которые уменьшают проблемы неспецифического связывания. Для компонентов (например, белковых блокаторов, поверхностно-активных веществ и т.д.) и их концентраций можно разработать мембрану для нанесения образца на основе состава (например, с высушенного состава). Существуют доступные добавки для иммуноанализа, которые могут быть использованы для эффективного и надежного снижения помех и неспецифического связывания. Скрининговые исследования потенциальных агентов могут сопровождаться многофакторным DoE для определения оптимальных концентраций, например, блокирующих агентов.

Способы конъюгации для ЛПС и гепарина могут быть оценены для применения со способами конъюгации на основе коллоидного золота (наночастиц) и окрашенных латексных частиц.

с. Фильтрующая мембрана для отделения крови и пластиковый корпус кассеты. В дополнение к мембране для нанесения образца на основе высушенного состава, встроенную фильтрующую мембрану для отделения крови, подходящую для исключения клеток крови, можно подобрать для всех образцов крови. Цель состоит в том, чтобы упростить процесс и сделать формат экспресс-теста удобным для пользователя, особенно для применений вне лаборатории в месте оказания медицинской помощи, например, при использовании непосредственно нанесенной цельной крови, взятой из пальца или из пробирки для забора крови. Несколько типов таких фильтров для крови являются коммерчески доступными, такие как мембраны VividTM или CytosepTM (Pall) или других производителей (GE Lifesciences) и могут быть ис-

пользованы в ИХА. Размеры пластикового корпуса для тест-полоски могут быть выбраны для использования с ридером (например, ридером Detekt).

Мы определили, что модель RDS-150 PRO портативного ридера Detekt™ (Detekt Biomedical, Остин, Техас) может быть использована в ИХА. Технология оптического считывания для горизонтального проточного анализа Detekt для экспресс-тестов в настоящее время используется в коммерческих диагностических устройствах при тестировании безопасности пищевых продуктов и напитков, обнаружении биологической угрозы, мониторинге окружающей среды и здоровья животных. Ридер представляет собой портативное устройство, которое оптически сканирует тест-полоску и сравнивает интенсивность сигнала исследуемой полосы и контрольной полосы с использованием запрограммированного алгоритма калибровки. Программное обеспечение для интеграции сигналов может быть настроено для интерпретации кривой доза IAIP-ответ, и этот алгоритм может быть резидентным в модулях Detekt™. Комплект разработчика Vision Suite Pro может использоваться совместно с производителем, Detekt Biomedical LLC в Остине, штат Техас, для интеграции интерпретации тест-полоски для IAIP с ридером Detekt. Программный алгоритм, основанный на форме кривой связывания IAIP и внутренних контролей, может быть разработан для выполнения следующих функций: а) для установления формы кривой связывания IAIP относительно интенсивности сигнала тестовой линии; б) для установления внутреннего контроля, возможно, основанного на сигнале контрольной линии, для корректировки ежедневной вариабельности использований тест-полосок и в) для установления программного обеспечения для включения в ридер информации о конкретной партии набора (например, посредством сканирования штрих-кода).

Эффективность разработанного и оптимизированного экспресс-теста IAIP на основе сэндвич-ИФА (в соответствии с параметрами, описанными выше и в данном документе) может быть оценена в доклинических условиях. Кассету ИХА можно испытать следующим образом:

а) Аналитическая чувствительность, регистрируемый диапазон и прецизионность - образцы/контроли известных концентраций IAIP, охватывающие вероятный диапазон концентраций IAIP (25-800 мкг/мл), могут быть протестированы в нескольких повторях в течение нескольких суток (N=10) несколькими квалифицированными рабочими (N=3 минимум). Данные могут быть проанализированы для прецизионности во всех точках кривой связывания IAIP, включая прецизионность порогового показателя анализа (устанавливается на уровне 150 мкг/мл).

б) Мешающие вещества - в пулы образцов с известными концентрациями IAIP могут быть добавлены потенциально мешающие вещества, чтобы определить влияние на восстановление дозы. Для эталона можно использовать протокол EP-07A Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI). Исходные растворы веществ (например, гемоглобина, билирубина, человеческого IgG и т.д.), которые могут быть обнаружены в высоких концентрациях в образцах пациентов, могут быть добавлены в образцы IAIP и протестированы.

в) Пользовательская оценка надежности - пулы образцов с известной концентрацией IAIP могут использоваться для проверки надежности тест-полоски к различным сценариям/ошибкам, совершаемым конечными пользователями. Тестируемые параметры включают: 1) неправильный добавленный объем образца (+25%), 2) лабораторные условия эксплуатации (температура 65-85 °F; влажность 10-70% RH) и 3) неправильное время считывания тест-полоски (+50-100% рекомендовано).

г) Изучение стабильности продукта в течение срока годности - наборы для анализа IAIP могут храниться при различных температурных режимах (например, при температуре окружающей среды и 37°C) и тестироваться с использованием набора контролей IAIP с известной концентрацией IAIP через различные интервалы времени после изготовления (>1 года) для определения стабильности продукта.

д) Чувствительность и специфичность в предварительных клинических образцах - продукт может быть протестирован с использованием клинических образцов от субъектов (например, младенцев с подозрением и подтвержденным диагнозом НС и НЭК).

Для оценки экспресс-теста IAIP в наблюдательном клиническом исследовании образцы могут быть собраны у субъектов (например, субъектов, имеющих или подверженных риску воспалительного заболевания, или патологического состояния, или инфекции), проходящих обычную клиническую оценку и лечение. Сбор данных из нескольких центров, обслуживающих широкую гетерогенную популяцию субъектов с одним и тем же воспалительным заболеванием, или патологическим состоянием, или инфекцией, может быть использован для обеспечения достаточного количества участников исследования и усиления связи между IAIP и заболеванием или инфекцией. Быстрое устройство для предоставления медицинской помощи у постели больного, которое может обеспечить уровни IAIP в режиме реального времени, может помочь избежать ненужных вмешательств или продления ненужного лечения (например, терапии антибиотиками) и может сократить продолжительность/стоимость госпитализации.

ИХА IAIP может использоваться для клинической оценки субъектов следующим образом:

1) Сбор образцов крови: Образцы могут быть собраны у субъектов, имеющих или подверженных риску развития воспалительного заболевания или патологического состояния в различных медицинских центрах. Клинические и демографические данные могут быть записаны для всех субъектов, включая возраст, массу, пол и результаты лабораторных исследований. Серийные образцы от одних и тех же субъек-

тов, собранные в различные моменты времени, (например, 0, 24, 48, 72 часа и 7 сутки) можно также использовать в ИХА. ИХА может использоваться для определения того, коррелируют ли уровни IAIP с тяжестью и прогрессированием заболевания, прогнозирует ли уровень IAIP риск или последующее заболевание, и будет ли у субъектов развиваться более тяжелое заболевание или улучшение после терапии.

2) Анализ мощности: Предварительные данные и опубликованные исследования субъектов, имеющих воспалительное заболевание, или патологическое состояние, или инфекцию, могут быть использованы для оценки размера выборки.

3) Анализ крови: Собранные клинические образцы плазмы крови можно перенести в пробирки для исследования, маркировать (деидентифицировать), и сохранить в замороженном состоянии до исследования. Уровни IAIP стабильны в течение 24 часов при комнатной температуре, до 14 суток при обычном клиническом хранении в холодильнике и в течение неограниченного времени при 20°C. Уровни IAIP могут быть проанализированы с помощью экспресс-теста IAIP на основе ИХА и сэндвич-ИФА IAIP для сравнительного исследования.

Для того, чтобы оценить обоснование концепции для экспресс-теста IAIP на основе ИХА, мы изготовили кассеты с тест-полосками, разработанные для измерения IAIP с использованием конкурентной ИХА, аналогичной приведенной на фиг. 2А. Данные, полученные с использованием этого формата иммуноанализа, описанного ниже, подтверждают, что также можно использовать ИХА на основе формата сэндвич-типа (аналогично приведенному на фиг. 3А). Конкурентный ИХА описан ниже.

Сепсис и синдром системного воспалительного ответа у новорожденных. Достижения в области интенсивной терапии привели к существенному улучшению выживаемости субъектов (например, младенцев, особенно недоношенных младенцев с очень низкой массой тела при рождении (VLBW) (<1500 г)). Недоношенные дети, однако, склонны к оппортунистическим инфекциям и острым, угрожающим жизни патологическим состояниям: неонатальному сепсису (НС) и некротизирующему энтероколиту (НЭК). Недавнее многоцентровое исследование показало, что до 21% детей с VLBW сталкиваются по меньшей мере с одним случаем позднего начала (>72 часов жизни) сепсиса, подтвержденного культурой крови, и у до 7% детей с VLBW развивается НЭК. НС и НЭК связаны с серьезной заболеваемостью, включая неблагоприятные исходы, связанные с неврологическим развитием, и имеют относительно высокую смертность при НС (10-30%) и НЭК (16-42%). Ранние признаки и симптомы этих неонатальных заболеваний являются неспецифическими, часто незаметными и легко могут быть ошибочно приняты за неинфекционную этиологию, такую как обострения бронхолегочной дисплазии, апноэ у недоношенных, гастроэзофагеальный рефлюкс или функциональную кишечную дисфункцию. Еще более тревожным является то, что клиническое ухудшение обоих заболеваний может прогрессировать молниеносно, что приводит к шоку, диссеминированному внутрисосудистому свертыванию крови и смерти в течение нескольких часов после клинического проявления. В настоящее время не существует экспресс-тестов, которые могли бы помочь врачу определить риск прогрессирования заболевания и смерти пациента.

Хотя точная причина НЭК до сих пор неясна, широко распространено мнение, что патогенез НЭК проявляется, когда инфекционные агенты транслоцируются через эпителиальный слой кишечника, избегают врожденной иммунной защиты и вызывают последующее воспаление и некроз тканей. Как НС, так и НЭК связаны с системными воспалительными ответами. Их клиническая картина, которая является неспецифической и неуловимой, очень похожа. Кроме того, НС и НЭК часто сопутствуют друг другу в одном и том же эпизоде заболевания (например, НЭК с сепсисом встречается в одной трети случаев НЭК в исследованиях случай-контроль). Безотлагательная врачебная помощь с быстрым противомикробным лечением и поддерживающим лечением являются стандартом лечения обоих патологических состояний. Таким образом, практическое и клиническое значение имеет выявление риска этих потенциально летальных патологических состояний при первой же возможности.

Биомаркер для раннего и точного выявления воспалительного заболевания или инфекции (например, НС и /или НЭК) был бы очень полезен, чтобы помочь врачам принимать сложные решения о первоначальном применении и продолжении или раннем прекращении лечения антибиотиками у субъектов (например, младенцев), для которых обычные тесты являются неинформативными. К сожалению, в настоящее время нет широко доступного биомаркера, который был бы клинически полезен и эффективен в лечении этих сложных заболеваний. Недавно прокальцитонин (РСТ) был одобрен в качестве биомаркера для помощи в лечении антибиотиками у пациентов с инфекциями нижних дыхательных путей и сепсисом, но этот маркер специфичен только для бактериальной инфекции и не чувствителен при обнаружении системных воспалительных состояний, вызванных вирусными или другими небактериальными инфекциями. Кроме того, использование теста на РСТ все еще вызывает споры у пациентов детского возраста, особенно у недоношенных детей в течение первых нескольких дней жизни. Таким образом, чувствительный биомаркер, который предоставляет информацию о степени тяжести воспалительного заболевания, будет клинически полезен при лечении воспалительных заболеваний или инфекций (например, НС и НЭК у недоношенных новорожденных). Это остается серьезной проблемой.

В. Вспомогательные предварительные данные (завершена фаза I проекта 1 программы SBIR R43 HD069243-01A1).

Сравнительные исследования прогностической ценности IAIP с другими маркерами при выявлении

младенцев с системным воспалением и с более "локализованным" заболеванием (спонтанной перфорацией кишечника).

Мы подтверждаем, что IAIP является отличным биомаркером степени тяжести и что он может дифференцировать НЭК от более очагового воспалительного заболевания, спонтанной перфорации кишечника (СПК). Тест IAIP превосходит СРБ в дифференциации НЭК и СПК.

IAIP может различать степень тяжести заболевания, например, местный воспалительный ответ (СПК) в противовес с системными и потенциально опасными для жизни воспалительными ответами (НЭК и НС). Мы собрали образцы крови 95 младенцев (64 девочек и 31 мальчиков) с подозрением на неонатальный сепсис (НС), некротизирующий энтероколит (НЭК) и спонтанную перфорацию кишечника (СПК) в больнице Women & Infants' Hospital в Провиденсе, штат Род-Айленд. Серийные образцы также собирали, когда они были доступны от каждого отдельного пациента. Большинство младенцев были в гестационном возрасте <30 недель (в диапазоне от 23 до 31 недель) со средней массой тела при рождении 1235 грамм. Из этих собранных образцов мы получили 8 младенцев с установленным НЭК, 9 младенцев с СПК и 20 младенцев с НС. Поскольку ранее мы использовали анализ IAIP для определения прогностической ценности положительного и отрицательного результатов для НС, мы оценили прогностическую ценность уровней IAIP при системных воспалительных заболеваниях, таких как НЭК, и при более "локализованном" и очаговом некротическом заболевании, таком как СПК. Мы также сравнили уровни IAIP и другого воспалительного биомаркера С-реактивного белка (СРБ) у этих младенцев с контролями, сопоставляемыми по полу, весу и гестационному возрасту. Конкурентный ИФА с использованием одного моноклонального антитела, специфического к IAIP человека (мкАт 69.26), использовали для измерения уровня IAIP в крови, а набор ИФА СРБ использовали для анализа уровня СРБ в слепом режиме. Значительное снижение уровней IAIP было обнаружено у младенцев с диагнозом НЭК (стадия II или выше согласно модифицированному критерию Белла) по сравнению со здоровыми младенцами ($p < 0,05$) и младенцами с СПК (без рентгенологических признаков НЭК, $p < 0,005$). Тем не менее, не было обнаружено существенных различий между младенцами с СПК и здоровыми контролями. Напротив, повышенные уровни СРБ были обнаружены как у младенцев с НЭК, так и у детей с СПК, хотя это повышение не было статистически значимым ($p > 0,05$) (см. фиг. 15А-15В). Кроме того, рабочая характеристика приемника (ROC) СРБ при пороговом значении <4 дает площадь под кривой (AUC) 0,65 ($p=0,01$, 95% ДИ; 0,54-0,90) с чувствительностью 100%, специфичностью 64,7%, прогностической ценностью положительного результата (PPV) 18,7 и прогностической ценностью отрицательного результата (NPV) 100; в то время как ROC IAIP при пороговом значении <207 мг/л давал надежную AUC 0,98 ($p < 0,0001$, 95% ДИ; 0,84-0,99). Прогностическая ценность IAIP была выше по сравнению с СРБ с чувствительностью 100%, специфичностью 88,2%, PPV 41 и NPV 100 (фиг. 16А-16В).

Несколько серийных образцов от младенцев были доступны у некоторых, но не у всех младенцев, до и после появления НЭК и СПК. Далее мы проанализировали уровни IAIP с использованием установленного конкурентного ИФА IAIP. Уровни IAIP у детей с НЭК были значительно ниже по сравнению с уровнем, обнаруженным у пациентов с СПК (фиг. 17) при постановке диагноза и после начала лечения. Это были случайные образцы, которые были доступны только из остаточных образцов крови. Эти результаты демонстрируют, что уровень IAIP является полезным биомаркером, который идентифицирует опасные для жизни системные воспалительные состояния, такие как НЭК (в дополнение к НС), с высокой чувствительностью и специфичностью, а уровни IAIP, по-видимому, также отличают НЭК от менее опасных для жизни патологических состояний у пациентов с СПК. Тест IAIP продемонстрировал превосходную NPV как для НЭК (100%), так и для НС (98%). Тест IAIP может использоваться для определения решений по лечению (например, лечению антибиотиками), таких как досрочное прекращение у младенцев, для которых обычные тесты являются неинформативными.

Разработка прототипа количественного конкурентного иммунохроматографического анализа (ИХА) для IAIP, который измеряет уровень IAIP в крови и выявляет НС и НЭК.

а) Выбор формата теста и схемы анализа: Для формата экспресс-теста IAIP был выбран тест на основе иммунохроматографического анализа (см. фиг. 18). ИХА обеспечивает много преимуществ при разработке быстрого анализа на месте оказания медицинской помощи, поскольку они разработаны: 1) для использования небольших объемов образца; 2) для следования хорошо охарактеризованной кинетике и обеспечения коротких промежутков времени для получения результатов тестирования; 3) чтобы быть аналитически чувствительными и точными; 4) чтобы обычно содержать внутренний контроль для проверки правильности работы устройства; 5) для производства из сырья, которое хорошо охарактеризовано и широко доступно; и 6) для генерации сигналов, которые могут быть количественно проанализированы с использованием стрип-ридера. Таким образом, ИХА, как экспресс-тест IAIP, можно использовать, например, для исследования по месту лечения.

б) Оптимизация захвата, обнаружения, и реагентов для образца и условий ИХА:

Начальные усилия были успешны в приспособлении установленного конкурентного ИФА IAIP к формату конкурентного ИХА путем оптимизации захвата, обнаружения, реагентов образца и условий иммунохроматографического анализа. Мы также установили кривую доза-эффект, а также оценили временные характеристики сигнала, точность и повторяемость формата быстрого анализа IAIP. Основанный

на ридере анализ данных результатов теста первоначально был приспособлен к использованию с ридером тест-полосок Qiagen. После этих первоначальных тестов мы приступили к оптимизации тест-полосок и условий анализа, а также протестировали несколько портативных ридеров, которые доступны и подходят для наших тест-полосок.

с) Очищенный IAIP и моноклональные антитела против IAIP (мкАт 69.26): Оба реагента являются ключевыми компонентами, используемыми в конкурентном формате анализа. Мы разработали и оптимизировали масштабируемый способ биопроцесса для выделения IAIP из плазмы человека, что обеспечивает высокий выход и высокую чистоту. Гибридомные клетки выращивали в масштабируемых культуральных колбах CELLline (Integra Bioscience) для крупномасштабного производства антител *in vitro*.

IgG выделяли из супернатанта гибридомы с помощью аффинной хроматографии на основе белка А.

d) Тест-полоска: Было подготовлено несколько опытных партий полосок и выбранная формула представляет собой стабильную платформу для количественного измерения IAIP в плазме крови человека: 1) Мембрану для нанесения образца: целлюлозную мембрану с буфером и сурфактантом; 2) мембрану для конъюгата: мембрану из стекловолокна с конъюгатом анти-IAIP (мкАт 69.26)-золото и конъюгатом кроличий IgG - золота (контрольная линия); 3) нитроцеллюлозу: Нитроцеллюлоза быстрого потока (Millipore HF090) с нанесенным на полосу IAIP (тестовая линия) и нанесенным на полосу козьим антикроличьим IgG (терминальная абсорбирующая мембрана контрольной линии: целлюлозная мембрана (без состава)).

e) Образец: К полоске добавляли небольшой объем плазмы (15 мкл разведенных образцов 1:5), затем 115 мкл буфера для проталкивания образца через полоску. Чейз буфер был оптимизирован: 2 mM Трис pH 8,0+100 mM NaCl+0,5% Brij (эфир полиоксиэтилена) + 0,05% Твин-20+1,0% фетальной телячьей сыворотки. Поверхностно активное вещество Brij добавляли в буфер для облегчения быстрого удаления конъюгата из верхних участков полоски.

f) Процедурное время: Полоски использовали с образцами плазмы или калибраторами IAIP (в трех различных концентрациях), а затем количественно определяли при помощи ридера Qiagen через 10, 15, 20, 25, 30, 45 и 60 минут после добавления образца. Полоска проходила примерно за 7 мин (т.е. нитроцеллюлоза очищалась от постороннего золота) и могла быть прочитана в любое время после этого. Мы обнаружили, что через 15 мин сигналы значительно не изменились. Таким образом, мы одинаково считывали полоски через 15 мин после добавления образцов.

g) Калибраторы и контроли: В качестве калибратора и внутреннего стандартного контроля использовали плазму крови человека (Центр крови штата Род-Айленд) с известным значением IAIP по результатам ИФА. Различные дозы были созданы путем разбавления плазмы 1% FCS-содержащим буфером. Используя портативный тест-ридер Qiagen (ESEQuant LFR), мы определили стандартную кривую в диапазоне от 17,5 до 1100 мкг/мл (используя разведение образца 1:5). Воспроизводимость калибровочных кривых по суткам была проверена путем повторения и запуска набора калибраторов до 13 раз в разное время суток в течение 5 суток. Результаты, показаны на фиг. 19. Среднее значение и СО каждого из значений были нанесены на график. Результаты демонстрируют, что тест продемонстрировал плотный разброс в течение 5-суточного периода с отличным коэффициентом дисперсии (CV менее 15%).

h) Ридеры тест-полосок и программное обеспечение: Поскольку наш экспресс-тест IAIP предназначен для количественного анализа, мы тщательно отобрали ридер для захвата сигнала, генерируемого тест-полосками. В продаже имеются различные типы ридеров. Выбор ридера основывался на функциях и технических характеристиках, таких как конструкция, эргономика и надежность программного обеспечения. Поскольку это важная часть экспресс-теста, мы протестировали три различных ридера с различными технологиями и функциями для полосок экспресс-теста IAIP: 1) портативный настольный ридер для тест-полосок (ESEQuant LFR от Qiagen); 2) ридер на основе портативного КПК Detekt RDS 1500 Pro (Detekt Biomedical, Остин, штат Техас) и 3) считывающая система на основе смартфона/планшета (ридер iCalq- iCalq, Солт-Лейк-Сити, штат Юта). Мы обнаружили, что ридер Detekt генерировал лучшую линейную кривую в диапазоне от 5 до 700 мкг/мл, чем другие тестируемые ридеры.

Определение внутрилабораторной и промежуточной прецизионности оптимизированного анализа.

Характеристики внутрилабораторной и промежуточной прецизионности экспресс-теста были определены с использованием собранных образцов крови (n=6), которые использовали повторно в течение 6 суток подряд. Результаты были прочитаны впоследствии с использованием трех различных портативных и ручных ридеров, а коэффициент вариации (CV) рассчитывали из результатов, полученных от каждого отдельного образца. CV для экспресс-теста IAIP с применением ридера ESEQuant варьировался от 4 до 16%, в среднем 13%, в то время как ридер Detekt продемонстрировал среднее CV в 10% (в диапазоне от 5-16%) и ридер iCalQ на основе смартфона демонстрировал в среднем CV 16% (в диапазоне от 10-23%). Ридер Detekt выполнял функции лучше с относительно низкой CV, чем два других тестируемых ридера. Для того, чтобы оценить внутрилабораторную и промежуточную прецизионность теста, мы провели 8 образцов плазмы и анализировали уровни IAIP на основе оптимизированных протоколов. Сигнал, полученный из каждого образца был прочитан три раза на различных ридерах и значения IAIP рассчитывали индивидуально на основе установленных стандартных кривых. Впоследствии, CV определяли из трех повторных чтений и был установлен диапазон от 2 до 8% со средним CV 5% для всех трех тестируемых

ридеров.

Оценка эффективности быстрого анализа в плазме младенцев.

Используя образцы, собранные от младенцев в больнице Women & Infants' Hospital, мы провели анализ IAIP на основе оптимизированных условий для тестовых полосок IAIP, описанных выше. Полученные сигналы считывали последовательно с помощью трех различных ридеров, и результаты рассчитывали на основе соответствующей стандартной кривой ридеров. Результаты экспресс-тестов были сопоставлены с результатами, полученными с помощью установленного конкурентного анализа ИФА и значения каждого отдельного образца использовали при построении графика сравнительно с результатами экспресс-теста (фиг. 20А-20С). Результаты показали отличную корреляцию между 6 ч конкурентного ИФА и результатами экспресс-теста конкурентного ИХА, которые были получены в течение 15 минут с помощью ридера ESEQuant (Коэффициент корреляции R^2 0,832, $n=311$) и ридера Detekt ($R^2=0,84$, $n=339$). Тем не менее, ридер iCalQ на основе смартфона воспроизвел результаты испытаний, которые были менее сопоставимы с результатами ИФА, особенно в образцах, содержащих высокий уровень IAIP (>600 мкг/мл).

Таким образом, мы успешно изменили 6 часовой лабораторный конкурентный ИФА в экспресс-тест IAIP на месте оказания медицинской помощи, который способен измерять циркулирующий IAIP в крови (в пределах от 10-800 мкг/мл) безошибочно (коэффициент корреляции $R^2>0,8$ по сравнению с результатами ИФА) в течение 15 минут с приемлемой внутрилабораторной и промежуточной прецизионностью (менее 20% CV). Мы подтвердили, что уровень IAIP крови является полезным прогностическим маркером не только для НС, но и для НЭК с высокой чувствительностью (100%) и высокой специфичностью (88%). Тест IAIP является более специфическим в обнаружении НЭК, чем тест СРБ и уровень IAIP также полезен для установления отличий между пациентами с НЭК и СПК.

Принимая во внимания успешную адаптации конкурентного анализа относительно формата ИХА, мы ожидаем, что анализ IAIP на основе "сэндвич"-ИФА, описанный в данном документе (например, как показано на фиг. 3А) также может быть адаптирован к формату ИХА. Быстрое определение количество IAIP может привести к раннему выявлению субъектов (например, субъектов-людей, таких, как младенцы, дети, подростки и взрослые), имеющих или подверженных риску развития воспалительного заболевания или состояния, или инфекции (например, сепсис, НЭК, бактериальная инфекция, или другое заболевание, или патологическое состояние) и своевременному началу оптимального лечения.

Пример 11. Твердофазный анализ гиалуроновая кислота-IAIP.

Гиалуроновую кислоту, соль натрия (Sigma-Aldrich), растворяли в dH_2O (стоковая концентрации 1 мг/мл) и дополнительно разбавляли в 20 мМ буфере $NaHCO_3$ / Na_2CO_3 при pH 9,0. Пятьдесят, 100 и Greiner BioOne, 200 нг гиалуроновой кислоты на лунку иммобилизовали в 96-луночном микропланшете (Microlopin 600) при 37°C в течение 120 минут. После блокирования с помощью 5% обезжиренного сухого молока в TBS-T (20 мМ Трис-солевым буферном растворе при pH 7,3+0,05% твина-20 (об./об.)) при 37°C в течение 60 минут и 3 промывок TBS-T, серийно разведенный раствор, содержащий IAIP (плазмы крови человека и высокоочищенного IAIP в TBS) добавляли в микропланшет и инкубировали при 37°C в течение 60 минут. Человеческую плазму получали путем криопреципитации свежесамороженной плазмы, полученной из местного банка крови. В этом эксперименте использовали криосупернатант с концентрацией IAIP 250 мкг/мл. Начальная концентрация очищенного IAIP была 1 мг/мл. Микропланшет затем 3 раза промывали TBS-T, и добавляли биотин-конъюгированное мкАт 69.26 (моноклональное антитело против человеческого IAIP) в разведении в TBS 1:1000 и инкубировали при 37°C в течение 30 минут.

После трех дополнительных промывок с TBS-T, добавляли разбавленную до 1:5000 в TBS пероксидазу хрена (ПХ), конъюгированную со стрептавидином (Inova Bioscience), и инкубировали при 37°C в течение 30 минут. После промывки 3 раза в TBS-T, 50 мкл Enhanced K-Blue TMB Enhanced K-Blue TMB Substrate (Neogen) добавляли в каждую лунку и реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М соляной кислоты (HCl). Изменение цвета считывали с использованием спектрофотометра (ридера для микропланшетов Molecular Devices SpectraMax Plus) при длине волны 650 нм, и строили стандартную кривую для плазмы крови человека или очищенного IAIP при 50, 100 и 200 нг/лунку иммобилизованную гиалуроновой кислотой (фиг. 21А-21В). Эти данные показывают, что IAIP может быть количественно измерен в биологических смесях путем захвата сложной молекулы IAIP с использованием гиалуроновой кислоты и обнаружением захваченного IAIP с использованием моноклонального антитела, специфичного для легкой цепи IAIP (например, мкАт 69.26). Как показано на фиг. 21А-21В, стандартная кривая может быть оптимизирована и адаптирована с использованием очищенного IAIP или плазмы крови человека с известным количеством IAIP. Следовательно, этот анализ может быть использован для установления неизвестного количества IAIP в биологическом образце от субъекта. К этому способу может быть использован альтернативный подход, в котором IAIP-специфическое моноклональное антитело используется для захвата IAIP и гиалуроновая кислота, меченная биотином используется в качестве лиганда для обнаружения связанного IAIP, подобно способам, используемым в примерах 1 и 2.

Другие варианты осуществления изобретения

Все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые выше в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же мере, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки во всей их полноте. Предварительные заявки США №№ 62/490003 и 62/614333 конкретно включены в данный документ в полном объеме. Различные модификации и вариации описанных способов, фармацевтических композиций и наборов согласно изобретению будут очевидны для специалистов в данной области техники без отступления от объема и сущности заявленного изобретения. Хотя раскрытие было описано в связи с конкретными вариантами осуществления, следует понимать, что оно способно к дальнейшим модификациям и что заявленное изобретение не должно быть чрезмерно ограничено такими конкретными вариантами осуществления.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ количественного определения интактного интер-альфа ингибиторного белка (IAIP) в образце, полученном от субъекта, включающий:

а) приведение в контакт образца со связывающим агентом для получения комплекса IAIP-связывающий агент, причем связывающий агент связан с подложкой, и где связывающий агент включает антитело, которое специфически связывается с бикунинном;

б) приведение в контакт комплекса IAIP-связывающий агент с детектирующим агентом, где детектирующий агент включает лиганд IAIP, который связывается с по меньшей мере одной тяжелой цепью IAIP, и где лиганд IAIP выбирают из группы, стоящей из эндотоксина (ЛПС), гепарина, гистона, гиалуроновой кислоты, витронектина, фибронектина, ламинина, тенасцина С, агрекана, фактора фон Виллебранда, пентраксина-3 (РТХ3), ФНО-стимулированного гена-6 (TSG-6), фактора IX, компонента комплекса, фактора XIIIa и тканевой трансглутаминазы;

с) определение количества детектирующего агента, связанного с комплексом IAIP-связывающий агент; и

д) сравнения результатов, полученных на стадии с), с известной эталонной концентрацией, где образец представляет собой кровь, плазму, сыворотку, мочу, спинномозговую жидкость, синовиальную жидкость, амниотическую жидкость, интерстициальную жидкость, фолликулярную жидкость, перитонеальную жидкость, жидкость бронхоальвеолярного лаважа, грудное молоко, мокроту, лимфу, желчь или гомогенат ткани; и

где интактный IAIP включает бикунин и по меньшей мере одну тяжелую цепь IAIP, выбранную из группы, состоящей из H1, H2 и H3;

таким образом осуществляя количественное определение интактного IAIP в образце.

2. Способ по п.1, где по меньшей мере одно из а), б) или с) осуществляют при pH примерно от 7,0 до примерно 3,5.

3. Способ по п.2, где pH составляет примерно от 5,0 до примерно 3,5.

4. Способ по п.3, где pH составляет примерно 4,0.

5. Способ по п.1, дополнительно включающий до а) добавляют двухвалентные катионы, в образец, и где двухвалентные катионы представляют собой Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} или Fe^{2+} .

6. Способ по п.1, где субъект представляет собой субъект, являющийся человеком.

7. Способ согласно любому из предыдущих пунктов, где лиганд IAIP представляет собой гепарин, гиалуроновую кислоту или гистон.

8. Способ согласно любому из предыдущих пунктов, где лиганд IAIP представляет собой гепарин.

9. Способ согласно любому из предыдущих пунктов, где детектирующий агент дополнительно включает метку, и где метка представляет собой биотин, наночастицу золота, магнитную частицу, латексную частицу, фермент, субстрат ферментов, флуоресцентный краситель, люминесцентное соединение или радиоактивную метку.

10. Способ по п.9, где метка представляет собой фермент, и где фермент представляет собой пероксидазу хрена.

11. Способ по п.9, где метка включает наночастицу золота.

12. Способ по любому из пп.9-11, где детектирующий агент включает биотин и одно из стрептавидина или авидина.

13. Способ по п.9, где фермент представляет собой пероксидазу хрена (ПХ), щелочную фосфатазу (ЩФ), β -галактозидазу, ацетилхолинэстеразу и каталазу.

14. Способ по п.9, где субстрат ферментов представляет собой п-нитрофенилфосфат (PNPP), 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфониевая кислота) двуаммониевая соль (ABTS), о-фенилендиамин дигидрохлорид (OPD), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB) или 3,3'-диаминобензидин (DAB).

15. Способ согласно любому из предыдущих пунктов, где образец представляет собой кровь, спинномозговую жидкость, жидкость бронхоальвеолярного лаважа, синовиальную жидкость или мокроту.

16. Способ согласно любому из предыдущих пунктов, где образец представляет собой кровь.

17. Способ согласно любому из предыдущих пунктов, где образец представляет собой плазму или сыворотку.

18. Способ по п.9, где метка представляет собой наночастицу золота, и лиганд IAIP представляет собой гепарин.

19. Способ согласно любому из предыдущих пунктов, где подложка представляет собой планшет, частицу, наночастицу, смолу, мембрану, биочип, контейнер, тест-полоску или гранулу.

20. Способ по п.19, где подложка представляет собой тест-полоску.

21. Способ по п.20, где детектирующий агент добавляют к тест-полоске до, после или одновременно с образцом.

22. Набор для количественного определения интактного IAIP в образце, причем набор содержит: подложку,

связывающий агент, содержащий антитело, которое специфически связывается с бикунинном, где связывающий агент связан с подложкой,

детектирующий агент, содержащий метку и лиганд IAIP, который связывается с по меньшей мере одной тяжелой цепью IAIP, выбранной из группы, состоящей из H1, H2 и H3, где лиганд IAIP выбирают из группы, стоящей из эндотоксина (ЛПС), гепарина, гистона, гиалуроновой кислоты, витронектина, фибронектина, ламинина, тенасцина С, агреккана, фактора фон Виллебранда, пентраксина-3 (PTX3), ФНО-стимулированного гена-6 (TSG-6), фактора IX, компонента комплемента, фактора XIIIa и тканевой транскламиназы; и

инструкции для количественного определения IAIP в образце,

где образец представляет собой кровь, плазму, сыворотку, мочу, спинномозговую жидкость, синовиальную жидкость, амниотическую жидкость, интерстициальную жидкость, фолликулярную жидкость, перитонеальную жидкость, жидкость бронхоальвеолярного лаважа, грудное молоко, мокроту, лимфу, желчь или гомогенат ткани;

где инфарктный IAIP включает бикунин и по меньшей мере одну тяжелую цепь IAIP, выбранную из группы, состоящей из H1, H2 и H3.

23. Набор по п.22, где набор дополнительно содержит одно или более из следующего: промывочный буфер, блокирующий агент и субстрат для обнаружения метки.

24. Набор по п.22 или 23, где лиганд IAIP представляет собой гепарин, гиалуроновую кислоту или гистон.

25. Набор по п.24, где лиганд IAIP представляет собой гепарин.

26. Набор по любому из пп.22-25, где метка представляет собой биотин, наночастицу золота, магнитную частицу, латексную частицу, фермент, субстрат ферментов, флуоресцентный краситель, люминесцентное соединение или радиоактивную метку.

27. Набор по п.26, где метка представляет собой фермент, и где фермент представляет собой пероксидазу хрена.

28. Набор по п.26, где метка включает наночастицу золота.

29. Набор по любому из пп.26-28, где детектирующий агент включает биотин и одно из стрептавидина или авидина.

30. Набор по п.26, где фермент представляет собой пероксидазу хрена (ПХ), щелочную фосфатазу (ЩФ), β -галактозидазу, ацетилхолинэстеразу и каталазу.

31. Набор по п.26, где субстрат ферментов представляет собой PNPP, ABTS, OPD, TMB или DAB.

32. Набор по любому из пп.22-31, где образец представляет собой кровь, спинномозговую жидкость, жидкость бронхоальвеолярного лаважа, синовиальную жидкость или мокроту.

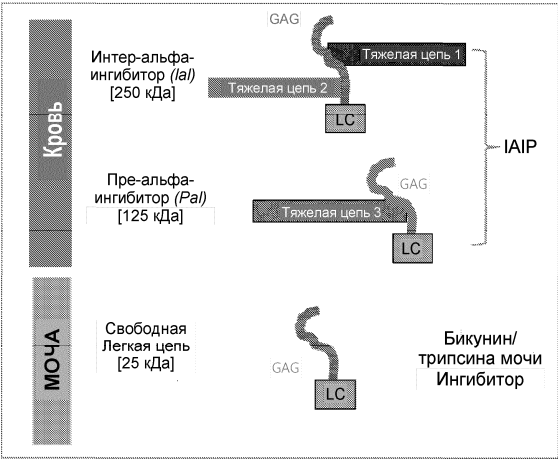
33. Набор по любому из пп.22-32, где образец представляет собой кровь.

34. Набор по любому из пп.22-31, где кровь представляет собой плазму или сыворотку.

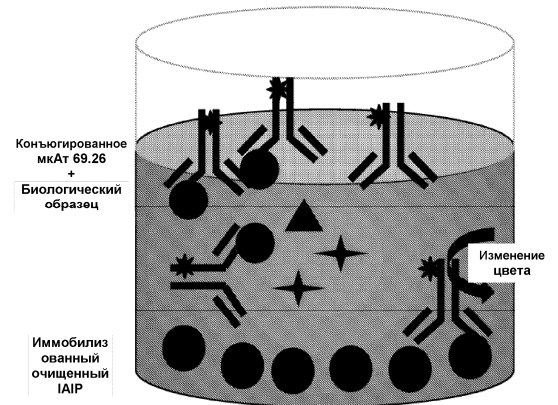
35. Набор по п.26, где метка представляет собой наночастицу золота, и лиганд IAIP представляет собой гепарин.

36. Набор по любому из пп.22-35, где подложка представляет собой планшет, частицу, наночастицу, смолу, мембрану, биочип, контейнер, тест-полоску или гранулу.

37. Набор по п.36, где подложка представляет собой тест-полоску.

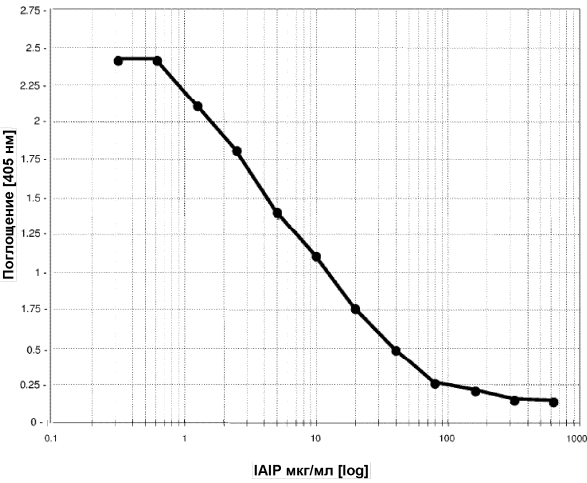


Фиг. 1

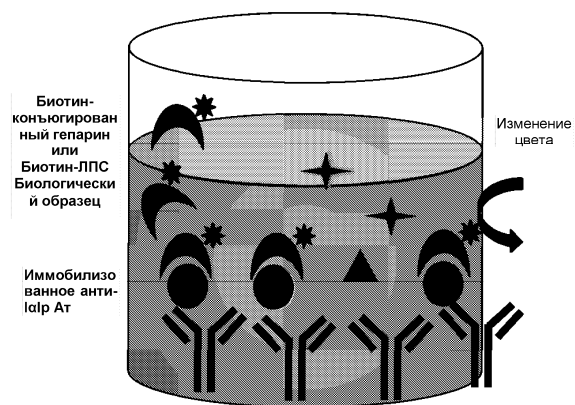


Фиг. 2А

Стандартная кривая

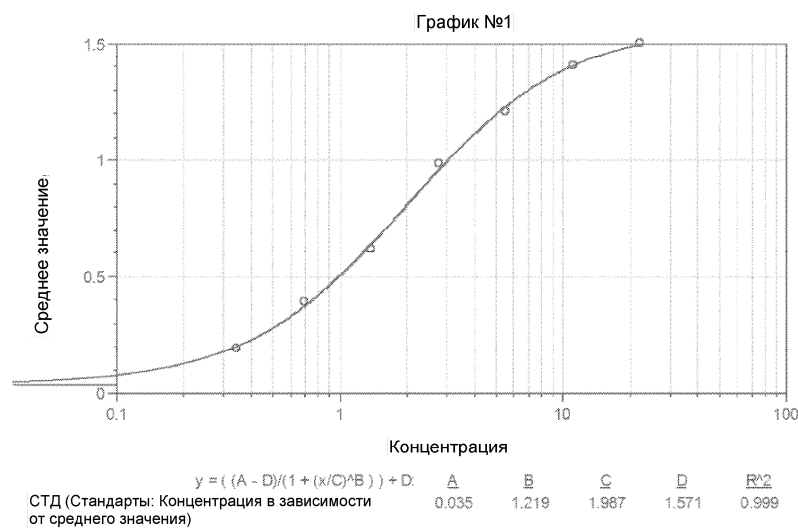


Фиг. 2В



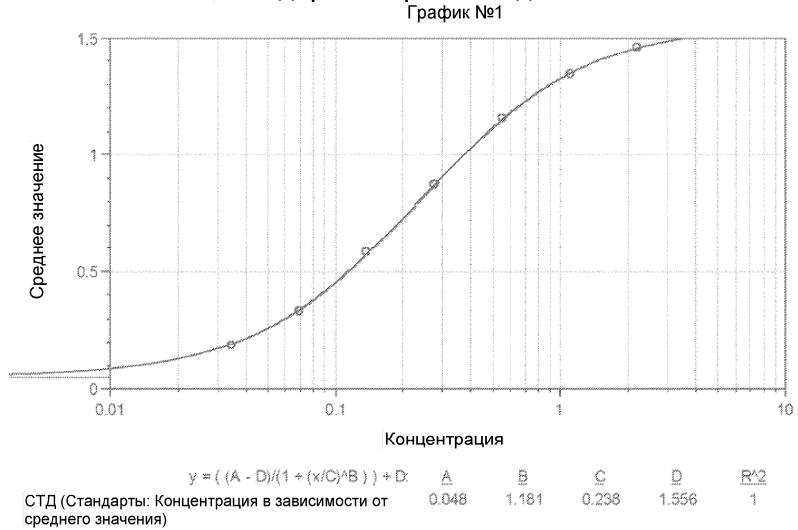
Фиг. 3А

Стандартная кривая гепарин-IAIP



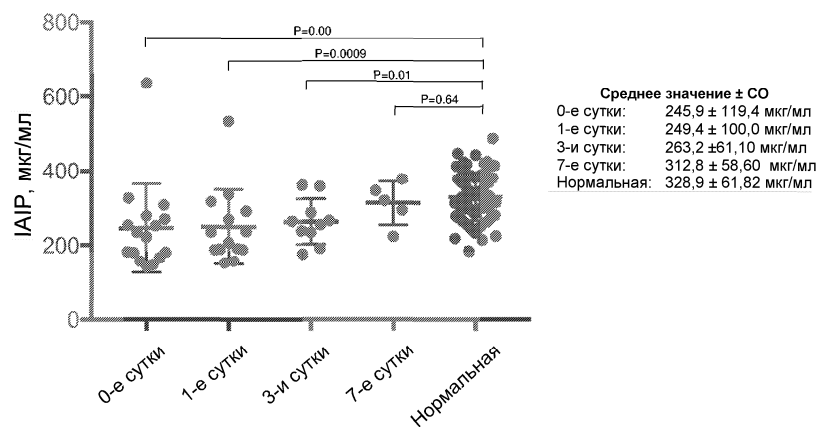
Фиг. 3В

Стандартная кривая эндотоксин-IAIP

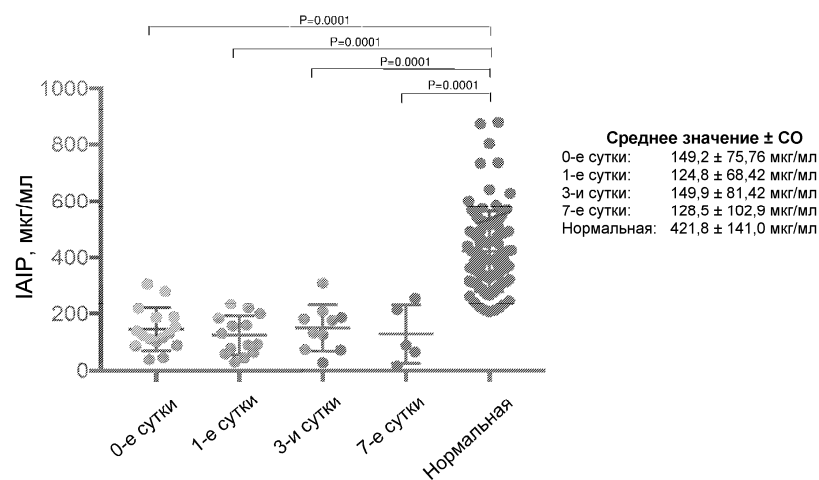


Фиг. 3С

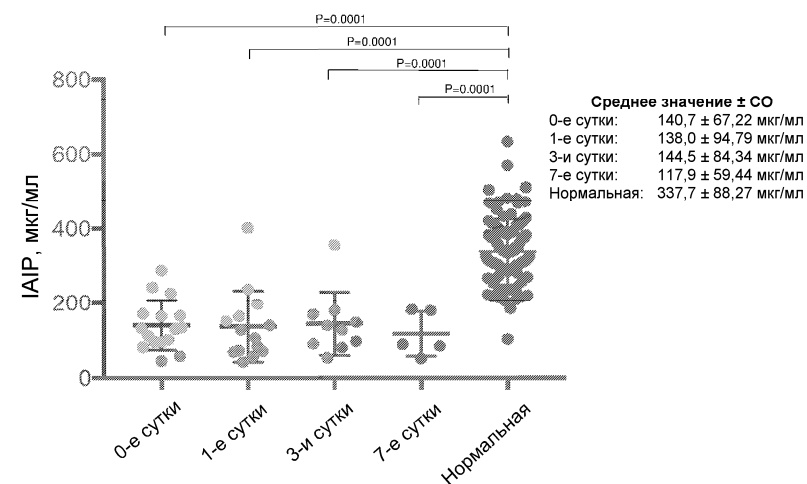
045401



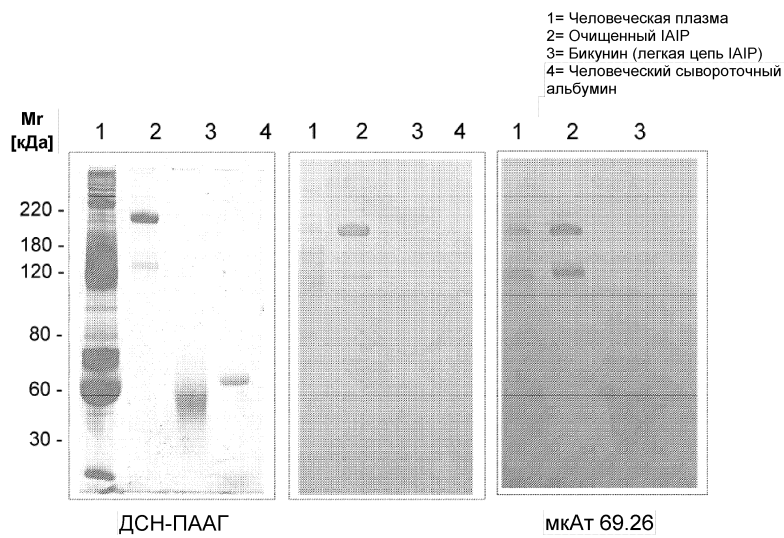
Фиг. 4



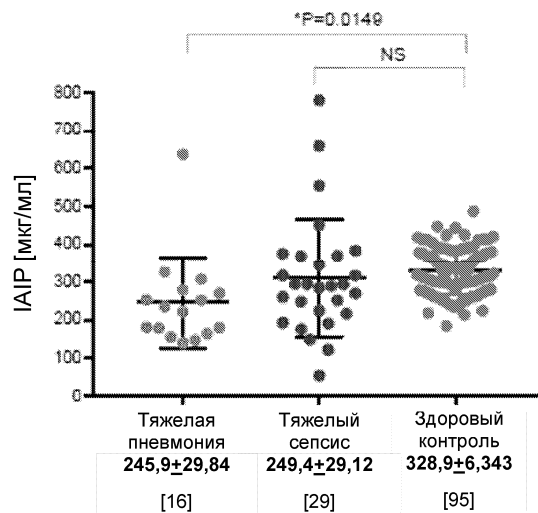
Фиг. 5



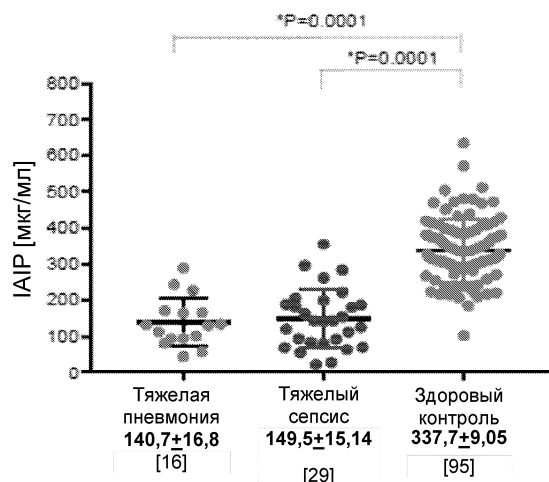
Фиг. 6



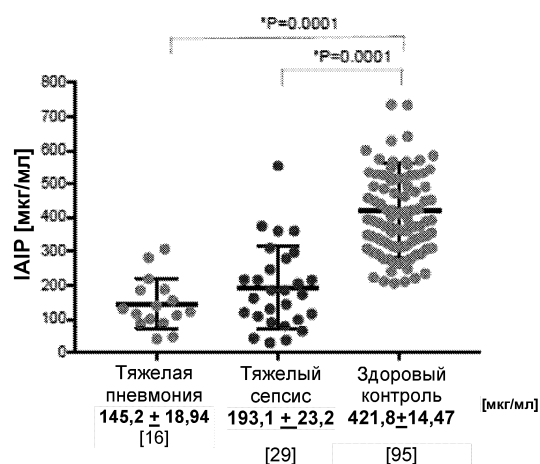
Биотинилированный гепарин
Фиг. 7



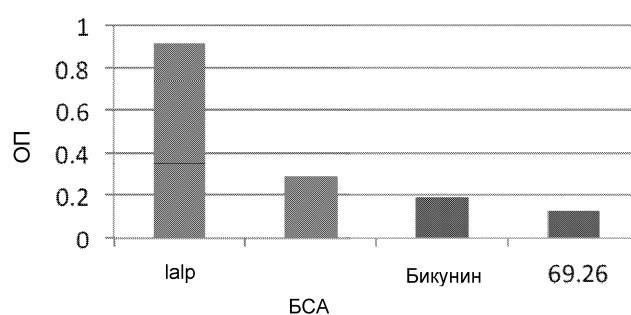
Фиг. 8А



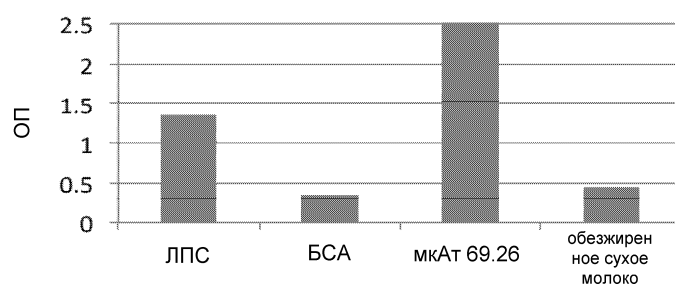
Фиг. 8В



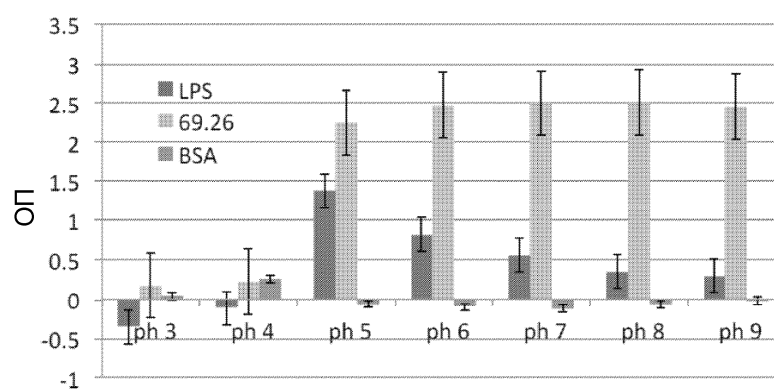
Фиг. 8С



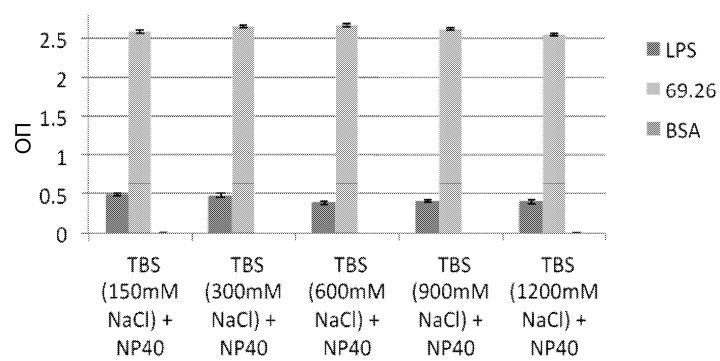
Фиг. 9



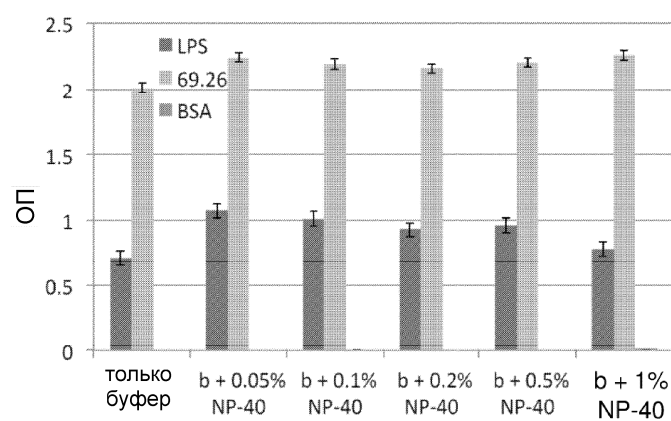
Фиг. 10



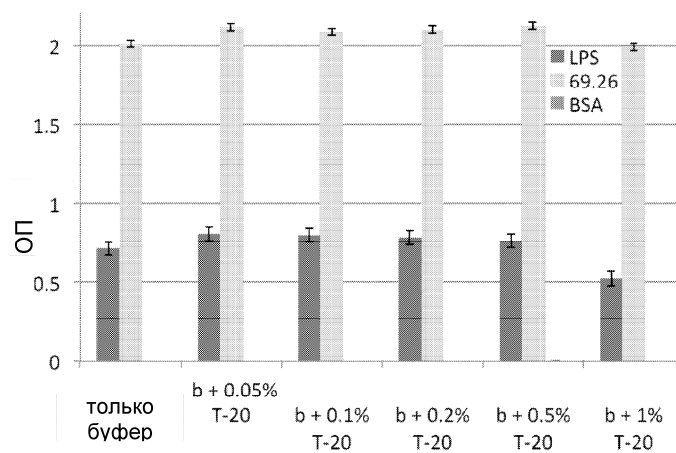
Фиг. 11



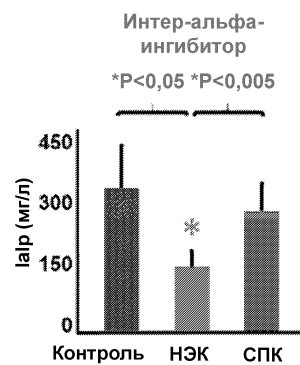
Фиг. 12



Фиг. 13

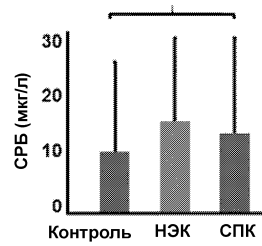


Фиг. 14



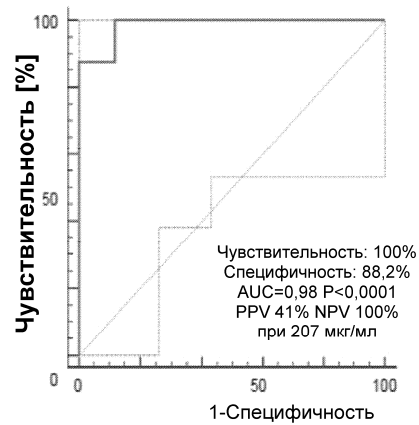
Фиг. 15А

С-реактивный белок
P>0,05



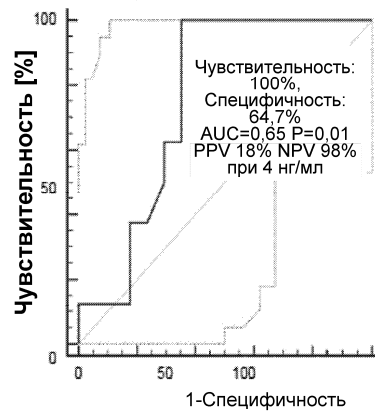
Фиг. 15В

Интер-альфа-ингибитор

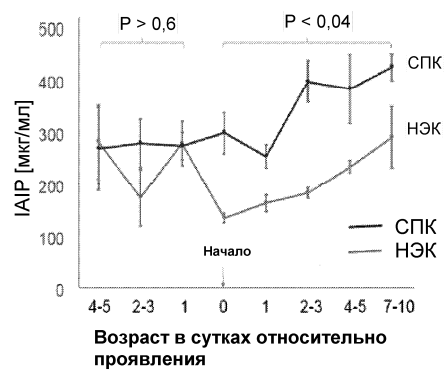


Фиг. 16А

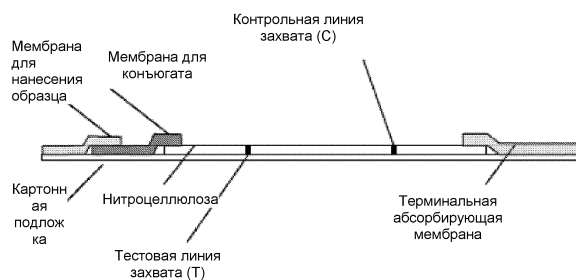
С-реактивный белок



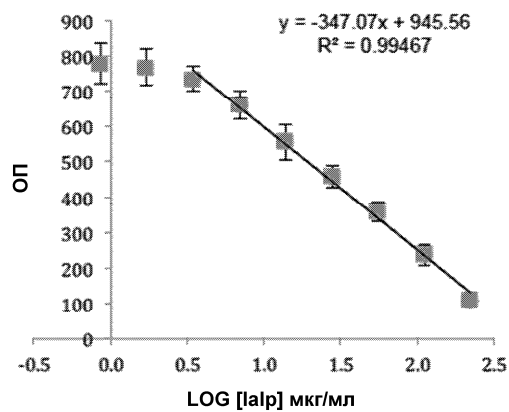
Фиг. 16В



Фиг. 17

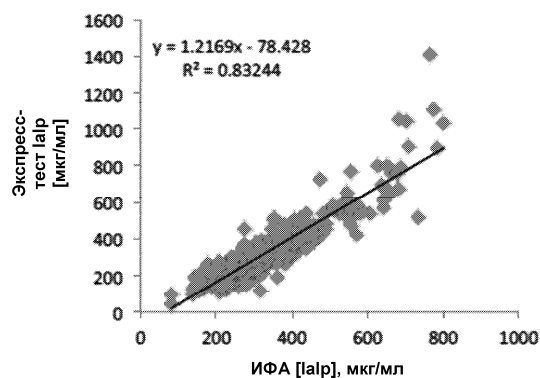


Фиг. 18



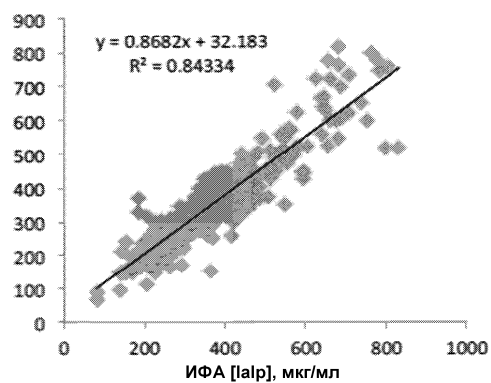
Фиг. 19

Экспресс-тест при помощи
ридера ESEQuant
относительно ИФА



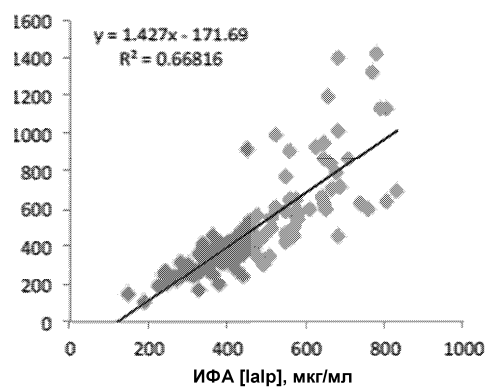
Фиг. 20А

Экспресс-тест при помощи
ридера Detekt относительно
ИФА

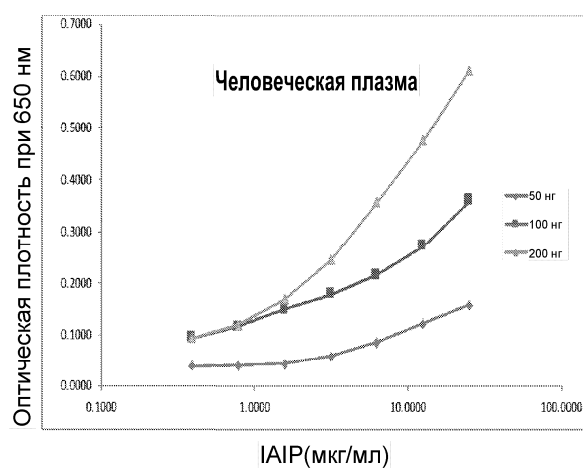


Фиг. 20В

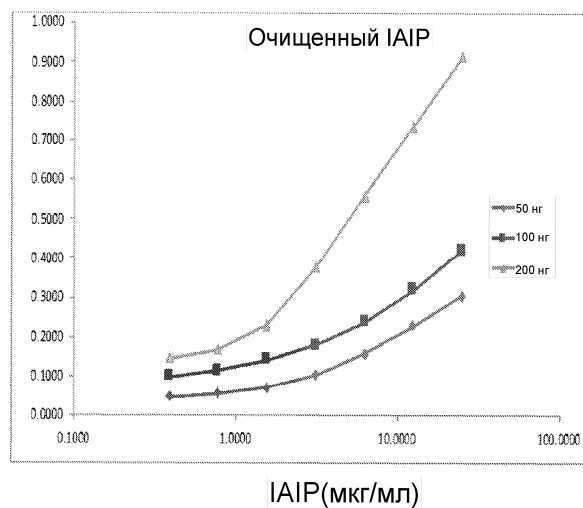
Экспресс-тест при помощи
ридера iCalq относительно
ИФА



Фиг. 20С



Фиг. 21А



Фиг. 21В

