



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108780088 A

(43)申请公布日 2018.11.09

(21)申请号 201680078281.X

(22)申请日 2016.11.04

(30)优先权数据

62/252,266 2015.11.06 US

62/373,307 2016.08.10 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.07.06

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/060674 2016.11.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/079653 EN 2017.05.11

(71)申请人 维蒂卡实验室公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 J·埃斯特鲁奇 G·汉森

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

代理人 胡志君 黄革生

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/563(2006.01)

G01N 33/564(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书4页 说明书67页
序列表31页

(54)发明名称

在伴侣动物中检测炎症标志物和治疗炎性病的方法

(57)摘要

本发明提供了准确检测和测量来自伴侣动物的生物样品中针对特定抗原的内源性抗体(例如内源性IgA)的水平的方法和系统,其可用于诊断伴侣动物例如狗或猫的炎性疾病,包括肠病(IBD)。这类方法和系统通过使用非侵入性手段鉴定来自患者的样品是否与炎性疾病相关,从而方便地提供对指导治疗决定有用的信息。

1. 用于检测从伴侣动物患者获得的样品中与炎症相关的一种或多种内源性抗体的存在和/或水平的方法,其中所述内源性抗体选自以下一种或多种:

- i) 钙卫蛋白的自身抗体,
- ii) β -整联蛋白的自身抗体,
- iii) 乳铁蛋白的自身抗体,
- iv) C-反应蛋白的自身抗体,
- v) 对多形核白细胞 (PMN或粒细胞,包括嗜中性粒细胞)的内源性抗体,和/或
- vi) 对胃肠道中发现的微生物的内源性抗体,

所述方法包括

使一种或多种抗原与所述样品接触,其中所述一种或多种抗原是目的内源性抗体特异的,并且其中所述一种或多种抗原与基质或可检测标记结合,和

检测所述一种或多种与炎症相关的内源性抗体与一种或多种抗原的结合。

2. 权利要求1的方法,进一步包括将所述样品分类为炎症样品或非炎症样品,其中与炎症相关的一种或多种内源性抗体的存在或水平单独地或组合地与炎症的存在相关。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,包括使用标记抗体的步骤,所述标记抗体特异性结合来自患者物种的免疫球蛋白,以检测与抗原结合的、炎症相关的一种或多种内源性抗体。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述患者是狗或猫。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述样品是全血、血清或血浆。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中一种或多种与炎症相关的内源性抗体是IgA抗体。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其是选自酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、免疫组织化学测定法和免疫荧光测定法的免疫测定法。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述一种或多种抗原与一种或多种基质结合,其中所述基质包含一种或多种微孔板,由此希望检测与不同抗原的结合时,所述不同的抗原在不同的微孔板上或在相同微孔板的不同孔中。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述一种或多种抗原与一种或多种基质结合,包括以下步骤:

- a) 将一种或多种抗原粘附到它们各自的基质上,
- b) 用蛋白质例如牛血清白蛋白封闭基质的任何未包被表面,
- c) 将抗原暴露于样品以允许形成抗原-抗体复合物,
- d) 将由此形成的抗原-抗体复合物暴露于结合患者物种的免疫球蛋白的标记抗体,
- e) 检测标记抗体与抗原-抗体复合物的结合。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述患者是狗或猫,其中所述炎症是与IBD相关的炎症,并且其中所述一种或多种待检测的内源性抗体包含

a) 针对来自胃肠道中发现的微生物的抗原的至少一种内源性抗体,选自抗外膜蛋白C (ACA) 抗体、抗鞭毛蛋白抗体 (AFA) 和它们的组合;和

b) 至少一种自身抗体,选自钙卫蛋白的自身抗体、 β -整联蛋白的自身抗体和它们的组合。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述一种或多种内源性抗体包含至少一种抗体,所述至少一种抗体选自抗PMN抗体、抗酵母抗体、抗微生物抗体和它们的组合。

12. 权利要求10的方法,其中所述一种或多种内源性抗体包含一种或多种

a) 抗PMN抗体,选自抗PMN抗体(APMNA)、核周抗PMN抗体(pAPMNA)和它们的组合;

b) 抗酵母抗体,选自抗酵母免疫球蛋白A(AYA-IgA)、抗酵母免疫球蛋白G(AYA-IgG)、抗酵母免疫球蛋白M(AYA-IgM)和它们的组合;

c) 抗微生物抗体,选自抗外膜蛋白C(ACA)抗体、抗鞭毛蛋白抗体(AFA)和它们的组合。

13. 权利要求11的方法,其中所述一种或多种内源性抗体包含抗鞭毛蛋白抗体(AFA),所述抗鞭毛蛋白抗体结合细菌鞭毛蛋白或其抗原片段上的一个或多个表位,(i)其由下述基因编码,所述基因能够被选自SEQ ID NO1、3、5和7中的一个或多个的第一引物和选自SEQ ID NO 2、4、6和8中的一个或多个的第二引物扩增,或(ii)其包含选自SEQ ID NO 9-13的序列中的至少10个(例如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸。

14. 权利要求11或12的方法,其中所述一种或多种内源性抗体包含抗外膜蛋白C抗体(ACA),所述抗外膜蛋白C抗体结合细菌外膜蛋白C或其抗原片段上的一个或多个表位,(i)其由能够通过对应于SEQ ID NO 14和15的引物扩增的基因编码,或(ii)其包含选自SEQ ID NO 16、17和18的序列中的至少10个(例如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸。

15. 权利要求9-13中任一项所述的方法,其中所述一种或多种内源性抗体选自APMNA、pAPMNA、AYA-IgA、AYA-IgG、ACA或AFA。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述一种或多种内源性抗体选自一种或多种炎症相关的自身抗体,例如,选自钙卫蛋白的自身抗体、 β -整联蛋白的自身抗体、乳铁蛋白的自身抗体和C-反应蛋白的自身抗体中的一种或多种。

17. 权利要求16的方法,其中炎症相关的自身抗体是钙卫蛋白的自身抗体或 β -整联蛋白的自身抗体。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述患者是犬科动物,并且所述一种或多种内源性抗体是

(i) 针对细菌外膜蛋白(OmpC)的内源性IgA,和

(ii) 犬科钙卫蛋白的内源性IgA,

所述方法包括以下步骤:

a) 使与基质结合的第一抗原和与基质结合的第二抗原与样品接触,和

b) 使用针对犬科IgA的标记抗体检测所述一种或多种IgA标志物与所述一种或多种抗原的结合,

其中,

(a) 第一抗原包含一种或多种来自细菌OmpC的抗原性序列;和

(b) 第二抗原包含来自犬科钙卫蛋白的一种或多种抗原性序列。

19. 如权利要求18所述的方法,其中,

a) 第一抗原包含选自SEQ ID NO 16、17和18的序列中的至少20个连续氨基酸,例如SEQ ID NO:35的融合蛋白,和/或

b) 第二抗原包含选自SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22的序列中的至少20个连续氨基酸,例如,其中第二抗原是融合蛋白,所述融合蛋白包含钙卫蛋白S100A8单体区

域和钙卫蛋白S100A9单体区域,其中所述区域通过接头序列连接,例如,其中所述钙卫蛋白S100A8单体区域包含来自SEQ ID NO:21序列中的至少20个氨基酸残基,且钙卫蛋白S100A9单体区域包含来自SEQ ID NO:22的序列中的至少20个氨基酸残基,所述融合蛋白是例如SEQ ID NO:19的融合蛋白,和

c) 第一和第二抗原各自任选地包含聚组氨酸标签。

20. 权利要求18或19的方法,其中用于第一和第二抗原的基质包含一种或多种微孔板,其中第一抗原和第二抗原在不同的微孔板上或同一微孔板的不同孔中。

21. 如权利要求18-20中任一项所述的方法,包括步骤

a) 将第一和第二抗原粘附到它们各自的基质上,

b) 用蛋白质封闭基质的任何未包被表面,

c) 将抗原暴露于血清样品中以允许形成抗原-抗体复合物,

d) 将由此形成的抗原-抗体复合物暴露于针对犬科IgA的标记抗体,

e) 检测针对犬科IgA的标记抗体与抗原-抗体复合物的结合。

22. 权利要求18-21中任一项的方法,其进一步包括:将来自犬科患者的血清分类为与炎性肠病(IBD)“一致”,或与IBD“不一致”,其中与第一抗原结合的血清中IgA的存在和/或水平与第二抗原结合的血清中IgA的存在和/或水平单独地或组合地与犬科患者中IBD的存在相关。

23. 治疗伴侣动物患者(例如狗或猫)中的IBD的方法,包括根据前述权利要求中任一项所述的方法诊断患者并施与所述患者治疗有效量的药物,所述药物用于治疗与IBD相关的一种或多种症状,例如,药物选自兽医已知的药物,包括氨基水杨酸盐、皮质类固醇、硫嘌呤、甲氨蝶呤、单克隆抗体、其游离碱、其药学上可接受的盐、其衍生物、其类似物,和它们的组合。

24. 分离的肽,包含细菌鞭毛蛋白或其片段,所述细菌鞭毛蛋白或其片段包含选自SEQ ID NO 9-13的序列中的至少10个(例如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸,例如,其中所述细菌鞭毛蛋白或其片段与标记、纯化标签、固体基质或另一细菌鞭毛蛋白或其片段中的一种或多种结合,例如,其中所述细菌鞭毛蛋白或其片段任选地与聚蛋白组氨酸标签结合。

25. 分离的肽,包含细菌外膜蛋白C或其片段,所述细菌外膜蛋白C或其片段包含选自SEQ ID NO 16、17和18的序列中的至少10个(例如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸,例如,其中所述细菌外膜蛋白C或其片段与标记、纯化标签、固体基质或另一细菌外膜蛋白C或其片段中的一种或多种结合,例如,其中所述细菌外膜蛋白C或其片段任选地与聚组氨酸标签结合。

26. 分离的肽,包含伴侣动物钙卫蛋白或其抗原片段,其包含来自野生型钙卫蛋白、例如任一SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22或它们的任意组合的序列中的至少10个(例如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸,其中所述钙卫蛋白或其抗原性片段与标记、纯化标签、固体基质或另一蛋白或其片段中的一种或多种结合,例如,其中所述伴侣动物钙卫蛋白或其抗原片段任选地与聚组氨酸标签结合。

27. 权利要求26的分离的肽,其是融合蛋白,包含钙卫蛋白S100A8单体区域和钙卫蛋白S100A9单体区域,其中所述区域通过接头序列连接。

28. 权利要求27的分离的肽,其中犬科钙卫蛋白S100A8单体区域包含SEQ ID NO:21序列中的至少20个氨基酸残基,并且犬科钙卫蛋白S100A9单体区域包含SEQ ID NO:22序列中的至少20个氨基酸残基。

29. 权利要求28的分离的肽,其包含SEQ ID NO:19的序列。

30. 分离的肽,其包含伴侣动物整联蛋白或其抗原片段,其包含来自野生型整联蛋白、例如任一SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32或它们的任意组合的序列中的至少10个(例如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸,其中所述整联蛋白或其抗原片段与标记、纯化标签、固体基质或另一蛋白或其片段中的一种或多种结合,例如,其中所述所述整联蛋白或其抗原片段任选地与聚组氨酸标签结合。

31. 诊断试剂盒,其包含(i)一种或多种试剂,所述试剂选自权利要求24-30中任一项所述的分离的蛋白质,和(ii)标记抗体,其对伴侣动物物种的免疫球蛋白特异、并且能够结合所述试剂和来自伴侣动物样品的内源性抗体形成的复合物。

32. 根据权利要求24-30中任一项所述的试剂在制备试剂盒或试剂盒组件中的用途,用于例如根据权利要求1-22中任一项所述实施检测从伴侣动物患者获得的样品中与炎症相关的一种或多种内源性抗体的存在和/或水平的方法。

33. 根据权利要求24-30中任一项所述的试剂,其用于诊断伴侣动物患者的IBD或用于例如根据权利要求1-22中任一项所述实施检测从伴侣动物患者获得的样品中与炎症相关的一种或多种内源性抗体的存在和/或水平的方法。

34. 细菌表达构建体,包含

a) 启动子,其有效连接至

b) 编码权利要求24-30中任一项的肽的可读框,
其中启动子和可读框彼此是异源的。

35. 细菌细胞系,其包含权利要求34的表达构建体。

在伴侣动物中检测炎症标志物和治疗炎性病症的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2016年8月10日提交的美国临时申请号62/373,307和 2015年11月6日提交的美国临时申请号62/252,266的优先权,这些申请的内容引入本文作为参考。

发明领域

[0003] 本发明一般性涉及炎症和免疫学领域,例如炎性肠病,更具体地涉及用于诊断和与伴侣动物中的其他疾病区分的炎性病症(例如炎性肠病)的血清学方法和特定算法,特别包括检测和测定内源性抗体,以及用于实施这些方法的诊断试剂盒,以及治疗由此诊断的伴侣动物的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 炎症通常是对损伤或感染的正常、健康的反应,但有时炎症反应是不成比例的或异常的,因此炎症会严重损害正常组织而不是促进愈合,导致慢性疼痛,促成广泛的多种严重疾病,在某些情况下甚至导致死亡。例如,炎性肠病(IBD)是涉及胃肠道炎症的使人衰弱的和进行性的疾病。症状包括腹痛、痉挛、腹泻和出血。

[0006] 所述炎性疾病的一个指征是在炎症局部部位存在炎症细胞,例如嗜中性粒细胞和巨噬细胞。炎症是血管化组织对感染和/或损伤的反应,并且它受到白细胞粘附到血管内皮细胞和它们浸润到周围组织中的影响。可通过需要活组织检查程序和病理学分析的侵入性方法检测这种局部浓度。炎症状态也可以是全身性的,即炎症细胞分泌的多肽在血清中可检测到。

[0007] 炎性肠病(IBD)描述了特发性胃肠病症,其特征在于持续或复发的胃肠(GI)体征和GI炎症的组织学证据,其中没有发现潜在的病因。有效治疗IBD 需要将病症与其他不一定涉及慢性炎症的胃肠道疾病区分开来。虽然已经为人类开发了某些诊断试剂,但这些诊断试剂并不总是准确的,并且缺乏准确的诊断试剂对于伴侣动物如狗和猫来说甚至更加严重。炎性肠病通常被兽医鉴定为伴侣动物肠道疾病的最常见原因,但缺乏其流行的准确数据,主要是因为该疾病的诊断具有挑战性。该疾病在很大程度上变化很大,不仅在严重程度上而且在其整个伴侣动物的GI的解剖学分布中变化很大,特别是较低的GI,并且可能最重要的是所涉及的炎症反应的类型。淋巴浆细胞性肠炎(LPE)是伴侣动物中报道的最常见的形式,其次是较不常见的嗜酸细胞性胃肠炎(EGE)和罕见的肉芽肿性肠炎(GE)。

[0008] 狗和猫IBD在临床上或组织学上与人IBD形式几乎没有相似性(Xavier 和 Podolsky, Nature, 448:427-434 (2007); Cerquetella等, World J. Gastroent., 16:1050-1056 (2010)。IBD和IBD相关病症可能在其一生中影响相当大部分的伴侣动物,如果不及时治疗,会导致发病率增加,生活质量下降,在某些情况下会导致癌症。及时准确的诊断该病症很可能导致快速和充分的干预,从而显著提高伴侣动物的生活质量。

[0009] 伴侣动物IBD中最常见的临床体征是呕吐和腹泻,但该疾病可呈现更广泛的临床症状,包括但不限于腹痛、食欲改变和体重减轻,腹胀和痉挛,甚至肠胃气胀。所有这些临床症状都是一般性的并且与许多其他潜在病症重叠,使得确定性诊断极其困难。诊断IBD和区

分于其他表面相似的病症如肠易激综合征 (IBS)、食物敏感性和/或胃肠道感染的困难阻碍了早期和有效的治疗。

[0010] 用于诊断伴侣动物中IBD的当前最佳方法需要使用相对昂贵、耗费劳动且侵入性的临床、放射照相、内窥镜和/或组织学技术。尽管可采用所有这些技术,但仍具有高度的主观性。胃肠活组织检查的组织病理学评估仍然是诊断伴侣动物胃肠道炎症的金标准。然而,活检标本的质量可能不同,病理学家之间可能缺乏一致性,并且受不同条件影响的组织之间的区分可能是困难的,需要显著的干预、成本和时间。术语IBD包括发现炎症的组织学证据但没有明显的潜在原因并且排除了所有其他病因的病例。总体而言,IBD的诊断仍然是排除的过程,因此代表了漫长而昂贵的过程,这也导致伴侣动物不必要的痛苦和发病率。

[0011] 伴侣动物中的炎性肠病 (IBD) 对兽医提出了重大挑战。最初的症状通常与非IBD的急性或慢性肠病相混淆,特别是对于那些不熟悉该疾病的兽医。因此,IBD仍未得到诊断和治疗。在最坏的情况下,IBD被误诊,并且伴侣动物可能接受不充分的医疗护理,导致发病率增加和相关的伴侣动物所有者的不适。

[0012] 仅有少数免疫学和炎症标志物已经被验证用于伴侣动物。因此,需要对具有慢性炎性疾病(例如IBD)的伴侣动物敏感且特异的标志物。可用于诊断专门针对伴侣动物定制的IBD的快速且减少侵入性的方法将代表兽医学中的重要临床进展并且将促进早期和更适当的治疗干预以治疗患病的伴侣动物。需要一种更有效、更少侵入性的诊断方法,专门为伴侣动物量身定制,以排除炎症相关的IBD(如果它不是潜在病症的话)或发现IBD。

[0013] 本发明解决了这些需求并且还提供了相关的优点。

[0014] 发明简述

[0015] 本发明提供新的炎症标志物和用于检测它们的方法,以有助于在全身性和/或局部基础上(例如在胃肠道中)诊断和监测炎性疾病。

[0016] 在一个实施方案中,本发明提供了用于检测从伴侣动物获得的样品中与炎症相关的一种或多种内源性抗体的存在和/或水平的新方法。内源性抗体可包括对蛋白质如钙卫蛋白、 β -整联蛋白、乳铁蛋白和C-反应蛋白的自身抗体,和/或还可以包括对多形核白细胞(PMN或粒细胞,包括嗜中性粒细胞)的内源性抗体和/或对胃肠道(gut)里发现的微生物的内源性抗体。

[0017] 例如,已经令人惊奇地发现,伴侣动物当患有炎性病症时,产生对蛋白质如钙卫蛋白、 β -整联蛋白、乳铁蛋白和C-反应蛋白的自身抗体,它们已知与炎症相关联。此类自身抗体先前未被发现或表征,并且意外的且与直觉相反的是身体将产生针对其自身抗炎蛋白的抗体,或者此类抗体可用作病理性炎性病症例如IBD的标志物。

[0018] 因此,本发明在另一个实施方案中提供了方法,其包括测定对炎症标志物例如钙卫蛋白和 β -整联蛋白、乳铁蛋白和/或C-反应蛋白的免疫球蛋白水平,以便全身性地和/或在局部基础上例如在胃肠道中检测炎症。这些炎症相关的自身抗体可以单独用作标志物以鉴定和表征炎性病症,或与已知的或本文描述的抗PMN抗体、抗微生物抗体、钙卫蛋白及其组合联合使用。

[0019] 在某些实施方案中,本发明提供了用于检测从伴侣动物获得的样品中一种或多种炎症相关的自身抗体的存在和/或水平的新方法,其中所述炎症相关的自身抗体是对炎症标志物的内源性抗体,例如选自一种或多种对钙卫蛋白、整联蛋白、乳铁蛋白和C-反应蛋白

的自身抗体；例如，其中炎症相关的自身抗体是IgA抗体，例如，其中患者是狗或猫。

[0020] 在犬科动物和猫科动物中IBD的情况下，我们还鉴定了对多形核白细胞(PMN)和胃肠道中发现的微生物的某些新型的内源性抗体。这些内源性抗体可用于诊断IBD并将其与其他胃肠道疾病区分开来。在某些实施方案中，测定对多形核白细胞(PMN)和肠中发现的微生物的内源性抗体与下述测定相结合：测定一种或多种其他炎症标志物，包括直接测定钙卫蛋白水平，并测定对炎症标志物，例如钙卫蛋白和 β -整联蛋白、乳铁蛋白和/或C-反应蛋白的自身抗体。

[0021] 在一些实施方案中，本发明提供了检测伴侣动物中炎症相关的内源性抗体的新方法，例如通过检测特异性自身抗体并区分来自伴侣动物的样品是否与炎症肠病(IBD)有关来筛选伴侣动物中IBD的存在或不存在。作为非限制性实例，本发明可用于使用经验数据和/或统计算法将来自伴侣动物的样品分类为IBD样品。本发明还可用于使用经验数据和/或统计算法来区分IBD亚型。

[0022] 在一个方面，本发明提供了一种用于分类伴侣动物是否与IBD相关的方法，该方法包括：(a) 确定样品中选自抗多形核白细胞(PMN)抗体、抗微生物抗体、钙卫蛋白及其组合的至少一种标志物的存在或水平；(b) 使用基于所述至少一种标志物的存在或水平的统计算法将样品分类为IBD样品或非IBD样品。

[0023] 在相关方面，本发明提供了一种用于区分伴侣动物是否与IBD的临床亚型相关联的分类的方法，该方法包括：(a) 确定选自以下的至少一种标志物在样品中的存在或水平：抗PMN抗体、抗微生物抗体、钙卫蛋白及其组合；(b) 使用基于所述至少一种标志物的存在或水平的统计算法，将样品分类为淋巴浆细胞性(LPE)IBD、嗜酸细胞性胃肠炎(EGE)IBD或肉芽肿性(GE)IBD或非IBD样品。

[0024] 另一方面，本发明提供了一种监测伴侣动物中IBD进展或消退的方法，该方法包括：(a) 确定至少一种选自下述的标志物在来自个体的样品中的存在或水平：抗-PMN抗体、抗微生物抗体、钙卫蛋白及其组合；(b) 使用基于所述至少一种标志物的存在或水平的统计算法确定伴侣动物中IBD的存在或严重性。

[0025] 在相关方面，本发明提供了一种用于监测接受可用于治疗IBD的药物的伴侣动物中的药物功效的方法，该方法包括：(a) 确定选自以下的至少一种标志物在来自个体的样品中的存在或水平：抗PMN抗体、抗微生物抗体，钙卫蛋白及其组合；(b) 使用基于所述至少一种标志物的存在或水平的统计算法确定个体中IBD的存在或严重性。

[0026] 因此，根据本发明的方法，确定来自IBD伴侣动物的样品中不同标志物的水平，并与非IBD伴侣动物中相同标志物的存在或不存在进行比较。使用免疫化学试剂进行本发明的方法，例如，检测内源性抗微生物抗体、抗PMN抗体等。因此，存在一系列不同的免疫测定模式，其中可以进行本发明的方法。本发明还提供了用于筛选伴侣动物IBD的试剂盒。合适的试剂盒包括可用于测定样品中某些内源性抗体的免疫化学试剂。

[0027] 在某些情况下，本发明的方法和系统构成具有与其相关的“转化”或“机器”的步骤。例如，可以实施ELISA技术以测定本文所述的许多标志物的存在或浓度水平。ELISA包括将标志物(例如内源性抗体)转化为标志物(例如内源性抗体)和结合剂(例如抗原)之间的复合物，然后可以用标记的第二抗体测定。在许多情况下，标记物是将底物转化为可检测产物的酶。可以使用诸如分光光度计的平板读数器进行可检测的产物测定。在其他情况下，使

用各种扩增技术例如PCR确定遗传标记。包括诸如PCR的扩增的方法步骤导致将单链或双链核酸转化成多条链用于检测。检测可包括使用荧光团,其使用仪器如荧光计进行。

[0028] 根据下文提供的详细描述,本发明的其他应用领域将变得显而易见。应当理解,详细描述和具体实施例虽然表明了本发明的某些实施方案,但是仅用于说明目的,并不意图限制本发明的范围。

[0029] 发明详述

[0030] 以下对不同实施方案的描述本质上仅是示例性的,并且不意味着以任何方式限制本发明、其应用或用途。

[0031] I、定义

[0032] 如本文所用,除非另有说明,否则以下术语具有归属于它们的含义。

[0033] 如本文所用,术语“抗体”包括免疫球蛋白分子群体,其可以是多克隆的或单克隆的,并且可以是任何类别和同种型,或免疫球蛋白分子的片段。免疫球蛋白有五大类:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其中一些可进一步分为亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1(人)、IgA2(人)、IgAa(犬)、IgAb(犬)、IgAc(犬)和IgAd(犬)。这种片段通常包含特异性结合抗原的抗体分子的部分。例如,本领域已知为Fab、Fab'或F(ab')₂的免疫球蛋白分子的片段包括在术语抗体的含义内。

[0034] 如本文所用,术语“内源性抗体”是指由患者产生或源自患者的抗体,其可以从患者的血液或组织中分离。通常,响应于外来抗原产生内源性抗体,例如响应于细菌抗原产生内源性抗体,作为身体抵抗感染的天然防御的一部分。然而,在某些情况下,患者可以产生针对身体自身蛋白质的内源性抗体,这种内源性抗体在本文中称为“自身抗体”。因此,在本申请的上下文中,内源性抗体可以指针对蛋白质例如钙卫蛋白、 β -整联蛋白、乳铁蛋白和C-反应蛋白的自身抗体,和/或还可以包括针对多形核白细胞(PMN或粒细胞,包括嗜中性粒细胞)和/或胃肠道中发现的微生物的内源性抗体。当患者是犬时,内源性抗体将是犬抗体,并且在患者是猫的情况下,内源性抗体将是猫抗体。

[0035] 本文使用术语“内源性抗体”来区分源自患者以外的来源的治疗性或诊断性抗体,其可以例如施用于患者或用于检测来自患者的生物样品中抗原的存在(例如,血液、血浆、尿液、组织、唾液等)。治疗或诊断性抗体通常是在细胞系中繁殖的单克隆抗体,通常衍生自在其他物种中制备的抗体,例如来自啮齿动物,或使用噬菌体展示技术。治疗性抗体可以是完整抗体或抗体片段。

[0036] 如本文所用,“自身抗体”是指由患者针对内源性抗原,例如针对内源性蛋白质产生的内源性抗体。例如,本文的实施例描述了针对内源性的炎症相关蛋白,例如钙卫蛋白、整联蛋白、乳铁蛋白和/或CRP的自身抗体。因此,在自身抗体与炎症相关蛋白结合的情况下,自身抗体和炎症相关蛋白抗原都来自相同的个体和相同的物种,例如,在患者是狗的情况下,患者产生的自身抗体是犬抗体,内源性抗原是犬的肽,例如犬钙卫蛋白或犬整联蛋白。在这种情况下,自身抗体可以通过其结合具有与内源抗原相同的结合表位的蛋白质来分离和表征。

[0037] “类别转换”或“同种型转换”指产生免疫球蛋白的细胞的表型的变化。免疫球蛋白类别转换是产生抗体反应的多样化生物效应子功能的关键步骤。在抗体介导的免疫应答过程中,诱导产生免疫球蛋白的细胞经历基因重排,这一过程称为类别转换重组(CSR),其导

致可变区“转换”到不同的恒定区序列。认为转换产生免疫球蛋白的细胞的重链类的同源性受细胞因子的调节。例如，IgA类转换是产生免疫球蛋白的细胞获得IgA表达的过程，IgA是粘膜分泌中最丰富的抗体同种型。

[0038] 本文所用的“炎症”或“炎性病症”是指对刺激的免疫血管反应，例如对抗原、病原体或受损细胞的免疫应答，其由白细胞（白细胞）介导。在一些实施方案中，炎症可以是慢性的。在一些实施方案中，炎症可以是自身免疫病症，其中免疫系统对正常的非外源组织造成损伤，例如在类风湿性关节炎、多发性硬化和其他自身免疫疾病中所见。

[0039] 术语“炎性肠病”或“IBD”是指全部或部分胃肠道的慢性炎症，包括但不限于以下亚型：淋巴浆细胞性肠炎（LPE）、嗜酸细胞性胃肠炎（EGE）和肉芽肿性肠炎（GE）。炎性肠病与所有其他胃肠道疾病、综合征和异常不同，所述其他疾病包括肠易激综合征（IBS）和短暂性胃肠道感染，其特征在于慢性炎症。

[0040] “IBD相关抗体”是指待诊断或治疗的伴侣动物患者血清中的抗体，其与IBD的存在、严重性或类型相关，因此可以被认为是IBD的标志物。IBD 相关抗体包括例如本文所述的抗体，例如抗PMN抗体、抗酵母抗体、抗微生物抗体，例如针对细菌OmpC或鞭毛蛋白的抗体，以及针对内源性炎症相关蛋白例如钙卫蛋白、整联蛋白、乳铁蛋白和/或CRP的自身抗体。

[0041] 术语“样品”包括从伴侣动物患者获得的任何生物样品。适用于本发明的样品包括但不限于全血、血浆、血清、唾液、尿液、粪便、眼泪、任何其他体液、组织样品（例如活组织检查）及其细胞提取物（例如红细胞提取物）。使用诸如血清、唾液和尿液的样品是本领域熟知的（Hashida等人，J.Clin.Lab.Anal., 11:267-286 (1997)）。本领域技术人员将理解样品例如血清样品可以在分析标志物水平之前进行稀释。

[0042] 术语“标志物”包括任何生化标志物、血清学标志物、遗传标志物或其他临床或超声描述术特征，其可用于将来自伴侣动物患者的样品分类为与炎性病症如IBD相关。适用于本发明的标志物的非限制性实例描述如下，并且包括抗PMN抗体（例如APMNA、pAPMNA、cAPMNA、ANSNA、ASAPPA等），抗微生物抗体（例如，抗外膜蛋白质、抗OmpC抗体（ACA）、抗鞭毛蛋白抗体（AFA）等）、乳铁蛋白、弹性蛋白酶、C反应蛋白（CRP）、钙卫蛋白、血红蛋白等及其组合，以及对内源性炎症相关蛋白如钙卫蛋白、整联蛋白、乳铁蛋白和/或CRP的自身抗体。对炎性病症相关标志物的具体实例的叙述并不旨在排除本领域已知并且适用于本发明的其他标志物。

[0043] 术语“分类”包括将样品或患者与疾病状态或预后进行“关联”或“分类”。在某些情况下，“分类”基于统计证据、经验证据或两者。在某些实施方案中，分类的方法和系统使用来自患有已知疾病状态或预后的患者的所谓训练样品组。一旦建立，训练数据集用作基础、模型或模板，针对该基础、模型或模板比较来自患者的未知样品的特征，以便对未知疾病状态进行分类或提供患者中疾病状态的预后。在一些情况下，“分类”类似于诊断疾病状态和/或将疾病状态与另一种疾病状态区分开。在其他情况下，“分类”类似于在诊断患有疾病状态的患者中提供疾病状态的预后。

[0044] 术语“标志物谱”包括一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种或更多种诊断和/或预后标志物，其中所述标志物可以是血清学标志物、蛋白质标志物、遗传标志物等。在一些实施方案中，标志物谱与统计学分析一起可以为兽医提供有价值的诊断

和预后见解。在其他实施方案中,具有任选的统计分析的标志物谱提供对生物疗法的预计响应。组合来自多个诊断预测因子的信息通常是有用的,因为组合多个标志物的数据可以提供比任何单个标志物本身更敏感和区分性的用于诊断或筛选应用的工具。通过结合统计分析使用多种标志物(例如血清学、蛋白质、遗传标志物等),本文所述的测定通过鉴定患有IBD或其临床亚型的患者提供诊断、预后和治疗价值,预测发展复杂疾病的风险,协助评估疾病进展的速度(例如,进展到复杂疾病或手术的速度),以及协助选择治疗。

[0045] 如本文所用,术语“标记”是指可检测的化合物、组合物或固体支持物,其可以直接或间接(例如通过共价或非共价方式,单独或包封)与单克隆抗体或蛋白质缀合。标记可以自身检测(例如放射性同位素标记、化学发光染料、电化学标记、金属螯合物、胶乳颗粒或荧光标记),或者在酶标记的情况下,可以催化基质化合物或组合物的化学改变,其是可检测的(例如酶,如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等)。本发明中使用的标记可以是但不限于碱性磷酸酶;葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(“G6PDH”);辣根过氧化物酶(HRP);化学发光剂如异鲁米诺,荧光物质如荧光素和罗丹明化合物;核酶;和染料。标记也可以是本身可检测的特异性结合分子(例如生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、地高辛、麦芽糖、寡聚组氨酸例如六-组氨酸、2,4-二硝基苯、苯基胍酸盐、ssDNA、dsDNA等)。标记的使用产生可以通过诸如电磁辐射的检测或直接可视化的方式检测的信号,并且可以任选地测定该信号。

[0046] 可以使用本领域技术人员熟知的方法将单克隆抗体与标记连接,例如Immunochemical Protocols;Methods in Molecular Biology,Vol.295,R.Bums 编辑(2005)。例如,可检测的单克隆抗体缀合物可以以任何已知的诊断测试形式如ELISA或竞争性测定形式使用,以产生与测试样品中IBD相关抗体的存在或量相关的信号。

[0047] “基本结合”或“基本上结合”是指在具体测定条件下测定混合物中分子之间特异性结合或识别的量。在其最广泛的方面,基本上结合涉及第一分子不能结合或识别第二分子与第一分子结合或识别第三分子的能力之间的差异,使得差异足够允许有意义的分析,从而区分特定组的测定条件下的特异性结合,其包括分子的相对浓度,以及孵育的时间和温度。在另一方面,一种分子基本上不能以交叉反应性的意义结合或识别另一种分子,其中例如在特定的一组测定条件下,第一分子对第二分子表现出相对于对第三分子的小于25%,小于10%,例如小于5%的反应性,其包括分子的相对浓度和孵育。可以使用许多广为人知的方法测试特异性结合,例如免疫组织化学测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)或蛋白质印迹测定。

[0048] 在本申请的上下文中,术语“患者”或“受试者”是指哺乳动物伴侣动物或宠物,包括例如狗、猫和马。

[0049] 如本文所用,术语“基本上相同的氨基酸序列”包括与天然存在的氨基酸序列相似但不相同的氨基酸序列。例如,与天然存在的鞭毛蛋白具有基本相同的氨基酸序列的氨基酸序列,即多肽,可以具有一个或多个修饰,例如相对于天然氨基酸序列的氨基酸添加、缺失或取代,条件是修饰的多肽基本上保留鞭毛蛋白的至少一种生物活性,例如免疫反应性。两个序列之间的“百分比相似性”是包含两个序列共有的匹配残基或保守残基的位置数除以所比较的位置数再乘以100的函数。在这方面,序列中的保守残基是在物理上或功能上类似于相应的参考残基的残基,例如具有相似的大小、形状、电荷、化学性质,包括形成共价键或氢键的能力等。

[0050] 如本文所用,“氨基酸共有序列”是指假设的氨基酸序列,其可以使用至少两个(例如,多于两个)比对的氨基酸序列的矩阵产生,并允许在比对时有间隙,使得可以确定每个位置处最常见的氨基酸残基。共有序列是包含每个位置最常表现的氨基酸的序列。如果两个或更多个氨基酸在单个位置上等地表示,则共有序列包括这些氨基酸中的两个或全部。在一些情况下,氨基酸共有序列对应于天然存在的序列或亚序列。在其他情况下,氨基酸共有序列在自然界中未发现,仅代表理论序列。

[0051] “同源性”表示两个核苷酸序列代表相同基因或其基因产物,并且通常指两个或更多个核酸分子的核苷酸序列部分基本上或完全相同。当来自相同的生物体时,同源多核苷酸代表具有相同染色体位置的相同基因,即使多核苷酸序列之间可能存在个体差异(例如多态性变体,等位基因等)。

[0052] 术语“异源的”是指通常在自然界中通常不以相同的关系发现的任何两种或更多种核酸或多肽序列。例如,通常重组产生异源核酸,其具有两个或更多个序列,例如来自经排列以产生新功能性核酸的无关基因,例如来自一个来源的启动子和来自另一个来源的编码区。类似地,异源多肽通常指在自然界中彼此不存在相同关系的两个或更多个亚序列(例如融合蛋白)。

[0053] 如本文所用,术语“片段”包括全长蛋白质的氨基酸的肽、多肽或蛋白质区段,条件是该片段保留与疾病患者血清中的至少一种抗体的反应性。在一些实施方案中,抗原或其片段在氨基末端和/或羧基末端包含一个或多个标签或组合标签,例如聚组氨酸标签(例如 $6\times\text{His}$ 标签,任选地与溶解度增强的残基一起,例如SEQ ID NO 33或SEQ ID NO 36的N-末端序列)、小泛素样修饰物(SUMO)、谷胱甘肽S-转移酶(GST)等。“抗原性片段”是全长蛋白质的片段,其包含抗体结合表位,例如感兴趣的抗体显示出基本结合的表位。

[0054] “表位”是多肽上的抗原决定簇,其被识别为由互补位结合对多肽特异性的抗体,例如IBD相关抗体。本发明上下文中的抗体可识别具有3至11个氨基酸,例如5至7个氨基酸的序列的特定表位。抗体还可以通过其对本发明的方法和试剂盒中应用的蛋白质、多肽或肽的结合亲和力来表征,并且结合亲和力(K_D)例如在纳摩尔范围内,例如 $K_D 10^{-7}$ 或者更少,例如 $K_D 10^{-9}$ 到 10^{-10} 。用于本发明的具体抗体是在IBD动物血清中发现的IBD相关抗体,以及用作检测抗体的针对抗体的单克隆或多克隆抗体。

[0055] 术语“临床因素”包括患者中与IBD相关的症状。临床因素的实例包括但不限于腹泻、腹痛和/或不适、痉挛、发烧、贫血、低蛋白血症、体重减轻、焦虑、嗜睡及其组合。在一些实施方案中,IBD的诊断基于使用统计算法分析患者中一种或多种标志物的存在或水平与确定患者是否具有一种或多种临床因素的组合。

[0056] 术语“预后”包括预测IBD的可能病程和结果或从疾病中恢复的可能性。在一些实施方案中,统计算法的使用提供了患者中IBD的预后。例如,预后可以是手术、IBD临床亚型的发展、一种或多种临床因素的发展、肠癌的发展或从疾病中恢复。

[0057] 术语“预后概况”包括伴侣动物患者的一、二、三、四、五、六、七、八、九、十或更多个标志物,其中标志物可以是血清学标志物、蛋白质标志物、遗传标志物等。统计分析将标志物谱转化为预后谱。可以定义统计分析的示例,但不限于通过四分位数分数进行分析,并且可以将每个标志物的四分位数得分相加以生成四分位和得分。

[0058] 术语“诊断IBD”包括使用本发明的方法、系统和代码来确定伴侣动物患者中IBD的

存在或不存。该术语还包括用于评估伴侣动物患者的疾病活动水平的方法、系统和代码。术语“监测IBD的进展或消退”包括使用本发明的方法、系统和代码来确定伴侣动物患者的疾病状态(例如IBD的存在或严重性)。在某些情况下,将统计算法的结果与在较早时间对同一伴侣动物患者获得的结果进行比较。在一些方面,本发明的方法、系统和代码还可以用于预测IBD的进展,例如,通过基于样品中至少一种标志物的存在或水平确定IBD在伴侣动物中快速或缓慢进展的可能性。在其他方面,本发明的方法、系统和代码还可用于预测IBD的消退,例如,通过基于样品中至少一种标志物的存在或水平确定IBD在伴侣动物患者中快速或缓慢消退的可能性。

[0059] 术语“诊断炎性病症”包括使用本发明的方法、系统和代码来确定伴侣动物患者例如马、狗或猫中炎性病症的存在或不存。该术语还包括用于评估患者中疾病活动水平的方法、系统和代码。术语“监测炎症的进展或消退”包括使用本发明的方法、系统和代码来确定患者的疾病状态(例如,炎症的存在或严重程度)。在某些情况下,将统计算法的结果与在较早时间为同一患者获得的结果进行比较。在一些方面,本发明的方法、系统和代码还可用于预测炎症的进展,例如通过基于样品中至少一种标志物的存在或水平确定炎症在患者中快速或缓慢进展的可能性。在其他方面,本发明的方法、系统和代码还可用于预测炎症的消退,例如通过基于样品中至少一个标志物的存在或水平确定炎症在患者中快速或缓慢消退的可能性。

[0060] 如本文所用,术语“灵敏度”是指当样品为阳性时,例如具有IBD或其临床亚型时,本发明的诊断方法、系统或代码给出阳性结果的概率。灵敏度计算为真阳性结果的数量除以真阳性和假阴性的总和。灵敏度基本上是本发明的方法、系统或代码从没有疾病的那些人中正确识别具有IBD或其临床亚型的那些人的程度的量度。可以选择统计算法,使得分类为IBD或其临床亚型的灵敏度至少约为60%,并且可以是例如至少约65%、70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0061] 术语“特异性”是指当样品不是阳性时,例如不具有IBD或其临床亚型时,本发明的诊断方法、系统或代码给出阴性结果的概率。特异性计算为真阴性结果的数量除以真阴性和假阳性的总和。特异性基本上是本发明的方法、系统或代码从患有该疾病的人中排除那些没有IBD或其临床亚型的人的程度的量度。可以选择统计算法,使得分类为IBD或其临床亚型的特异性为至少约50%,例如至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0062] 如本文所用,术语“阴性预测值”或“NPV”是指被鉴定为不具有IBD或其临床亚型的个体实际上不患有该疾病的概率。阴性预测值可以计算为真阴性的数量除以真阴性和假阴性的总和。阴性预测值由诊断方法、系统或代码的特征以及所分析的伴侣动物群体中疾病的流行程度确定。可以选择统计算法,使得具有疾病患病率的群体中的阴性预测值在约50%至约99%的范围内,并且可以是例如至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0063] 术语“阳性预测值”或“PPV”是指被鉴定为患有IBD或其临床亚型的个体实际患有该疾病的概率。阳性预测值可以计算为真阳性的数量除以真阳性和假阳性的总和。阳性预

测值由诊断方法、系统或代码的特征以及所分析的伴侣动物群体中疾病的流行程度决定。可以选择统计算法,使得具有疾病患病率的群体中的阳性预测值在约70%至约99%的范围内,并且可以是例如至少约70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0064] 预测值,包括阴性和阳性预测值,受所分析的伴侣动物群体中疾病的流行程度的影响。在本发明的方法、系统和代码中,可以选择统计算法以产生具有特定IBD患病率的临床群体的期望的临床参数。例如,可以选择学习统计分类器系统,使IBD患病率高达约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%或70%,这可在例如兽医办公室中看到。

[0065] 如本文所用,术语“总体一致性”或“总体准确性”是指用本发明的方法、系统或代码对疾病状态进行分类的准确性。总体准确度计算为真阳性和真阴性的总和除以样品结果的总数,并且受所分析的伴侣动物群体中疾病的患病率的影响。例如,可以选择统计算法,使得具有疾病患病率的群体中的总体准确度至少为约60%,并且可以是例如至少约65%、70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%。

[0066] 本文所用的关于生物标志物的使用的术语“相关联”(或“相关”)是指将伴侣动物患者中生物标志物的存在或量与其在已知患病的伴侣动物或已知有给定病症的风险或已知没有给定病症的伴侣动物中的存在或量进行比较。通常,这采取将生物标志物浓度形式的测定结果与选择为指示疾病的发生或不发生或某种未来结果的可能性的预定阈值进行比较的形式。

[0067] 还可以使用群体研究来使用受试者工作特征曲线(“ROC”)分析来选择决策阈值,以将患病亚群与非患病亚群区分开。在这种情况下,当样本检测呈阳性但实际上没有疾病时会出现假阳性。另一方面,如果样本检测结果呈阴性,表明它们是健康的,当它们确实患有这种疾病时,就会出现假阴性。为绘制ROC曲线,确定真阳性率(TPR)和假阳性率(FPR)。由于TPR与灵敏度相当,FPR等于1-特异性,因此ROC图有时称为灵敏度vs(1-特异性)图。完美测试的ROC曲线下面积为1.0;随机测试的面积为0.5。选择阈值以提供可接受的特异性和灵敏度水平。

[0068] 这些测定包括灵敏度和特异性、预测值、似然比、诊断比值比和ROC曲线面积。ROC图的曲线下面积(“AUC”)等于分类器将随机选择的阳性病例排序高于随机选择的阴性病例的概率。ROC曲线下面积可以被认为等同于Mann-Whitney U检验,其测试在两组中获得的得分之间的中位数差异(如果这些组是连续数据),或者是等同于Wilcoxon秩和检验。

[0069] 术语“统计算法”或“统计过程”包括用于确定变量之间的关系的各种统计分析中的任何一种。在本发明中,变量是至少一种目标标志物的存在或水平。可以使用本文描述的统计算法分析任何数量的标志物。例如,统计算法中可以包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50或更多个标志物的存在或水平。在一个实施方案中,使用逻辑回归。在另一个实施方案中,使用线性回归。在某些情况下,本发明的统计算法可以使用给定群体内的特定标志物的分位数测定作为变量。分位数是一组“切割点”,它将数据样本分成包含(尽可能)相同数量的观察值的组。例如,四分位数是将数据样本分成四组的值,这四组包含(尽可能)相同数量的观察值。低的四分位数是向上通过有

序数据集四分之一的数据值；高的四分位数是向下通过有序数据集四分之一的数据值。五分位数是将数据样本划分为五组的值，这些组包含（尽可能）相同数量的观察值。本发明还可以包括使用百分位数范围的标志物水平（例如分位数、四分位数，五分位数等）或它们的累积指数（例如标志物水平的四分位数总和等）作为算法中的变量（仅与连续变量一样）。

[0070] 本发明的统计算法包括一个或多个学习统计分类器系统。如本文所使用的，术语“学习统计分类器系统”包括机器学习算法技术，其能够适应复杂数据集（例如，感兴趣的标志物组）并基于这些数据集做出决定。在一些实施方案中，使用单个学习统计分类器系统，例如分类树（例如随机森林）。在其他实施方案中，使用2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个学习统计分类器系统的组合。学习统计分类器系统的示例包括但不限于使用归纳学习的系统（例如决策/分类树、例如随机森林、分类和回归树（C&RT）、增强树等），以及遗传算法和进化程序。

[0071] 可以使用来自健康和IBD伴侣动物的一组样品（例如血清学样品）训练和测试本文所述的学习统计分类器系统。例如，来自使用活组织检查和/或内窥镜检查的兽医诊断为具有IBD的伴侣动物的样品适合用于训练和测试本发明的学习统计分类器系统。来自健康伴侣动物的样品可包括未被鉴定为IBD样品的样品。本领域技术人员知道用于获得可用于训练和测试本发明的学习统计分类器系统的伴侣动物样品群组的其他技术和诊断标准。

[0072] 术语“在具有IBD的伴侣动物中优化治疗”包括使用本发明的方法、系统和代码来确定在治疗剂（例如，IBD药物）给药之前伴侣动物患者的治疗过程。在某些情况下，将统计算法的结果与在治疗过程中较早时间对同一伴侣动物患者获得的结果进行比较。因此，结果的比较提供了需要改变治疗过程或需要增加或减少当前疗程的剂量的指示。术语“疗程”包括用于缓解或预防与IBD相关的一种或多种症状（即临床因素）的任何治疗方法。该术语包括给予用于改善患有IBD的伴侣动物健康的任何化合物、药物、方法或方案，并且包括上述任何治疗剂（例如IBD药物）以及外科手术。

[0073] 术语“治疗有效量或剂量”包括能够在有此需要的伴侣动物患者中实现治疗效果的药物剂量。例如，可用于治疗IBD的药物的治疗有效量可以是能够预防或缓解与IBD相关的一种或多种症状的量。本领域技术人员使用药物剂量和配方书籍中广泛报道的已知技术可确定准确的量。

[0074] 术语“治疗谱”包括个体的一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种或更多种标志物，其中所述标志物可以是血清学的标志物、蛋白质标志物、遗传标志物等。统计分析将标志物谱转化为治疗谱。统计分析的示例可以通过但不限于四分位数得分定义，并且可以将每个标志物的四分位数得分相加以生成四分位总和得分。

[0075] 术语“功效谱”包括个体的一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个标志物，其中所述标志物可以是血清学标志物、蛋白质标志物，遗传标志物等，并且其中每种标志物随治疗施用而变化。在某些情况下，将标志物谱与功效谱进行比较，以评估治疗功效。在某些方面，功效谱与标志物谱相当，但其中标志物在稍后的时间测定。在某些其他方面，功效谱对应于来自炎症患者的标志物谱，包括对特定治疗剂或药物有反应的IBD患者。在这些方面，所测试标志物谱和参考功效谱之间的相似性或差异表明该特定药物是否适合或不适合于治疗炎症，例如IBD。

[0076] 在某些情况下，使用本发明的方法以预测IBD的进展。所述方法可用于监测该疾病

的进展和消退两方面。术语“监测IBD的进展或消退”包括使用所述方法和标志物谱来确定伴侣动物的疾病状态(例如,IBD的存在或严重性)。在某些情况下,将统计分析的结果与在较早时间对同一伴侣动物获得的结果进行比较。在一些方面,本发明的方法、系统和代码还可以用于预测IBD的进展,例如,通过基于样品中至少一种标志物的存在或水平确定IBD在伴侣动物中快速或缓慢进展的可能性。在其他方面,本发明的方法、系统和代码还可用于预测IBD的消退,例如,通过基于样品中至少一个标志物的存在或水平确定IBD在个体中快速或缓慢消退的可能性。

[0077] 在某些情况下,使用本发明的方法以预测炎症病症的进展。所述方法可用于监测该疾病的进展和消退两方面。术语“监测炎症的进展或消退”包括使用所述方法和标志物谱来确定患者的疾病状态(例如,炎症的存在或严重程度)。在某些情况下,将统计分析的结果与在较早时间对同一伴侣动物获得的结果进行比较。在一些方面,本发明的方法、系统和代码还可用于预测炎症的进展,例如,通过基于样品中至少一个标志物的存在或水平确定炎症在患者中快速或缓慢进展的可能性。在其他方面,本发明的方法、系统和代码还可用于预测IBD的消退,例如,通过基于样品中至少一个标志物的存在或水平确定炎症在患者中快速或缓慢消退的可能性。

[0078] 术语“在接受可用于治疗IBD的药物的伴侣动物患者中监测药物功效”包括单独或与统计分析的应用组合确定标志物谱以确定已经给予用于治疗IBD的治疗剂后伴侣动物的疾病状态(例如,IBD的存在或严重性)。

[0079] II. 诊断伴侣动物的IBD

[0080] 在具体的实施方案中,本发明提供了用于检测和测量与IBD相关的标志物的方法和系统,例如内源性IBD相关抗体。确定此类标志物的存在和/或水平对于准确分类来自伴侣动物的样品是否与IBD或其临床亚型相关是有用的。在一些实施方案中,本发明可用于使用经验数据(例如,IBD标志物的存在或水平)和/或统计算法将来自伴侣动物的样品分类为IBD样品。本发明还可用于使用经验数据(例如,IBD标记的存在或水平)和/或统计算法来区分不同的IBD亚型。因此,本发明提供了IBD或其临床亚型的准确诊断预测和用于指导治疗决定的预后信息。

[0081] 在一个方面,本发明提供了一种用于对来自伴侣动物的样品是否与IBD相关联的分类的方法,该方法包括:(a) 确定选自由以下组成的组中的至少一种标志物的存在或水平:样品中的抗PMN抗体,抗微生物抗体,钙卫蛋白及其组合;(b) 使用基于至少一种标志物的存在或水平的统计算法将样品分类为IBD样品或非IBD样品。

[0082] 在相关方面,本发明提供了一种用于对来自伴侣动物的样品是否与IBD的临床亚型相关联的方法,该方法包括:(a) 确定选自下述标志物的至少一种的存在或水平:样品中的抗PMN抗体,抗微生物抗体,钙卫蛋白及其组合的组;(b) 使用基于至少一种标志物的存在或水平的统计算法将样品分类为LPE样品,EGE样品,GE样品,其他IBD亚型或非IBD样品。在某些实施方案中,所述至少一种标志物可以替代地是或可以包含一种或多种针对内源性炎症相关蛋白的自身抗体,例如钙卫蛋白,整联蛋白,乳铁蛋白和/或CRP。

[0083] 在一些实施方案中,在伴侣动物的样品中测定至少两种,三种,四种,五种,六种,七种,八种,九种,十种或更多种IBD标志物的存在或水平。在某些情况下,抗PMN抗体包含抗PMN抗体(APMNA),核周抗PMN抗体(pAPMNA),细胞质抗PMN抗体(cAPMNA),PMN特异性核抗体

(NSNA), 斑点抗泛蛋白多形核抗体 (SAPPA) 及其组合。在某些情况下, 在伴侣动物的样品中测定APMNA和/或pAPMNA的存在或水平。在某些其他情况下, 抗PMN抗体 (APMNA) 包含抗PMN免疫球蛋白A (APMNA-IgA), 包含抗PMN免疫球蛋白G (APMNA-IgG), 包含抗PMN免疫球蛋白G1 (APMNA-G1), 包含抗PMN免疫球蛋白G2 (APMNA-G2) 包含抗PMN免疫球蛋白M (APMNA-IgM) 和/或其组合。在某些其他情况下, 抗微生物抗体包含抗外膜蛋白C (ACA) 抗体。在某些情况下, 抗外膜蛋白C抗体 (ACA) 包含抗OmpC免疫球蛋白A (ACA-IgA), 抗OmpC免疫球蛋白G (ACA-IgG), 抗OmpC免疫球蛋白G1 (ACA-IgG1), 抗OmpC免疫球蛋白G2 (ACA-IgG2), 抗OmpC免疫球蛋白M (ACA-IgM) 和/或其组合。在某些其他情况下, 抗微生物抗体包含抗鞭毛蛋白 (ACA) 抗体。在某些情况下, 抗鞭毛蛋白抗体 (AFA) 包含抗鞭毛蛋白免疫球蛋白A (AFA-IgA), 抗鞭毛蛋白免疫球蛋白G (AFA-IgG), 抗鞭毛蛋白免疫球蛋白G1 (AFA-IgG1), 抗鞭毛蛋白免疫球蛋白G2 (AFA-IgG2), 抗鞭毛蛋白免疫球蛋白M (AFA-IgM) 和/或其组合。

[0084] 在其他实施方案中, 除抗-PMN抗体和/或抗微生物抗体外, 至少一种标志物还包含一种, 两种, 三种, 四种, 五种, 六种, 七种, 八种, 九种, 十种或更多种IBD标志物。此类IBD标志物的实例包括但不限于乳铁蛋白, 抗乳铁蛋白抗体, 弹性蛋白酶, C-反应蛋白 (CRP), 钙卫蛋白, 血红蛋白及其组合。

[0085] 在某些实施方案中, 至少一种标志物包含一种或多种抗内源性炎症相关蛋白的自身抗体, 例如钙卫蛋白, 整联蛋白, 乳铁蛋白和/或CRP。

[0086] 用于检测或确定至少一种标志物的存在或水平的样品通常是全血, 血浆, 血清, 唾液, 尿液, 粪便 (即粪便), 泪液和任何其他体液或组织样品 (即活组织检查), 如小肠或结肠样品。在一些实施方案中, 样品是血清, 全血, 血浆, 粪便, 尿液或组织活检。在某些情况下, 本发明的方法还包括在检测或确定样品中至少一种标志物的存在或水平之前从伴侣动物患者获得样品。

[0087] 在其他实施方案中, 本发明的方法包括测定样品 (例如血清, 血浆, 全血或粪便) 中APMNA, ACA, AFA, 钙卫蛋白和/或pAPMNA的存在或水平。可以构建由上述一种或多种IBD标志物组成的组, 并将其用于将样品分类为IBD样品或非IBD样品。

[0088] 在某些情况下, 使用免疫测定法或免疫组织化学测定法测定至少一种标志物的存在或水平。适用于本发明方法的免疫测定的非限制性实例包括酶联免疫吸附测定 (ELISA)。适用于本发明方法的免疫组织化学测定的实例包括但不限于免疫荧光测定, 例如直接荧光抗体测定, 间接荧光抗体 (IFA) 测定, 抗补体免疫荧光测定和抗生物素蛋白-生物素免疫荧光测定。其他类型的免疫组织化学测定包括免疫过氧化物酶测定。

[0089] 在一些实施方案中, 本发明可用于使用统计算法 (例如, 学习统计分类器系统) 和/或经验数据 (例如, IBD标记的存在或水平) 将来自伴侣动物的样品分类为IBD样品。本发明还可用于使用统计算法 (例如, 学习统计分类器系统) 和/或经验数据 (例如, IBD标记的存在或水平) 来区分LPE, EGE和GE。

[0090] 在某些情况下, 统计算法是单个学习统计分类器系统, 其可以包括基于树的统计算法, 例如C&RT或RF。作为非限制性示例, 单个学习统计分类器系统可用于基于预测或概率值以及至少一个IBD标记的存在或水平将样本分类为IBD样本或非IBD样本。单个学习统计分类器系统的使用通常以至少约75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%或

99%敏感性,特异性,阳性预测值,阴性预测值和/或的总体准确度将样本分类为IBD(例如LPE,EGE或其他)样品。

[0091] 在某些实施方案中,本发明的方法还包括将IBD分类结果发送给兽医。在另一个实施方案中,本发明的方法还以伴侣动物患者患有IBD或其临床亚型的概率的形式提供诊断。例如,患者可以具有约0%,5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%或更高的概率患有IBD或其临床亚型。在另一个实施方案中,本发明的方法还提供伴侣动物患者中IBD的预后。例如,预后可以是手术,IBD的临床亚型(例如,LPE或GE)的发展,一种或多种症状的发展,肠癌的发展或从疾病中恢复。在一些情况下,将样品分类为IBD样品的方法还基于获得样品的患者的症状(即临床因素)。症状或症状组可以是例如腹泻,腹痛,痉挛,发烧,贫血,体重减轻,焦虑,抑郁及其组合。

[0092] 在一些实施方案中,伴侣动物患者诊断为患有IBD或其临床亚型之后,向伴侣动物施用治疗有效量的用于治疗与IBD或IBD亚型相关的一种或多种症状的药物。合适的IBD药物包括但不限于氨基水杨酸盐(例如美沙拉嗪,柳氮磺胺吡啶等),皮质类固醇(例如泼尼松),硫嘌呤(例如硫唑嘌呤,6-巯基嘌呤等),甲氨蝶呤,单克隆抗体(例如,英夫利昔单抗),其游离碱,其药学上可接受的盐,其衍生物,其类似物,及其组合。

[0093] 在某些情况下,本发明的统计算法可用于区分先前鉴定为患有IBD的伴侣动物患者中的LPE样品与EGE样品。在某些其他情况下,本发明的统计算法可用于将来自先前未被诊断患有IBD的伴侣动物患者的样品分类为LPE样品,EGE样品,GE样品或非IBD样品。

[0094] 在另一个方面,本发明提供了一种用于监测伴侣动物患者中IBD的进展或消退的方法,该方法包括:(a)确定选自由以下组成的组中的至少一种标志物的存在或水平:来自伴侣动物的样品中的抗PMN抗体,抗微生物抗体,钙卫蛋白及其组合;(b)使用基于至少一种标志物的存在或水平的统计算法确定伴侣动物患者中IBD的存在或严重性。

[0095] 在相关方面,本发明提供了一种用于监测接受用于治疗IBD的药物的伴侣动物患者的药物功效的方法,该方法包括:(a)确定来自伴侣动物患者的样品中选自以下的至少一种标志物的存在或水平:抗PMN抗体,抗微生物抗体,钙卫蛋白及其组合;(b)使用基于至少一种标志物的存在或水平的统计算法确定患者中IBD的存在或严重性。

[0096] 用于检测或确定至少一种标志物的存在或水平的样品通常是全血,血浆,血清,唾液,尿液,粪便(即粪便),泪液和任何其他体液或组织样品(即活组织检查),如小肠或结肠样品。样品可以是血清,全血,血浆,粪便,尿液或组织活检。在某些情况下,本发明的方法还包括在检测或确定样品中至少一种标志物的存在或水平之前从伴侣动物患者获得样品。

[0097] 在其他实施方案中,本发明的方法包括测定样品(例如血清,血浆,全血或粪便)中APMNA,抗OmpC抗体(ACA),抗鞭毛蛋白抗体(AFA),钙卫蛋白和/或pAPMNA的存在或水平,并任选另外测定炎症标志物自身抗体的存在或水平,例如钙卫蛋白, β -整联蛋白,乳铁蛋白和/或C-反应蛋白的自身抗体。可构建由上述一种或多种IBD标志物组成的组,并用于确定伴侣动物患者中IBD的存在或严重性。

[0098] 在某些情况下,使用免疫测定法或免疫组织化学测定法测定至少一种标志物的存在或水平。适用于本发明方法的免疫测定的非限制性实例包括ELISA。适用于本发明方法的免疫组织化学测定的实例包括但不限于免疫荧光测定,例如直接荧光抗体测定,IFA测

定,抗补体免疫荧光测定和抗生物素蛋白-生物素免疫荧光测定。其他类型的免疫组织化学测定包括免疫过氧化物酶测定。

[0099] 在某些实施方案中,本发明的方法可以进一步包括比较步骤(b)中测定的IBD的存在或严重性与伴侣动物患者中在较早时间测定的IBD的存在或严重性。作为非限制性实例,可以将接受可用于治疗IBD的治疗剂的伴侣动物患者确定的IBD的存在或严重性与在开始使用治疗剂之前或者在治疗的较早时间同一伴侣动物患者确定的IBD的存在或严重性进行比较。在某些其他实施例中,该方法可以进一步包括将IBD监测结果发送给兽医。

[0100] 在又一方面,本发明提供了一种计算机可读介质,包括用于控制一个或多个处理器以对来自伴侣动物患者的样本分类为是否与IBD相关联的代码,该代码包括将统计方法应用于数据集的指令,其指示样品中选自抗PMN抗体,抗微生物抗体,钙卫蛋白及其组合的至少一种标志物的存在或水平,以产生基于至少一种标志物的存在或水平将样品分类为IBD样品或非-IBD样品的统计学上的结论。

[0101] 在相关方面,本发明提供了一种计算机可读介质,包括用于控制一个或多个处理器以对来自伴侣动物患者的样品是否与IBD的临床亚型相关联进行分类的代码,该代码包括指令以将统计方法应用于数据集,其指示样品中选自抗PMN抗体,抗微生物抗体,钙卫蛋白及其组合的至少一种标志物的存在或水平,以产生统计学上得出的基于至少一种标志物的存在或水平将样品分类为LPE样品,EGE样品,GE样品,IBD的其他亚型或非IBD样品。

[0102] 在另一方面,本发明提供了一种用于对来自伴侣动物患者的样品是否与IBD相关联进行分类的系统,该系统包括:(a)数据获取模块,其被配置为产生数据集,所述数据集指示选自样品中的抗PMN抗体,抗微生物抗体,钙卫蛋白及其组合的至少一种标志物的存在或者水平;(b)数据处理模块,被配置为通过对数据集应用统计方法来处理数据集,以产生基于至少一个标记的存在或水平将样本分类为IBD样本或非IBD样本的统计推导的结论;(c)显示模块,用于显示统计推导出的决策。在相关方面,本发明提供了一种用于对来自伴侣动物患者的样品是否与IBD的临床亚型相关联的系统,该系统包括:(a)数据获取模块,其被配置为产生指示至少一种标志物存在或水平的数据集,所述标志物选自样品中的抗PMN抗体,抗微生物抗体,钙卫蛋白及其组合;(b)数据处理模块,被配置为通过对数据集应用统计方法来处理数据集,以基于至少一个标记的存在或水平产生将样本分类为LPE样本,EGE样本,GE样本,其他IBD亚型或非IBD样本的统计推导的结论;(c)显示模块,用于显示统计推导出的结论。在一个实施例中,统计方法是学习统计分类器系统。以上描述了适用于本发明的学习统计分类器系统的示例。在某些情况下,统计方法是单个学习统计分类器系统。在某些其他情况下,统计方法是至少两个学习统计分类器系统的组合。在一些情况下,可以使用处理算法来处理从使用学习统计分类器系统获得的数据。

[0103] III伴侣动物IBD的临床亚型

[0104] 伴侣动物中的IBD通常是混合的炎症反应,其中某些细胞占优势和/或看起来增加,并且伴侣动物中识别的不同形式主要基于它们的组织学描述。在IBD的情况下,在GI中观察到的变化与真正的炎症有关,而不仅仅与反应性反应有关。犬和猫IBD型疾病在临床或组织学上与人类形式的IBD(即克罗恩病和溃疡性结肠炎)几乎没有相似性(EJ Hall, 2009)。

[0105] 伴侣动物中最常见的组织学类型的IBD是淋巴浆细胞性肠炎(“LPE”),其主要影响

小肠和/或以较低的频率影响胃。LPE的临床症状与其他IBD亚型的临床症状无法区分。LPE的特征在于与淋巴细胞和浆细胞的浸润相关的粘膜结构变化。可能存在完全或部分绒毛萎缩,在大多数严重病例中存在绒毛融合和隐窝脓肿。炎症程度是可变的,本质上可能是斑片状,并且水肿是并发症。淋巴细胞和浆细胞的相对比例因病例而异,但淋巴细胞分布模式的这种变异的显著性仍然未知。

[0106] 在犬科LPE中,报道了固有层T细胞,IgG浆细胞,巨噬细胞和粒细胞的显著增加,并且严重程度从轻度到严重浸润。已经报道了细胞因子的显著改变和Th1型,Th2型,促炎和免疫调节细胞因子的表达增加。增加浓度的急性期蛋白质反映炎症反应,并可在治疗后恢复正常。

[0107] 嗜酸性粒细胞性胃肠炎(“EGE”)是狗和猫中第二种最常见的特发性IBD形式。粘膜结构紊乱如绒毛萎缩的证据与炎性细胞的混合浸润一起存在,其中嗜酸性粒细胞占优势。病理学家的诊断标准各不相同,其中一些主观定义的EGE仅基于粘膜嗜酸性粒细胞数量的增加,而其他需要增加特异性地发生在固有层中。临床症状取决于所涉及的胃肠道区域。EGE中的粘膜糜烂/溃疡可能比任何其他形式的IBD更频繁地发生,因此许多胃肠道并发症如呕血,黑便,甚至胃肠道的穿孔需要立即干预。EGE可以在任何品种和年龄的狗和猫中看到,尽管它在年轻的成年动物中最常见。德国牧羊犬的发病率有所提高,拳击手犬(Boxers)和杜宾犬(Dobermans)可能易患。

[0108] 肉芽肿性肠炎(“GE”)是较不常见的IBD形式,其特征不在于巨噬细胞的粘膜浸润,导致肉芽肿的形成。炎症的分布可能是不完整的。虽然这种病症与人类克罗恩病(CD)有一些相似之处,但CD往往更广泛,导致肠梗阻并进入皮肤瘘管,这可能不是伴侣动物的特征。

[0109] 在狗中,认为IBD的发展起因于易感动物中粘膜免疫失调的结果。固有层中淋巴细胞的浓度是限定某些类型的犬IBD的特征,其与包括人在内的其他物种非常不同。与健康狗相比,在EGE的情况下嗜酸性粒细胞和肥大细胞的浓度增加进一步证明了超敏反应在犬IBD的发病机理中的参与。

[0110] IV. 胃肠道微生物组和GI健康。

[0111] 消化道微生物群被定义为栖息在胃肠道中的所有活微生物的聚集体。动物的胃肠道由称为GI微生物群的异质微生物群体定殖。出现越来越多的关于动物胃肠道微生物群的研究,尤其是狗和猫的研究(Suchodolski,2011),因为它涉及宿主的许多关键过程,如健康和疾病之间的平衡。

[0112] 在单胃动物中,消化道含有胃肠道中最丰富,多样且代谢相关的细菌群。细菌可占所有粪便微生物群的98%,以及Archeaea,真核生物和病毒占其余部分。犬科动物和猫科动物中最丰富的细菌群体在厚壁菌门和细菌(Bacterioidetes)中,但比例根据研究而有很大差异。例如,根据研究之间的提取方法和PCR方案,厚壁菌门的百分比范围在25%至95%之间(Suchodolski,2011)。

[0113] V. IBD标志物

[0114] 由于IBD与其他疾病或病症之间的症状相似,伴侣动物中炎性肠病(“IBD”)的诊断对兽医提出了临床挑战。例如,具有肠道急性感染症状的伴侣动物经历肠易激综合征(“IBS”)如腹胀,腹泻,便秘和腹痛,可能难以与患有IBD的伴侣动物区分开。因此,IBD和IBS之间症状的相似性使得快速和准确的诊断变得困难并且妨碍疾病的早期和有效治疗。

[0115] 本发明部分基于以下令人惊讶的发现:通过检测某些诊断标志物的存在或水平,可以实现伴侣动物中IBD的诊断,所述标志物例如抗多形核白细胞(PMN)抗体(APMNA),抗微生物抗体(例如抗外膜蛋白OmpC 抗体(ACA)和/或抗鞭毛蛋白抗体(AFA)和与炎症病症相关的蛋白质(例如钙卫蛋白)。在一些方面,本发明使用统计算法来帮助将伴侣动物样品分类为IBD样品或非IBD样品。通过组合在伴侣动物中与疾病相关的多种标志物,可以实现对伴侣动物的IBD的更准确和灵敏的诊断。在其他方面,本发明使用标志物的组合以及统计算法来帮助将样品分类为LPE,EGE或 GE IBD样品和非IBD样品。本发明已经产生了一组独特的标志物,如所例证的,通过经验性测试已经描述过的用于人类但不适用于伴侣动物的标记物,基于从相关抗原鉴定伴侣动物特异性和/或患病伴侣动物来源的细菌菌株(即,从已经通过内窥镜/活组织检查诊断为具有IBD的狗和猫中分离的细菌)的需要,这些标志物被分离并用于本发明。

[0116] 这些诊断标志物,例如抗PMN抗体和抗微生物抗体,例如抗外膜蛋白OmpC抗体和/或抗鞭毛蛋白抗体,以及与炎症病症相关的蛋白质(例如钙卫蛋白)可以任选地与如上所述的炎症标志物的自身抗体的测量一起测量,例如,测量钙卫蛋白, β -整合素,乳铁蛋白和/或C-反应蛋白的自身抗体水平,

[0117] 本发明的方法还可用于在临床症状发作之前或之后筛选伴侣动物患者,从而允许兽医更早地诊断疾病(而不是等待其慢性),鉴定需要额外测试的伴侣动物和/或早点做出治疗决定。

[0118] 多种炎症肠病(IBD)标志物,例如生物化学标志物,血清学标志物,遗传标志物或其他临床或回波扫描(echographic)特征,适用于本发明的统计算法,用于排除或归为IBD,例如,通过将来自患者的样品分类为IBD 样品。本文所述的IBD标志物也适用于本发明的统计学算法,用于区分IBD 的临床亚型,例如,通过对来自患者的样品分类为LPE,EGE,GE或其他。适用于本发明的标志物的实例包括但不限于抗PMN抗体(例如,APMNA, pPMNA, cPMNA, NSNA, SAPPa等),抗微生物抗体,例如抗OmpC 抗体,抗鞭毛蛋白抗体等),乳铁蛋白,抗乳铁蛋白抗体,弹性蛋白酶, C-反应蛋白(CRP),钙卫蛋白,血红蛋白及其组合。本领域技术人员将知道适用于本发明的统计算法的其他标记。

[0119] 样品中APMNA水平的确定和/或pPMNA的存在或不在于可用于本发明。如本文所用,术语“抗-PMN抗体”或“APMNA”包括针对PMN的细胞质和/或核组分的抗体。基于PMN中的APMNA染色模式,APMNA活性可分为几大类:(1)无核周醒目性的细胞质PMN染色(cPMNA);(2)绕细胞核外边缘的核周染色(pPMNA);(3)绕核内边缘的核周染色(NSNA);(4)横跨整个PMN上的散布性斑点染色(SAPPa),在某些情况下,pPMNA染色对DNA酶处理敏感。术语APMNA包括所有种类的抗PMN反应性,包括但不限于cPMN, pPMN, NSNA和SAPPa。类似地,术语APMNA包括所有免疫球蛋白同种型,包括但不限于免疫球蛋白 A和G。

[0120] 来自伴侣动物患者的样品中的APMNA水平可以例如使用免疫测定法例如酶联免疫吸附测定法(ELISA)和醇固定的PMN来确定。可以例如使用免疫组织化学测定法(例如间接荧光抗体(IFA)测定)测定特定类别的 APMNA(例如pPMNA)的存在或不在于。可以使用经DNase处理的固定 PMN的免疫荧光测定来确定样品中pPMNA的存在或不在于。除固定的 PMN外,适用于测定APMNA水平的APMNA特异性抗原包括但不限于未纯化或部分纯化的PMN提取物;纯化的蛋白质,蛋白质片段或合成肽如组蛋白H1或其pPMNA反应性片段(参见例如美国

专利号6,033,864);分泌囊泡抗原或其APMNA反应性片段(参见例如美国专利No.6,218,129);和抗APMNA独特型抗体。本领域技术人员将理解,对APMNA特异性的其他抗原的使用在本发明的范围内。

[0121] 样品中AYA (AYA-IgA, AYA-IgG, AYA-IgG1, AYA-IgG2和/或AYA-IgM) 水平的测定也可用于本发明。如本文所用,术语“抗酵母免疫球蛋白A”或“AYA-IgA”包括与酵母细胞壁特异性反应的免疫球蛋白A同种型的抗体。类似地,术语“抗酵母免疫球蛋白G”或“AYA-IgG”,术语“抗酵母免疫球蛋白G1”或“AYA-IgG1”,术语“抗酵母免疫球蛋白G2”或“AYA-IgG”包括分别与酵母细胞壁特异性反应的免疫球蛋白G同种型,免疫球蛋白G1同种型和免疫球蛋白G2同种型的抗体。类似地,术语“抗酵母免疫球蛋白M”或“AYA-IgM”包括与酵母细胞壁特异性反应的免疫球蛋白M同种型的抗体。

[0122] 使用对AYA特异的抗原确定样品是否对AYA-IgA, AYA-IgG, AYA-IgG1, AYA-IgG2, AYA-IgM是阳性的。这种抗原可以由AYA-IgA, AYA-IgG和/或AYA-IgM特异性结合的任何抗原或抗原混合物。尽管AYA 抗体最初的特征在于它们结合酵母的能力,但是本领域技术人员将理解,可以从酵母或多种其他来源获得由AYA特异性结合的抗原,只要该抗原能够特异性结合AYA抗体。因此,可用于测定样品中AYA-IgA, AYA-IgG, AYA-IgG1, AYA-IgG2和/或AYA-IgM水平的AYA特异性抗原的示例性来源包括但不限于,完全杀死酵母细胞,如酵母菌或念珠菌细胞;酵母细胞壁甘露聚糖,如磷酸甘露聚糖;寡糖,如寡甘露糖苷;neoglycolipids;抗AYA 独特型抗体;等等。不同的酵母菌种和菌株,如酿酒酵母菌株Su1, Su2, CBS 1315或BM 156,或白色念珠菌菌株VW32,适合用作AYA-IgA, AYA-IgG和AYA-IgM特异性抗原。从受试者的微生物组分离的酵母的物种和菌株或从受试者的微生物组分离的酵母的不同物种和菌株的池和/或从物种和菌株的集合中分离的也适用于确定样品中的AYA-IgA, AYA-IgG 和AYA-IgM水平。对AYA特异的纯化和合成抗原库也适用于测定样品中AYA-IgA, AYA-IgG和AYA-IgM的水平。纯化抗原的实例包括但不限于纯化的寡糖抗原,例如寡甘露糖苷。合成抗原的实例包括但不限于合成的低聚甘露糖苷,例如美国专利公开号20030105060中描述的那些,例如 $D\text{-Man}\beta(1-2)D\text{-Man}\beta(1-2)D\text{-Man}\beta(1-2)D\text{-Man-OR}$, $D\text{-Man}\alpha(1-2)D\text{-Man}\alpha(1-2)D\text{-Man}\alpha(1-2)D\text{-Man-OR}$ 和 $D\text{-Man}\alpha(1-3)D\text{-Man}\alpha(1-2)D\text{-Man}\alpha(1-2)D\text{-Man-OR}$,其中R是氢原子,C1-C20烷基或任选标记的连接基团。

[0123] 酵母细胞壁甘露聚糖的制备例如可用于测定样品中AYA-IgA, AYA-IgG和AYA-IgM的水平。这种水溶性表面抗原可以通过本领域已知的任何适当的提取技术制备,包括例如通过高压灭菌,或通过酶消化,或通过碱提取,或通过酸提取,或通过提取方法的组合,或者可以从商业上获得(参见,例如,Lindberg等,Gut,33:909-913(1992))。

[0124] 纯化的寡糖抗原如寡甘露糖苷也可用于测定样品中AYA-IgA, AYA-IgG和AYA-IgM的水平。本领域技术人员理解,这种寡甘露糖苷抗原与AYA的反应性可以通过改变甘露糖基链长来优化(Frosh等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82:1194-1198(1985));异头构型(Fukazawa,Y. In“Immunology of Fungal Disease,”E.Kurstak et al.(eds.),Marcel Dekker Inc.,New York,pp.37-62(1989));或连接位置(Kikuchi等,Planta,190:525-535(1993))。

[0125] 测定样品中抗OmpC抗体水平也可用于本发明。如本文所用,术语“抗外膜蛋白C抗体”或“抗OmpC抗体”包括针对细菌外膜孔蛋白的抗体(Nikaido,

H.Microbiol.Mol.Biol.Rev.67:593-656)。术语“外膜蛋白C”或“OmpC”包括与抗OmpC抗体具有免疫反应性的细菌孔蛋白。

[0126] 如本文所用,术语“抗外膜蛋白免疫球蛋白A”或“ACA-IgA”包括与外膜蛋白特异性反应的免疫球蛋白A同种型的抗体。类似地,术语“抗外膜蛋白免疫球蛋白G”或“ACA-IgG”,术语“抗外膜蛋白G1”或“ACA-IgG1”,术语“抗外膜蛋白免疫球蛋白G2”或“ACA-IgG”包括分别与外膜蛋白特异性反应的免疫球蛋白G同种型,免疫球蛋白G1同种型和免疫球蛋白G2同种型的抗体。类似地,术语“抗外膜蛋白免疫球蛋白M”或“ACA-IgM”包括与外膜蛋白特异性反应的免疫球蛋白M同种型的抗体。

[0127] 可以使用OmpC蛋白或其片段(例如其免疫反应性片段)测定来自伴侣动物患者的样品中存在的抗OmpC抗体的水平。用于测定伴侣动物样品中抗OmpC抗体水平的合适的OmpC抗原包括但不限于OmpC蛋白,具有与OmpC蛋白基本相同的氨基酸序列的OmpC多肽,或其片段,例如其免疫反应性片段。如本文所用,OmpC多肽通常描述与OmpC蛋白质具有大于约50%同一性的氨基酸序列的多肽,例如,大于约60%同一性,例如大于约70%同一性,例如大于约80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%氨基酸序列同一性,使用序列比对程序如CLUSTALW确定氨基酸同一性。这些抗原可以通过例如从肠细菌如大肠杆菌中纯化,通过重组表达核酸,通过合成方法如溶液或固相肽合成,或通过使用噬菌体展示来制备。

[0128] 伴侣动物样品中的抗鞭毛蛋白抗体(AFA)水平也在本发明中测定。如本文所用,术语“抗鞭毛蛋白抗体”包括针对细菌鞭毛蛋白组分的抗体。术语“鞭毛蛋白”包括与抗鞭毛蛋白抗体具有免疫反应性的细菌鞭毛蛋白。微生物鞭毛蛋白是在细菌鞭毛中发现的蛋白质,其自身以中空圆柱体形排列以形成细丝。

[0129] 如本文所用,术语“抗鞭毛蛋白免疫球蛋白A”或“AFA-IgA”包括与鞭毛蛋白特异性反应的免疫球蛋白A同种型的抗体。类似地,术语“抗鞭毛蛋白免疫球蛋白G”或“AFA-IgG”,术语“抗鞭毛蛋白G1”或“AFA-IgG1”,术语“抗鞭毛蛋白免疫球蛋白G2”或“AFA-IgG”包括免疫球蛋白G同种型,免疫球蛋白G1同种型和免疫球蛋白G2同种型的抗体,它们分别与鞭毛蛋白特异性反应。类似地,术语“抗鞭毛蛋白免疫球蛋白M”或“AFA-IgM”包括与鞭毛蛋白特异性反应的免疫球蛋白M同种型的抗体。

[0130] 可以使用鞭毛蛋白或其片段(例如其免疫反应性片段)测定伴侣动物样品中存在的抗鞭毛蛋白抗体的水平。适用于测定样品中抗鞭毛蛋白抗体水平的鞭毛蛋白抗原包括但不限于鞭毛蛋白,其片段及其组合,具有与鞭毛蛋白基本相同的氨基酸序列的鞭毛蛋白多肽,或其片段(例如其免疫反应性片段)等。如本文所用,鞭毛蛋白多肽通常描述具有与天然存在的鞭毛蛋白具有例如大于约50%同一性,例如大于约60%同一性的氨基酸序列,大于约70%的同一性,例如大于约80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%的氨基酸序列同一性的多肽,使用序列比对程序如CLUSTALW确定氨基酸同一性。这种鞭毛蛋白抗原可以由至少一种属的细菌制备,例如假单胞菌属,变形杆菌属,大肠杆菌属,螺杆菌属,沙门氏菌属,克雷伯氏菌属,丁酸弧菌属,短杆菌属,肠球菌属,链霉菌属,肠杆菌属,不动杆菌属,葡萄球菌属,红球菌属,寡养单胞菌属等。细菌来源可以来自受试者。制剂包括从细菌中纯化的鞭毛蛋白或纯化的通过重组表达编码鞭毛蛋白抗原的核酸,通过合成方法如溶液或固相肽合成,或通过使用噬菌体展示获得的鞭毛蛋白纯化的蛋白。

[0131] 确定伴侣动物样品中C-反应蛋白(CRP)的存在或水平也可用于本发明。在某些情

况下,通过测定(例如杂交测定或基于扩增的测定)在mRNA 表达水平检测CRP的存在或水平。在某些其他情况下,使用例如免疫测定(例如ELISA)或免疫组织化学测定,在蛋白质表达水平检测CRP的存在或水平。例如,可从Alpco Diagnostics (Salem,NH)获得的夹心比色ELISA 测定法可用于测定血清,血浆,尿液或粪便样品中的CRP水平。类似地,可从Biomeda Corporation (Foster City,CA)获得的ELISA试剂盒可用于检测样品中的CRP水平。用于测定样品中CRP水平的其他方法描述于例如美国专利号6,838,250和6,406,862中。

[0132] 另外,潜血检测试纸,粪便潜血,通常指示胃肠疾病,并且已经开发了各种试剂盒来监测胃肠道出血。例如,Beckman Coulter产品Hemoccult SENSE是胃肠道出血,缺铁,消化性溃疡,溃疡性结肠炎以及在某些情况下筛查结肠直肠癌的诊断辅助手段。该特定测定基于过氧化氢氧化愈创木脂以产生蓝色。类似的比色测定法可从Helena Laboratories (Beaumont, TX) 商购获得,用于检测粪便样品中的血液。通过测定血红蛋白或血红素活性的存在或水平来检测粪便样品中的潜血的其他方法描述于例如美国专利 No. 4,277,250、4,920,045中。

[0133] 钙卫蛋白是在体内所有细胞,组织和体液中发现的钙和锌结合蛋白。钙卫蛋白是粒细胞和巨噬细胞中的主要蛋白质,占这些细胞胞质部分中总蛋白质的60%。因此它是PMN周转的替代标志。其在粪便中的浓度与肠粘膜的PMN浸润强度和炎症的严重程度相关。钙卫蛋白可以用ELISA测量。

[0134] 整联蛋白是参与免疫巡逻和组织向性机制的细胞粘附受体,并且它们的确定也可用于本发明。它们是位于记忆T细胞中的跨膜蛋白,其促进淋巴细胞通过皮肤,CNS和胃肠道等特定组织迁移。例如,表达 $\alpha 4\beta 7$ 整联蛋白的记忆T淋巴细胞优先迁移到胃肠道中。

[0135] 该方法可以进一步包括测量炎症标志物的自身抗体水平,例如钙卫蛋白和 β -整联蛋白,乳铁蛋白和/或C-反应蛋白的自身抗体水平。

[0136] 其他临床指标可以与本发明的IBD标志物测定结果组合。这些包括与胃肠道疾病和/或炎症相关的其他生物标志物。实例包括以下:急性期蛋白质,例如C-反应蛋白(CRP),血清淀粉样蛋白A,白蛋白,转铁蛋白等,其血清/血浆浓度响应于炎症而增加或减少;由免疫细胞分泌的细胞因子如 IL-6,IL- β 1等,其调节一系列免疫系统功能,包括炎症反应和微生物反应;防御素如 α 和 β 防御素(即DEFB1和DEFB2),其与上皮表面对微生物定植的抗性有关;诸如E-钙粘蛋白等的钙粘蛋白介导细菌粘附于哺乳动物细胞,然后进行内化;细胞粘附分子如ICAM-1和VCAM-1,其参与淋巴细胞向感染组织的募集以及这些白细胞与血管内皮的粘附。

[0137] 可以与本发明的IBD标志物测定结果组合的其他临床标记包括人口统计学信息(例如,体重,性别,年龄,品种),兽医史(例如,临床因素,预先存在的疾病,如慢性腹泻,食物敏感性,其他)。

[0138] 以这种方式组合测定结果/临床标记可以包括使用多变量逻辑回归,包括但不限于对数线性建模,神经网络分析,n-of-m分析,决策树分析。

[0139] VI. 自身抗体作为哺乳动物炎症状况的标志物

[0140] 炎症是针对各种病原体的正常防御机制中的关键过程,并且白细胞是炎症的主要细胞介质。炎症的组织学特征在于由于循环白细胞从脉管系统迁移而在受影响组织中积累白细胞,这是由白细胞、它们产生的细胞因子和血管内皮主动介导和精确控制的过程。然

而,过度或不受控制的炎症反应可导致许多风湿病和炎症性疾病中出现的病理性炎症。

[0141] 钙卫蛋白和整联蛋白是与这些生理过程密切相关的两类蛋白质,其表达,活化和积累在正常条件下受到严格控制。这些蛋白质的失调与特定的疾病状况有关,如 $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$ 和 $\alpha E\beta 7$ 整联蛋白的失调可能都在慢性形式的脱髓鞘疾病的进展中起辅助作用,导致某些形式的多发性硬化; $\alpha 1\beta 2$ 失调与牛皮癣相关;和 $\alpha 4$ 型整合蛋白与乳糜泻和其他与皮肤有关的谷蛋白敏感性疾病有关。

[0142] 钙卫蛋白通常用作区分有机和功能性胃肠疾病以及炎性肠病的早期诊断的标志物。钙卫蛋白是钙结合多肽S100A8和S100A9的24kDa二聚体。该复合物占嗜中性粒细胞胞质溶胶的可溶性多肽含量的高达60%并且对酶促降解具有抗性,并且可以在粪便中测量。用于钙卫蛋白检测和定量的许多测定法是已知的并且通常用于测定不同体液和粪便中的钙卫蛋白水平。已经在人IBD群体中广泛研究了S100多肽,特别是钙卫蛋白和S100A12,并且已经显示它们的血清和粘膜水平随IBD升高。一些关于血清和粪便中钙卫蛋白水平的研究也已经在非人类动物中进行,并且已经报道了类似的趋势,尽管它们非常有限。

[0143] 所有对不同体液中钙卫蛋白的估计都是通过直接测量不同形式的多肽来完成的,但主要是基于抗钙卫蛋白本身的抗体的使用,其中抗体通常是单克隆抗体,通常是鼠的,为了检测和测量钙卫蛋白的目的而制备。

[0144] 如本文所述,针对钙卫蛋白的内源性抗体尚未描述,或与炎性病征有关。本发明包括在确定的群组中确定和量化钙卫蛋白及其复合物的内源免疫球蛋白水平并将这些水平与确定的临床特征相关联的方法。

[0145] 整联蛋白是异二聚体细胞表面受体,其通过识别细胞外基质(ECM)多肽中的结合基序而实现细胞的粘附,增殖和迁移。作为细胞骨架和ECM之间的跨膜接头,它们能够募集多种多肽并影响细胞过程。整联蛋白介导细胞与细胞相互作用,是许多生物过程的关键归巢机制。 $\alpha 4$ 整联蛋白通过循环白细胞表达,并与 $\beta 1$ 或 $\beta 7$ 整联蛋白亚基一起形成异二聚体受体。 $\alpha 4\beta 1$ ($\alpha 4\beta 1$ 或非常晚期抗原-4(VLA-4))和 $\alpha 4\beta 7$ ($\alpha 4\beta 7$)二聚体均在白细胞穿过血管内皮细胞的迁移中起作用,并有助于细胞活化和在实质中生存。被称为肠粘膜归巢受体的 $\alpha 4\beta 7$ 整联蛋白作为归巢受体起作用,介导淋巴细胞从肠道诱导位点的迁移,此时免疫反应首先被诱导到固有层时。

[0146] 在多种生物过程(包括受精,植入和胚胎发育,免疫反应,骨吸收和血小板聚集)的背景下,整联蛋白介导的与细胞外基质(ECM)的相互作用是细胞的附着、细胞骨架组织、机械敏感,迁移,增殖,分化和存活所必需的。整联蛋白还在病理过程(例如炎症,伤口愈合,血管生成和肿瘤转移)中起作用。

[0147] 许多整联蛋白是循环受体,其不断地重新分布,内化和更新。因此,它们作为靶抗原的直接定量是非常具有挑战性的,并且其直接测量限于与任何临床条件相关。

[0148] 尚未描述如本文所述的整联蛋白的内源性抗体,也未知它们与炎性状况有关。本发明包括通过测量特异性识别整联蛋白的抗体滴度并将它们与确定的临床特征相关联,能够定量针对整联蛋白的内源免疫球蛋白水平的方法。

[0149] 乳铁蛋白是最初从乳中分离但后来发现存在于多种其他分泌液例如唾液,泪液和粘膜分泌物中以及嗜中性粒细胞的颗粒中的蛋白质。乳铁蛋白是一种有效的抗微生物剂。通过螯合游离铁,它可以使细菌无法获取这种必需营养素。它还与细菌LPS和细菌细胞表面

蛋白结合,干扰细菌粘附和破坏细菌细胞壁或膜。在炎症状况中,由于从嗜中性粒细胞颗粒释放乳铁蛋白,乳铁蛋白的血浆水平可能显著升高。

[0150] 尚未描述如本文所述的乳铁蛋白的内源性抗体,也未知它们与炎症状况有关。本发明包括通过测量特异性识别乳铁蛋白的抗体滴度并将它们与确定的临床特征相关联,能够定量针对乳铁蛋白的内源性免疫球蛋白水平的方法。

[0151] C-反应蛋白(CRP)是由肝脏响应巨噬细胞和T细胞释放的IL-6释放的五聚体蛋白质。它与死亡或垂死细胞(包括一些细菌)表面上表达的磷酸胆碱结合,并激活补体系统,促进巨噬细胞的吞噬作用,从而清除坏死和凋亡的细胞和细菌。CRP水平在炎症反应中迅速且显著地上升,因此它是炎症的良好标志物,并且已经开发了各种技术来测量CRP水平以诊断和监测炎症。

[0152] 本文所述的抗CRP的内源性抗体尚未描述,或与炎症病症有关。本发明包括通过测量特异性识别CRP的抗体的滴度并将它们与确定的临床特征相关联,能够定量针对CRP的内源性免疫球蛋白水平的方法。

[0153] 在每种情况下,炎症与前述炎症标志物的自身抗体的存在和水平之间的相关性对于炎症标志物的IgA自身抗体特别显著。

[0154] VII. 测定法

[0155] 可以使用本领域已知的多种测定法,技术和试剂盒中的任何一种来确定样品中一种或多种标志物的存在或水平,以分类样品是否与IBD或其临床亚型相关。

[0156] 本发明部分地依赖于确定从伴侣动物患者获得的样品中至少一种标志物的存在或水平。如本文所用,术语“确定至少一种标志物的存在”包括通过使用本领域技术人员已知的任何定量或定性测定法来确定每种目标标志物的存在。在某些情况下,确定特定性状,变量或生物化学或血清学物质(例如蛋白质或抗体)的存在或不存在的定性测定法适合于检测每种目的的标志物。在某些其他情况下,确定RNA,蛋白质,抗体或活性的存在或不存在的定量测定法适合于检测每种目的的标志物。如本文所用,术语“确定至少一种标志物的水平”包括通过使用本领域技术人员已知的任何直接或间接定量测定法来确定每种目的标志物的水平。在某些情况下,确定例如RNA,蛋白质,抗体或活性的相对或绝对量的定量测定法适合于确定每种目标标志物的水平。本领域技术人员将理解,用于确定标志物水平的任何测定法也可用于确定标志物的存在或不存在。

[0157] 流式细胞术可用于确定样品中一种或多种标志物的存在或水平。此类流式细胞术测定法,包括基于珠子的免疫测定(参见例如Nolan,J.P.and Mandy,F.Cytometry 69:318-325(2006))。

[0158] 用于表达对标志物特异的重组抗原的噬菌体展示技术也可用于确定样品中一种或多种标志物的存在或水平。如果需要,可以使用抗体例如抗噬菌体单克隆抗体将表达对例如抗体标志物具有特异性的抗原的噬菌体颗粒锚定到多孔板(Felici et al,“Phage-Displayed Peptides as Tools for Characterization of Human Sera”in Abelson (Ed.),Methods Enzymol. 267:116-129(1996))。

[0159] 多种免疫测定技术,包括竞争性和非竞争性免疫测定(例如,The immunoassay handbook 4th edition,David Wild ed.Newnes,2013)可用于确定样品中一种或多种标志物的存在或水平。术语免疫测定包括这样的技术,但不限于酶免疫测定(EIA),例如酶放大

免疫测定技术 (EMIT), 酶联免疫吸附测定 (ELISA), 直接ELISA, 抗原捕获ELISA, 夹心ELISA, IgM抗体捕获ELISA (MAC ELISA) 和微粒酶免疫测定 (MEIA); 毛细管电泳免疫测定 (CEIA); 放射免疫测定 (RIA); 免疫放射测定 (IRMA); 荧光偏振免疫测定 (FPIA); 和化学发光测定 (CL)。脂质体免疫测定, 例如流动注射脂质体免疫测定和脂质体免疫传感器, 也适用于本发明。另外, 浊度测定法适用于本发明, 其中蛋白质/抗体复合物的形成导致增加的光散射, 其被转换成峰值速率信号作为标志物浓度的函数。浊度测定法可从Beckman Coulter (Brea, CA; Kit#449430) 商购获得, 并且可使用Behring浊度计分析仪进行。

[0160] 抗原捕获ELISA可用于确定样品中一种或多种标志物的存在或水平。例如, 在抗原捕获ELISA中, 针对目标标志物的抗体与固相结合, 并添加样品使得标志物被抗体结合。在通过洗涤除去未结合的蛋白质后, 可以使用例如放射免疫测定法定量结合的标志物的量 (参见, 例如, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988)。夹心ELISA也适用于本发明。例如, 在双抗体夹心测定中, 第一抗体与固体支持体结合, 并且允许目标标志物与第一抗体结合。通过测量结合标志物的第二抗体的量来定量标志物的量。抗体可固定在各种固体支持体上, 如磁性或色谱基质颗粒, 测定板表面 (如微量滴定孔), 固体基质材料或膜片 (如塑料, 尼龙, 纸) 等等。可以通过将抗体或多种抗体以阵列形式涂布在固体支持体上来制备测定条带。然后可以将该条带浸入测试样品中并通过洗涤和检测步骤快速处理以产生可测量的信号, 例如有色斑点。

[0161] 使用例如碘-125 (^{125}I) 标记的第二抗体 (Harlow和Lane, 同上) 的放射免疫测定也适用于测定样品中一种或多种标志物的存在或水平。用化学发光标志物标记的第二抗体也适用于本发明。使用化学发光二级抗体的化学发光测定法适用于标志物水平的灵敏、非放射性检测。此类二级抗体可以从各种来源商购获得, 例如Amersham Lifesciences, Inc. (Arlington Heights, IL)。

[0162] 上述免疫测定对于确定样品中一种或多种标志物的存在或水平特别有用。作为非限制性实例, 固定的PMN ELISA可用于确定伴侣动物样品是否对APMNA呈阳性或用于确定APMNA水平。类似地, 使用酵母细胞壁磷酸肽甘露聚糖的ELISA可用于确定伴侣动物样品是否对AYA-IgA, AYA-IgG和 /或AYA-IgM呈阳性, 或用于确定AYA-IgA, AYA-IgG和/或AYA-IgM水平。使用OmpC蛋白或其片段的ELISA可用于确定伴侣动物样品是否对抗OmpC 抗体阳性, 或用于确定抗OmpC抗体水平。使用鞭毛蛋白或其片段的ELISA 可用于确定伴侣动物样品是否对抗鞭毛蛋白抗体呈阳性, 或用于测定抗鞭毛蛋白抗体水平。使用钙卫蛋白或其片段的ELISA可用于确定伴侣动物样品是否对钙卫蛋白抗体呈阳性, 或用于测定钙卫蛋白抗体水平。此外, 上述免疫测定对于确定伴侣动物样品中其他标志物的存在或水平特别有用。

[0163] 可以直接或间接检测抗体与目标标志物的特异性免疫结合。直接标记包括附着于抗体的荧光或发光标签, 金属, 染料, 放射性核素等。用碘 -125 (^{125}I) 标记的抗体可用于测定样品中一种或多种标志物的水平。使用对标志物特异的化学发光抗体的化学发光测定法适用于标志物水平的灵敏的非放射性检测。用荧光染料标记的抗体也适用于测定样品中一种或多种标志物的水平。荧光染料的实例包括但不限于DAPI, 荧光素, Hoechst 33258, R-藻蓝蛋白, B-藻红蛋白, R-藻红蛋白, 罗丹明, 德克萨斯红和丽丝胺。与荧光染料连接的二级抗体可以商购获得, 例如山羊F(ab')₂抗人IgG-FITC 可从Tago Immunologicals (Burlingame, CA) 获得。

[0164] 间接标记包括本领域熟知的各种酶,例如辣根过氧化物酶(HRP),碱性磷酸酶(AP), β -半乳糖苷酶,脲酶等。辣根过氧化物酶检测系统可以与例如显色底物四甲基联苯胺(TMB)一起使用,其在过氧化氢存在下产生可溶产物,其在450nm可检测。碱性磷酸酶检测系统可以与显色底物对硝基苯基磷酸一起使用,例如,其产生在405nm处易于检测的可溶性产物。类似地, β -半乳糖苷酶检测系统可以与显色底物邻硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)一起使用,其产生可在410nm检测的可溶性产物。脲酶检测系统可与底物如尿素-溴甲酚紫(Sigma Immunochemicals; St. Louis, MO)一起使用。与酶连接的有用的二级抗体可以从许多商业来源获得,例如,山羊抗狗IgG-碱性磷酸酶可以从Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA.)购买。

[0165] 可以分析来自直接或间接标记的信号,例如,使用分光光度计检测来自生色底物的颜色;用于检测辐射的辐射计数器,例如用于检测 ^{125}I 的伽马计数器;或者在存在特定波长的光的情况下检测荧光的荧光计。为了检测酶联抗体,可以使用分光光度计如EMAX Microplate Reader (Molecular Devices; Menlo Park, CA)根据制造商的说明书对标志物水平的量进行定量分析。如果需要,本发明的测定法可以自动化或用机器人进行,并且可以同时检测来自多个样品的信号。

[0166] 定量蛋白质印迹也可用于检测或确定样品中一种或多种标志物的存在或水平。Western印迹可以通过众所周知的方法定量,例如扫描密度测定法或磷光成像法。作为非限制性实例,蛋白质样品在10%SDS-PAGE Laemmli 凝胶上电泳。使一级鼠单克隆抗体与印迹反应,并且可以使用初步狭缝印迹实验确认抗体结合是线性的。山羊抗小鼠辣根过氧化物酶偶联抗体 (BioRad) 用作二级抗体,并且使用化学发光,例如,使用Renaissance化学发光试剂盒(New England Nuclear; Boston, MA),根据制造商的说明书进行信号检测。使用扫描密度计(Molecular Dynamics; Sunnyvale, CA)分析印迹的放射自显影图并对阳性对照归一化。例如,将值报告为实际值与阳性对照之间的比率(光密度指数)。这些方法在本领域中是公知的。

[0167] 备选地,可以使用多种免疫组织化学测定技术来确定样品中一种或多种标志物的存在或水平。术语“免疫组织化学测定”包括利用使用荧光显微镜或光学显微镜,与和目标标志物反应的抗体偶联(即缀合)的荧光染料或酶的视觉检测的技术,并且包括但不限于直接荧光抗体测定,间接荧光抗体(IFA)测定,抗补体免疫荧光,抗生物素蛋白-生物素免疫荧光和免疫过氧化物酶测定。例如,IFA测定可用于确定伴侣动物样品是否为 APMNA、APMNA水平阳性的,伴随动物样品是否为pAPMNA、pAPMNA 水平和/或APMNA染色模式(例如,cAPMNA, pAPMNA, NSNA和/或SAPPA 染色模式)阳性的。可以定量样品中APMNA的浓度,例如通过终点滴定或通过测量与已知参考标准相比荧光的视觉强度。

[0168] 在另一个实施方案中,抗体的检测可以利用凝集-PCR (ADAP),例如,如Tsai, et al. ACS Cent. Sci., 2016, 2 (3), pp 139-147所述,例如,使用qPCR 测定法使用抗原-DNA缀合物超灵敏地检测抗体。

[0169] 备选地,可以通过检测或定量纯化标志物的量来确定目标标志物的存在或水平。标志物的纯化可以通过例如高压液相色谱(HPLC),单独或与质谱法(例如,MALDI/MS, MALDI-TOF/MS, 串联MS等)组合来实现。目的标志物的定性或定量检测也可通过众所周知的方法测定,包括但不限于Bradford测定法,考马斯蓝染色法,银染法,放射性标记蛋白质测

定法和质谱法。

[0170] 多个标志物的分析可以与一个测试样品分开或同时进行。对于标志物的单独或顺序测定,合适的装置包括临床实验室分析仪,例如ElecSys (Roche),AxSym (Abbott),Access (Beckman),AD VIA®,CENTAUR® (Bayer),和NICHOLS ADVANTAGE® (Nichols Institute)免疫测定系统。特别有用的物理形式包括具有多个离散的可寻址位置的表面,用于检测多个不同的标志物。这些形式包括蛋白质微阵列,或“蛋白质芯片”和某些毛细管装置(参见例如美国专利号6,019,944)。在这些实施方案中,每个离散表面位置可包含抗体以将用于检测的一种或多种标志物固定在每个位置。表面可备选地包括固定在表面的离散位置的一个或多个离散颗粒(例如,微粒或纳米颗粒),其中微粒包含抗体以固定一种或多种标志物用于检测。

[0171] 关于测试的形式,应该理解,其他诊断测试设备可以适用于本发明的用途。例如,条带测试测定在本领域中是公知的,其中将样品施加到条带的一端并且流体通过毛细管作用迁移到测试区域。样品可以是任何溶液,包括体液(例如全血,血清或血浆,尿液等)。

[0172] 测试区含有固定的结合试剂,用于检测所需的分析物。可以通过本领域技术人员显而易见的任何合适的技术固定试剂。直接连接方法包括非扩散吸附,非扩散吸收,自身包埋在适当位置的微粒附着,和共价结合,例如通过使用溴化氰,羰基二咪唑或戊二醛。如果测试结果为阳性,则测试区将显示阳性结果;即,它会改变颜色,通过“添加”附加条纹来改变条形码。在类似的实施方案中,测试区可以被配置为使得分析物的检测将导致测试区条纹的消失,使得条形码中编码的数据也被改变。

[0173] 通常,怀疑样品含有分析物。分析物通常是特定结合对的一个成员,而条带测试的测试区将包含特定结合对的第二个成员。特异性结合对的成员可包括,例如,诸如抗原,抗体,受体,肽,蛋白质,配体,单链和双链DNA,寡核苷酸,cDNA,mRNA,RNA等物质。分析物可以是单价的(单表位的)或多价的(多表位的),合成的或天然的,抗原性的或半抗原的,并且可以是单一化合物或多个共有至少一个共同的表位或决定位点的化合物。特定结合对的检测可以与测试同时发生,或者可以在一个或多个后续步骤中发生,这取决于测试。

[0174] 可以通过视觉读出或机器辅助读出来检测目标分析物和固定在测试区中的试剂之间的特异性结合对的形成。如果需要可见结果,则可检测指示可以是颜色变化。在其他实施方案中,可检测的指示由酶,荧光团,发色团,放射性同位素,染料,胶体金,胶体碳,胶乳颗粒和化学发光剂产生。在一些实施方案中,可检测的指示对于眼睛是不可见的,但是由合适的设备检测。当特异性结合对是荧光的或放射性的时就是这种情况。

[0175] 检测抗体(包括自身抗体)的方法是已知的,例如使用免疫扩散方法。免疫扩散技术可用于分析大量生物组分,包括抗体,蛋白质,酶和核酸,这取决于所用的特定结合剂。例如,在分析物是抗体的情况下,典型的结合剂是抗原,反之亦然。这些技术包括通过将怀疑含有分析物的溶液通过支持体扩散并通过扩散抗原来筛选分析物的存在。样品中包含的分析物最终与溶液中的抗原反应,产生复杂的分析物-抗原。抗原和分析物之间的这种复合物可以通过各种指标来检测。例如,夹心免疫测定技术涉及形成抗原-分析物-标记的三元复合物,其可通过视觉,放射性,光谱或其他方法检测。在又一个实例中,复合分析物-抗原可以产生由免疫扩散产生的沉淀区,其可以进行直接定量测量,例如光强度的定量光学测量。

[0176] 上文描述了酶联免疫吸附测定(ELISA)方法。为了检测本发明的内源性抗体,例

如,将内源性抗原的抗原附着于表面。然后,使样品与抗原接触,所述抗原充当诱饵以结合内源性抗体,并且在表面上施加另外的特异性抗体,其可以结合内源性抗体。该抗体与酶连接,并且在最后的步骤中,添加含有酶底物的物质。随后的反应产生可检测的信号,最常见的是基质中的颜色变化。

[0177] 蛋白质印迹技术可用于分析大量生物组分。例如,通常用十二烷基硫酸钠(SDS),尿素或者用还原剂如2-巯基乙醇等溶解目的抗原或抗原混合物。溶解后,通过电泳在聚丙烯酰胺凝胶上分离材料,然后将抗原电泳转移到支持物上,在那里它们被不可逆地结合。将膜暴露于怀疑含有分析物的样品中。样品中包含的分析物最终与抗原反应,产生复合物分析物-抗原。抗原和分析物之间的复合物可以通过多种指标检测,例如标记的检测抗体。在另一个实例中,将抗原与怀疑含有分析物的样品接触。然后通过电泳在非变性聚丙烯酰胺凝胶上运行该复合物,然后将抗原电泳转移到支持物上,在那里它被不可逆地结合。抗原和分析物之间的复合物可以通过多种指标检测,例如标记的检测抗体。在又一个实例中,将抗原与怀疑含有分析物的样品接触。然后将该复合物转移到支持物,在那里它被不可逆地结合。抗原和分析物之间的复合物可以通过多种指标检测,例如标记的检测抗体。

[0178] 抗独特型抗体技术可用于分析大量生物组分。例如,从一个或多个个体中分离结合IBD相关抗原的抗体,并将其注射到哺乳动物中,例如小鼠,山羊,兔等。得到的抗独特型多克隆或单克隆抗体用于测定中以检测个体中针对IBD相关抗原的抗体。例如,该测定法用于检测样品中包含的分析物的存在的竞争方法。该测定法包括将抗原与抗独特型抗体和从个体收集的样品中存在的未知量的分析物一起温育,其中抗原是酶标记的或间接检测的,其中通过比较其与抗原的结合被添加抗独特型抗体所取代的程度与用已知量的分析物或其衍生物获得的校准曲线来确定样品中分析物的存在。通过与来置换。

[0179] 可以使用基于迁移率变动测定的技术来检测和定量针对任何种类样品中存在的特异性抗原的自身抗体或任何其他类型的抗体。可以通过使用大小排阻层析(常规或高效液相层析)或依赖于不同迁移性质的任何方法对样品进行差异分离。基本上,待分析的样品将与已经用任何标准标记方法(即荧光团,有色底物,酶或其他)标记的特定抗原接触,并进一步进行大小排阻层析或基于游离与结合抗原的差异物理特性的任何其他方法。

[0180] 除了用于确定各种目的标志物的存在或水平的上述测定之外,使用常规技术如Northern分析,逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)或基于与标志物编码序列的一部分互补的核酸序列杂交(例如,狭缝印迹杂交)核酸序列杂交的任何其他方法的标志物mRNA水平的分析也在本发明的范围内。一般的核酸杂交方法描述于Anderson, "Nucleic Acid Hybridization," BIOS Scientific Publishers, 1999中。多个转录的核酸序列(例如, mRNA或cDNA)的扩增或杂交也可以从排列在微阵列中的mRNA或cDNA序列进行。微阵列方法一般描述于Hardiman, "Microarrays Methods and Applications: Nuts & Bolts," DNA Press, 2003; 和Baldi, P and G. Westley., "DNA Microarrays and Gene Expression: From Experiments to Data Analysis and Modeling," Cambridge University Press, 2002。

[0181] 可以使用本领域已知的技术进行标志物(例如遗传标志物)的基因型分析,包括但不限于基于聚合酶链反应(PCR)的分析,序列分析和电泳分析。基于PCR的分析的非限制性实例包括可从Applied Biosystems获得的Taqman®等位基因鉴别测定。序列分析的非限制性实例包括Maxam-Gilbert 测序, Sanger测序, 毛细管阵列DNA测序, 热循环测序, 固相测

序,质谱测序,例如基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF/MS),和通过杂交测序。

[0182] 电泳分析的非限制性实例包括平板凝胶电泳,例如琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳,毛细管电泳和变性梯度凝胶电泳。用于在标志物中的多态性位点对个体进行基因分型的其他方法包括例如来自Third Wave Technologies, Inc的INVADER®测定,限制性片段长度多态性(RFLP)分析,等位基因特异性寡核苷酸杂交,异源双链体迁移率测定,和单链构象多态性(SSCP)分析。

[0183] 可以将几种目的标志物组合成一种测试,以有效处理多个样品。另外,本领域技术人员将认识到测试来自同一患者的多个样品(例如,在连续时间点等)的值。对连续样品的这种测试可以允许识别标志物水平随时间的变化。标志物水平的增加或减少,以及标志物水平的变化的缺失,也可以提供有用的信息以分类IBD或区分IBD的临床亚型。

[0184] 可以构建由上述一种或多种标志物组成的组,以提供与本发明的方法相关的相关信息,用于将伴侣动物样品分类为与IBD或其临床亚型相关。这样的组可以使用1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,25,30,35,40,或更多个体标志物构建。单个标志物或标志物亚组的分析也可由本领域技术人员在各种临床环境中进行。

[0185] 标志物的分析也可以以各种物理形式进行。例如,可以使用微量滴定板或自动化来促进大量测试样品的处理。或者,可以开发单一样本形式以便及时地进行治疗和诊断。

[0186] 在一个方面,本发明涉及用于检测样品中如上所述的抗体,例如,炎症相关的自身抗体或IBD相关抗体的试剂盒,其包含:

[0187] i. 一种或多种如上所述的肽试剂;和

[0188] ii. 用于检测肽与IBD相关抗体或炎症相关自身抗体之间形成的复合物的手段。

[0189] 试剂盒可含有即用型试剂,并且有利地在数小时内,例如小于6小时内获得测试结果。例如,试剂盒可包含所有即用型试剂,包括包被的平板,阴性和阳性对照,洗涤溶液,样品稀释剂,缀合物,TMB和终止溶液。在一些实施方案中,如上所述,用肽抗原包被测试的固相。肽抗原可以化学合成或在大肠杆菌或其他合适的细菌表达系中表达。在该方法和测试试剂盒中,可以使用任何已知和有用的固相。例如,可以使用MaxiSorp或PolySorp(Thermo Fisher Scientific)并通过施加具有例如5,7或9.5的pH的包被缓冲液进行包被。抗原的施用量为0.1,0.5,1,2,3或4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。可以使用稀释剂,例如(i) 0.14M NaCl,2.7mM KCl,Kathon 0.03%,吐温20 0.1%.;or(ii) 2% MgCl₂,6%吐温20和6%A0,0.5%酪蛋白钠盐。将检测抗体稀释,例如1:10000或1:20000稀释。

[0190] 方法步骤将根据需要应用,并且可以根据所应用的特定试剂而变化。在一个实施方案中,条件和方法步骤如下:

[0191] a) 样品稀释液(MgCl₂ 2%,A0 6%,吐温20 6%,酪蛋白0.5%)中的样品(1:10),100 μl /孔;

[0192] b) 在潮湿的室内温育1小时,室温;

[0193] c) 3次洗涤(含0.1%吐温20的磷酸缓冲盐水);

[0194] d) 即用型缀合物,100 μl /孔;

[0195] e) 在潮湿的室内室温温育1小时;

[0196] f) 3次洗涤(含有0.1%吐温20的磷酸缓冲盐水);

- [0197] g) TMB 100ul/孔,温育10分钟,室温;
- [0198] h) 加入终止溶液(100μl/孔);和
- [0199] i) 450nm下读数。
- [0200] 在一些实施方案中,样品稀释剂含有浓度为0.1至0.55%的酪蛋白钠盐。例如,样品稀释剂可含有0.5%酪蛋白钠盐和MgCl₂,例如浓度为2%。
- [0201] 在一些实施方案中,检测方法和/或试剂盒的特征在于包含特定化合物,捕获抗原的特定稀释液的使用和/或包被在用于本发明的检测方法和试剂盒的固体支持物上的捕获抗原的特定数量和质量。
- [0202] 在一些实施方案中,选择抗原稀释液以在包被溶液中的浓度为0.25至 5μg/ml,例如0.5至1μg/ml。包被步骤例如在pH5至10,例如约5、7或9.5下进行。在一些实施方案中,说明书和实施例中描述的抗原以0.1,0.5,1,2 或4μg/ml,例如1μg/ml的量使用。
- [0203] 在一些实施方案中,检测方法和试剂盒包含吐温,例如吐温20或可比较物质,例如具有可比特性的去污剂。例如,该物质的含量为0.05至0.5 %,例如0.1至0.2%。
- [0204] 在一些实施方案中,包被步骤的洗涤溶液含有NaCl 0.14M,KCl 2.7 mM;Kathon 0.03%,吐温20 0.1%,样品稀释剂包含MgCl₂ 2%,氨氧化物 (aminoxid) (AO) 6%,吐温20 6%和0.5%酪蛋白。例如,缀合物(其中患者是狗时,抗犬Ab缀合物)以1:10 000至1:30 000的稀释度使用,例如,在缀合物稳定缓冲液中以1:20 000使用,作为即用型形式。
- [0205] 本文所述的免疫测定可以配置在试剂浸渍的测试条中,其中以最低程度的技能和参与以快速且方便的方式进行特异性结合测定。
- [0206] 例如,制备具有一个或多个检测区的测试条,其中针对怀疑存在于样品中的分析物的特异性结合试剂(标记的或未标记的)被固定。将血清(或任何其他体液)样品施加到测试条的一部分上,所述测试条包含干燥载体(例如硝酸纤维素或任何其他能够快速吸收液体的吸水的、多孔的或纤维材料)并且允许借助于诸如磷酸盐缓冲液等的洗脱液渗透通过条带材料。样品进行通过检测区,其中固定了特异性结合试剂。
- [0207] 在某些实施方案中,固定化试剂可包含抗原或多种抗原,其将结合存在于来自具有IBD的狗的样品中的某些IBD相关抗体,例如OmpC和/或鞭毛蛋白抗原,例如,(i) 细菌OmpC蛋白或其抗原性片段,其包含选自SEQ ID NOS 16,17和18的序列中的至少10个(例如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸;和/或(ii) 细菌鞭毛蛋白或其抗原片段,其包含选自SEQ ID NOS 9-13的序列中的至少10个(例如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸。在一个具体实施方案中,固定化试剂含有至少一种OmpC抗原和至少一种鞭毛蛋白抗原。
- [0208] 在一些实施方案中,固定化试剂可以另外地或备选地包含抗原或多种抗原,其将结合来自患有炎症病症的患者的样品中存在的某些炎症相关的自身抗体,例如钙卫蛋白或抗原片段,其包含来自野生型钙卫蛋白,例如来自伴侣动物钙卫蛋白,例如SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20,SEQ ID NO: 21,SEQ ID NO:22中的任一个,或其任何组合的序列中的至少10个(例如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸,和/或整联蛋白或其抗原性片段,包含来自野生型整联蛋白,例如来自伴侣动物整联蛋白,例如, SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:32或其任何组合中的任一的序列中至少10个(例如,至少20个,例如,至少30个)连续的氨基酸。
- [0209] 在一些实施方案中,固定化试剂还包含阳性对照,例如,将结合血清中所有或几乎

所有伴侣动物物种的存在的抗体的共同抗原。

[0210] 因此,样品中存在的炎症相关的自身抗体和/或IBD相关抗体可以变得在检测区内与固定的抗原结合。如此结合的抗体能够参与夹心反应,其中应用第二标记的结合试剂(例如,与辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶等共价连接的二级抗体),其作为给定分析物的特异性结合配偶体起作用。标记试剂,分析物(如果存在)和固定的未标记特异性结合试剂在夹心反应中一起配合。两种结合试剂必须对分析物上的不同表位具有特异性。检测区产生的颜色可以通过眼睛或使用光折射计读取。可以通过测试特异性结合试剂的混合物来开发测试的定量变体。或者,聚合物颗粒(例如胶乳)可以用试剂(例如蛋白质抗原或抗体)着色和敏化,并用于检测已经沉积在检测区域中的样品中存在的特定分析物。可以将测试部位的显色与一种或多种标准或内部对照的颜色进行比较。

[0211] 概括地说,该实施例的条带测试池和方法可用于检测迄今为止已使用已知免疫测定方法测定的或已知可通过此类方法检测的任何分析物,使用多克隆或单克隆抗体或包含这些分析物的结合位点的其他蛋白质。用于实施本发明的多种特定测定方案,试剂和分析物本身是已知的,参见例如美国专利号4,446,232和美国专利号4,868,108。

[0212] VIII. 统计算法

[0213] 在一些方面,本发明提供了通过使用统计算法或过程用于分类伴侣动物样品是否与IBD相关的方法、系统和代码,其中使用所述统计算法或统计过程,将样品分类为IBD样品或非IBD样品;在其他方面,本发明提供了通过使用统计算法或过程用于分类样本是否与LBD的临床亚型相关(即,区分LPE,EGE或GE),其中使用所述算法或过程,将样本分类为LPE样本、EGE样品,GE样品或非IBD样品。所述统计算法或过程独立地可以包括一个或多个学习统计分类器系统。如本文所述,学习统计分类器系统的组合有利地提供改进的灵敏度,特异性,阴性预测值,阳性预测值和/或总体准确度,用于分类样品是否与IBD或其临床亚型相关。

[0214] IX. 检测伴侣动物中IBD标志物的方法

[0215] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于检测样品中与炎症相关的一种或多种内源性抗体的存在和/或水平的方法(方法1),其中样品可以例如选自全血、血清,血浆,粪便和肠道组织中的一种或多种;其中所述样品从伴侣动物患者(例如狗或猫)获得,其中所述内源性抗体选自以下之一或多项:

[0216] 钙卫蛋白的自身抗体,

[0217] β -整联蛋白的自身抗体,

[0218] 乳铁蛋白的自身抗体,

[0219] C反应蛋白的自身抗体,

[0220] 针对多形核白细胞(PMNs或粒细胞,包括嗜中性粒细胞)的内源性抗体,和/或

[0221] 针对胃肠道中的微生物的内源性抗体,

[0222] 所述方法包括:

[0223] 使一种或多种抗原与所述样品接触,其中所述一种或多种抗原对目的内源性抗体具有特异性,并且其中所述一种或多种抗原与基质或可检测标记结合,和

[0224] 检测所述一种或多种与炎症相关的内源性抗体与该一种或多种抗原的结合,

[0225] 任选地,将所述样品分类为炎症样品或非炎症样品,其中与炎症相关的一种或多

种内源性抗体的存在或水平,单独或组合,与炎症的存在相关。

[0226] 例如

[0227] 1.1.方法1,其是用于在样品中检测与炎症相关的一种或多种内源性抗体的存在和/或水平的方法,所述内源性抗体为例如与炎性肠病相关的内源性抗体(IBD相关抗体),其中所述样品获自患者,例如伴侣动物患者(例如狗或猫),例如其中样品选自全血,血清,血浆,粪便和肠道组织中的一种或多种;该方法包括以下步骤:

[0228] a.使结合基质或可检测标记物的一种或多种抗原与所述样品接触,并检测所述一种或多种IBD相关抗体与所述一种或多种抗原的结合;和/或

[0229] b.使标记的抗体与所述样品接触,其中标记的抗体与来自伴侣动物的物种的免疫球蛋白特异性结合,并检测标记的抗体与所述一种或多种IBD相关抗体的结合;

[0230] C.任选地,将所述样品分类为IBD样品或非IBD样品,其中所述一种或多种IBD相关抗体的存在或水平,单独地或组合地,与IBD的存在相关。

[0231] 1.2.任何前述方法,包括使用标记抗体的步骤,所述标记抗体特异性结合来自患者物种的免疫球蛋白,以检测结合了抗原的该一种或多种与炎症相关的内源性抗体。

[0232] 1.3.任何前述方法,其中伴侣动物患者是猫,狗或马,例如狗。

[0233] 1.4.任何前述方法,其中样品是全血,血清或血浆。

[0234] 1.5.任何前述方法,其中患者中炎症的存在,严重程度和/或类型与抗体类别从IgG至IgA的转换相关,例如由此一种或多种与炎症相关的内源性抗体的比例在健康动物中较高且在炎症动物中较低。

[0235] 1.6.任何前述方法,其中一种或多种与炎症相关的内源性抗体是IgA抗体。

[0236] 1.7.任何前述方法,其是选自酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫组织化学测定和免疫荧光测定的免疫测定。

[0237] 1.8.任何前述方法,其中患者是狗或猫,其中炎症是与IBD相关的炎症,并且其中内源性抗体包括一种或多种IBD相关抗体,选自针对多形核白细胞(PMN或粒细胞,包括嗜中性粒细胞),和/或针对胃肠道中发现的微生物的内源性抗体。

[0238] 1.9.任何前述方法,其中内源性抗体包括一种或多种IBD相关抗体,其中所述一种或多种IBD相关抗体选自在所述样品中的抗PMN抗体,抗酵母抗体,抗微生物抗体及其组合。

[0239] 1.10.任何前述方法,其中内源性抗体包括一种或多种IBD相关抗体,其中所述一种或多种IBD相关抗体包括以下的一种或多种:

[0240] a)抗PMN抗体,选自抗PMN抗体(APMNA)、核周抗PMN抗体(pAPMNA)及其组合;

[0241] b)抗酵母抗体,选自抗酵母免疫球蛋白A(AYA-IgA),抗酵母免疫球蛋白G(AYA-IgG),抗酵母免疫球蛋白M(AYA-IgM)及其组合;

[0242] c)抗微生物抗体,选自抗外膜蛋白C(ACA)抗体,抗鞭毛蛋白抗体(AFA)及其组合。

[0243] 1.11.任何前述方法,其中内源性抗体包括一种或多种IBD相关抗体,其中所述一种或多种IBD相关抗体包括结合细菌鞭毛蛋白上的一个或多个表位的抗鞭毛蛋白抗体(AFA),其中所述细菌鞭毛蛋白由基因编码,所述基因能够利用选自SEQ ID NO:1,3,5和7中的一个或多个的第一引物和选自SEQ ID NOS 2,4,6和8中的一个或多个的第二引物扩增。

[0244] 1.12.任何前述方法,其中内源性抗体包括一种或多种IBD相关抗体,其中所述一种或多种IBD相关抗体包括结合细菌鞭毛蛋白或其片段上的一个或多个表位的抗鞭毛蛋白

抗体 (AFA), 其中所述鞭毛蛋白或其片段包含选自 SEQ ID NOS 9-13 的序列中的至少 10 个 (例如, 至少 20 个, 例如, 至少 30 个) 连续氨基酸。

[0245] 1.13. 任何前述方法, 其中内源性抗体包括一种或多种 IBD 相关抗体, 其中所述一种或多种 IBD 相关抗体包括结合细菌外膜蛋白 C 上的一个或多个表位的抗外膜蛋白 C 抗体 (ACA), 其中所述外膜蛋白 C 由能够利用对应于 SEQ ID NOS 14 和 15 的引物扩增的基因编码。

[0246] 1.14. 任何前述方法, 其中内源性抗体包括一种或多种 IBD 相关抗体, 其中所述一种或多种 IBD 相关抗体包括结合细菌外膜蛋白 C 或其片段上的一个或多个表位的抗外膜蛋白 C 抗体 (ACA), 其中所述外膜蛋白 C 或其片段包含选自 SEQ ID NOS 16, 17 和 18 的序列中的至少 10 个 (例如, 至少 20 个, 例如, 至少 30 个) 连续氨基酸。

[0247] 1.15. 任何前述方法, 其中内源性抗体包括一种或多种 IBD 相关抗体, 其中所述一种或多种 IBD 相关抗体选自 APMNA, pAPMNA, AYA-IgA, AYA-IgG, ACA 或 AFA。

[0248] 1.16. 任何前述方法, 其中伴侣动物患者表现出一种或多种下列症状:

[0249] a. 便血;

[0250] b. 粪便钙卫蛋白水平升高;

[0251] c. 粪便乳铁蛋白水平升高;

[0252] d. 贫血;

[0253] e. 腹泻;

[0254] f. 呕吐;

[0255] g. 食欲不振; 或

[0256] h. 近期体重明显减轻。

[0257] 1.17. 任何前述方法, 还包括确定粪便中钙卫蛋白或乳铁蛋白的存在或水平, 例如, 确定粪便中钙卫蛋白的存在或水平, 例如, 其中钙卫蛋白的水平与肠道炎症相关。

[0258] 1.18. 任何前述方法, 其中伴侣动物患者是纯种猫、或选自以下品种的纯种狗或混种狗, 其中狗的品种选自德国牧羊犬 (German Shepherds), 约克夏梗 (Yorkshire Terriers), 可卡犬 (Cocker Spaniels), 贝吉生犬 (Basenjis), 软毛淡黄爹利 (Soft Coated Wheaten Terriers) 和沙皮犬 (Shar-Peis), 例如, 其中在对样本进行分类时考虑狗的品种。

[0259] 1.19. 任何前述方法, 其中伴侣动物患者的年龄大于 2 岁, 例如大于 5 岁。

[0260] 1.20. 任何前述方法, 其中所述患者对抗生素治疗没有反应。

[0261] 1.21. 任何前述方法, 其中伴侣动物患者中 IBD 的存在, 严重性和/或类型与抗体类别从 IgG 至 IgA 的转换相关, 例如, 其中抗细菌抗原 (例如 OmpC 或 flagelin 抗原) 的 IgG 抗体的比例, 例如相对于抗相同抗原的 IgA 抗体而言, 在健康动物中较高, 在具有 IBD 的动物中较低。

[0262] 1.22. 任何前述方法, 还包括将统计算法应用于所述一种或多种 IBD 相关抗体的存在或水平, 以获得所述患者的诊断或预后概况, 其中特定 IBD 相关抗体的存在或相对水平与 IBD 的存在、类型或严重程度相关。

[0263] 1.23. 任何前述方法, 还包括对所述一种或多种 IBD 相关抗体的存在或水平、以及粪便钙卫蛋白或粪便乳铁蛋白中的一种或多种的存在或水平应用统计算法, 以获得所述患者的诊断或预后概况, 其中特定 IBD 相关抗体的存在或相对水平, 联合粪便钙卫蛋白或粪便乳铁蛋白中的一种或多种的存在或水平, 与 IBD 的存在、类型或严重性相关。

[0264] 1.24.任何前述方法,其中所述患者被诊断为患有淋巴浆细胞性肠炎(lymphoplasmacytic enteritis,LPE)、嗜酸性粒细胞性胃肠炎(eosinophilic gastroenteritis,EGE)或肉芽肿性肠炎(granulomatous enteritis,GE)。

[0265] 1.25.任何前述方法,其中所述一种或多种IBD相关抗体选自在所述样品中的抗PMN抗体,抗酵母抗体,抗微生物抗体及其组合。

[0266] 1.26.任何前述方法,其中所述一种或多种IBD相关抗体包含选自下组的抗PMN抗体:抗PMN抗体(APMNA),核周抗PMN抗体(pAPMNA)及其组合。

[0267] 1.27.任何前述方法,其中所述一种或多种IBD相关抗体包括选自抗酵母免疫球蛋白A(AYA-IgA),抗酵母免疫球蛋白G(AYA-IgG),抗酵母免疫球蛋白M(AYA-IgM)及其组合的抗酵母抗体。

[0268] 1.28.任何前述方法,其中所述一种或多种IBD相关抗体包括选自抗外膜蛋白C(ACA)抗体,抗鞭毛蛋白抗体(AFA)及其组合的抗微生物抗体。

[0269] 1.29.任何前述方法,其中所述一种或多种IBD相关抗体包括结合细菌鞭毛蛋白上的一个或多个表位的抗鞭毛蛋白抗体(AFA),其中所述鞭毛蛋白由基因编码,所述基因能够利用选自SEQ ID NOS 1,3,5和7中的一个或多个的第一引物和选自SEQ ID NO 2,4,6和8中的一个或多个的第二引物扩增。

[0270] 1.30.任何前述方法,其中所述一种或多种IBD相关抗体包括与细菌鞭毛蛋白或其片段上的一个或多个表位结合的抗鞭毛蛋白抗体(AFA),其中所述鞭毛蛋白或其片段包含选自SEQ ID NOS 9-13的序列中的至少10个(例如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸。

[0271] 1.31.任何前述方法,其中所述一种或多种IBD相关抗体包括抗外膜蛋白C抗体(ACA),其结合由能够通过引物扩增的基因编码的细菌外膜蛋白C上的一个或多个表位,其中所述引物对应于SEQ ID NOS 14和15。

[0272] 1.32.任何前述方法,其中所述一种或多种IBD相关抗体包括针对来自伴侣动物患者物种的胃肠道细菌的抗原的抗体。

[0273] 1.33.任何前述方法,其中所述一种或多种IBD相关抗体包括针对来自伴侣动物患者物种的胃肠道的革兰氏阴性细菌的抗原的抗体。

[0274] 1.34.任何前述方法,其中所述一种或多种IBD相关抗体包括针对来自伴侣动物患者物种的胃肠道的细菌的抗原的抗体,其中所述细菌是选自以下一种或多种的物种:假单胞菌(*Pseudomonas*) (铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*),蒙氏假单胞菌 (*Pseudomonas monteilii*),海雀假单胞菌 (*Pseudomonas lundensis*)/腐臭假单胞菌 (*Pseudomonas taetrolens*), *Pseudomonas mosselii*,霉味假单胞菌 (*Pseudomonas mucidolens*)/类黄假单胞菌 (*Pseudomonas synxantha*),荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) A,栖木槿假单胞菌 (*Pseudomonas hibiscicola*),铁角蕨假单胞菌 (*Pseudomonas asplenii*)/恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*),嗜麦芽窄食单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*),缺陷短波单胞菌 (*Brevundimonas diminuta*),嗜根寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas rhizophila*),埃希氏菌 (*Escherichia*) (大肠杆菌 (*Escherichia coli*),费格森埃希氏菌 (*Escherichia fergusonii*)),变形杆菌 (*Proteus*) (*Proteus mirabilis*),肠杆菌 (*Enterobacter*) (霍氏肠杆菌 (*Enterobacter*

hormaechei)), 不动杆菌 (Acinetobacter) (不动杆菌基因种 10 (Acinetobacter genomospecies 10), 不动杆菌基因种11 (Acinetobacter genomospecies 11)), 鞘氨醇杆菌 (Sphingobacterium) (食醇鞘氨醇杆菌 (Sphingobacterium spiritivorum)), 和克雷伯氏菌 (Klebsiella) (肺炎克雷伯氏菌 (Klebsiella pneumonia)); 肠球菌 (Enterococcus) (粪肠球菌 (Enterococcus faecalis) 和尿肠球菌 (Enterococcus faecium)), 和乳杆菌 (Lactobacillus) (约氏乳杆菌 (Lactobacillus johnsonii)); 例如, 其中细菌包括至少一种假单胞菌属物种。

[0275] 1.35. 任何前述方法, 其中所述一种或多种IBD相关抗体包括抗外膜蛋白C抗体 (ACA), 其结合细菌外膜蛋白C或其片段上的一个或多个表位, 其中所述外膜蛋白C或其片段包含至少10个 (例如, 至少20个, 例如, 至少30个) 选自SEQ ID NOS 16, 17和18的序列中的连续氨基酸。

[0276] 1.36. 任何前述方法, 其中所述一种或多种IBD相关抗体选自APMNA, pAPMNA, AYA-IgA, AYA-IgG, ACA或AFA。

[0277] 1.37. 任何前述方法, 其中所述一种或多种IBD相关抗体是IgA抗体。

[0278] 1.38. 任何前述方法, 其中用于检测一种或多种IBD相关抗体的存在或水平的免疫测定是酶联免疫吸附测定 (ELISA)。

[0279] 1.39. 任何前述方法, 其中用于检测一种或多种IBD相关抗体的存在或水平的免疫测定是免疫组织化学测定。

[0280] 1.40. 任何前述方法, 其中用于检测一种或多种IBD相关抗体的存在或水平的免疫测定是免疫荧光测定。

[0281] 1.41. 任何前述方法, 其中所述样品选自血清, 血浆和全血。

[0282] 1.42. 任何前述方法, 其中将所述样品分类为IBD样品或非IBD样品的步骤使用选自以下的统计算法进行: 分类回归树 (classification and regression tree), 增强树 (boosted tree), 神经网络 (neural network), 随机森林 (random forest), 支持向量机 (support vector machine), 一般卡方自动交互检测器模型 (general chi-squared automatic interaction detector model), 互动树 (interactive tree), 多元自适应回归样条 (multiadaptive regression spline), 机器学习分类器 (machine learning classifier) 及其组合。

[0283] 1.43. 任何前述方法, 包括: (a) 确定样品中选自抗多形核白细胞 (PMN) 抗体, 抗微生物抗体, 钙卫蛋白及其组合的至少一种标记物的存在或水平; (b) 使用统计算法基于至少一种标记物的存在或水平, 将样品分类为IBD 样品或非IBD样品。

[0284] 1.44. 任何前述方法, 包括使用结合IBD相关抗体的标记的抗体, 检测包含IBD相关抗体和抗原的复合物。

[0285] 1.45. 任何前述方法, 其中结合到基质或可检测标记的一种或多种抗原包含任何试剂1, 如下文所述。

[0286] 1.46. 任何前述方法, 其中与基质结合的一种或多种抗原包括细菌外膜蛋白C或其片段, 其包含选自SEQ ID NOS 16, 17和18的序列中的至少 10个 (例如, 至少20个, 例如, 至少30个) 连续氨基酸, 任选地与聚组氨酸标签 (例如N-末端六组氨酸标签) 结合, 例如任选地包含一个或多个溶解度增强残基, 例如SEQ ID NO 33或SEQ ID NO 36的N-末端序列, 例如

SEQ ID NO 35的抗原。

[0287] 1.47.任何前述方法,其中与基质结合的一种或多种抗原包括细菌鞭毛蛋白或其片段,其包含选自SEQ ID NOS 9-13的序列中的至少10个(例如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸,任选地与聚组氨酸标签(例如 N-末端六组氨酸标签)结合,例如任选地包含一个或多个溶解度增强残基,例如SEQ ID NO 33或SEQ ID NO 36的N-末端序列,例如,SEQ ID NO 34 的抗原。

[0288] 1.48.任何前述方法,还包括检测一种或多种炎性标志物的自身抗体的存在或水平,所述抗体例如选自钙卫蛋白, β -整联蛋白,乳铁蛋白和C-反应蛋白的自身抗体,例如,根据方法A及后续中的任一种,包括方法 A-1及后续中的任何一种。

[0289] 1.49.任何前述方法,其中与基质或可检测标记结合的一种或多种抗原包括SEQ ID NO 19的抗原和SEQ ID NO 35的抗原。

[0290] 1.50.任何前述方法,其中一种或多种抗原与一种或多种基质结合,其中基质包括一个或多个微孔板,由此在期望检测与不同抗原的结合时,不同的抗原可以在不同的微孔板上或在相同微孔板的不同孔中;例如其中微孔板是具有多个样品孔的平板或条带,例如6,24,96,384或1536个样品孔,例如,其中微孔板的每个孔具有10n1至1ml之间的体积,例如50 μ l 至500 μ l的体积。

[0291] 1.51.任何前述方法,其中一种或多种抗原与一个或多个基质结合,包括以下步骤:

[0292] a.将一种或多种抗原固着在其相应的基质上,

[0293] b.用蛋白质例如牛血清白蛋白阻断基质上的任何未包被的表面,

[0294] c.将抗原暴露于样品以形成抗原-抗体复合物,

[0295] d.将由此形成的抗原-抗体复合物暴露于标记的抗体,所述标记抗体为与来自患者物种的免疫球蛋白(例如IgA)结合的抗体,例如辣根过氧化物酶(HRP)-抗IgA抗体;

[0296] e.检测标记抗体与抗原-抗体复合物的结合,

[0297] 例如,其中在步骤a-d的每一步之后用缓冲液洗涤基质。

[0298] 1.52.任何前述方法,包括将来自患者的样品分类为与患者中的炎性疾病(例如炎性肠病(IBD))“一致”,或与该炎性疾病“不一致”,其中样品中与该一种或多种抗原结合的IgA的存在和/或水平,单独或组合地,与患者中的该炎性疾病的存在相关。

[0299] 在另一个实施方案中,本发明提供诊断IBD的方法,包括根据方法1 及后续的一个方法,分别或组合检测一种或多种IBD相关抗体的存在和 /或水平。

[0300] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种分类伴侣动物是否与IBD的临床亚型相关的方法,该方法包括:(a)确定选自以下的至少一种标记物在样品中的存在或水平:抗PMN抗体,抗微生物抗体,钙卫蛋白及其组合;(b)使用统计算法,基于至少一种标记物的存在或水平,将样本分类为淋巴浆细胞性(LPE)IBD、嗜酸性粒细胞性胃肠炎(EGE)IBD或肉芽肿性(GE)IBD、或非IBD样品;例如使用方法1及后续中的任何一个方法。

[0301] 在另一个方面,本发明提供了一种用于监测伴侣动物中IBD的进展或消退的方法,该方法包括:(a)在来自个体的样品中确定选自以下的至少一种标记物的存在或水平:抗-PMN抗体,抗微生物抗体,钙卫蛋白及其组合;(b)使用统计算法,基于至少一种标记物的存在或水平,确定伴侣动物中IBD的存在或严重程度;例如使用方法1及后续的任何方法。

[0302] 在一个相关方面,本发明提供了用于在接受可用于治疗IBD的药物的伴侣动物中监测药物功效的方法,该方法包括:(a)在来自个体的样品中确定选自以下的至少一种标记物的存在或水平:抗PMN抗体,抗微生物抗体,钙卫蛋白及其组合;(b)使用统计算法,基于至少一种标记物的存在或水平,确定个体中IBD的存在或严重性。

[0303] 在另一个实施方案中,本发明提供了试剂(试剂1),其包含来自以下之一或多个肽的氨基酸序列:

[0304] a.分离的肽,其是来自伴侣动物患者物种中流行的细菌的细菌鞭毛蛋白或其抗原片段,例如,包含选自SEQ ID NOS 9-13的序列中的至少10个(例如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸,其中该细菌鞭毛蛋白或其抗原片段与标记、纯化标签、固体基质、或另一细菌鞭毛蛋白或其片段中的一种或多种结合;例如,其中该细菌鞭毛蛋白或其片段与聚组氨酸标签(例如N-末端六组氨酸标签)结合,例如,任选地包含一个或多个溶解度增强残基,例如,SEQ ID No 33或SEQ ID NO 36的N-末端序列,例如SEQ ID NO 34的鞭毛蛋白融合蛋白;和

[0305] b.分离的肽,其是细菌外膜蛋白C或其抗原片段,例如,包含选自 SEQ ID NOS 16, 17和18的序列中的至少10个(例如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸,其中该细菌外膜蛋白C或其片段与标记、纯化标签、固体基质、或另一细菌外膜蛋白C或其片段中的一种或多种结合;例如,其中细菌外膜蛋白C或其片段与聚组氨酸标签(例如N-末端六组氨酸标签)结合,例如,任选地包含一个或多个溶解度增强残基,例如SEQ ID NO 33或SEQ ID NO 36的N-末端序列,例如SEQ ID NO 35的OmpC 融合蛋白。

[0306] 例如,本发明在一个方面提供了试剂1,其中所述试剂是杂合抗原(heteroantigen),例如,其中所述试剂包含来自至少两种不同来源的序列,例如

[0307] (i)来自至少两种不同的细菌鞭毛蛋白或其抗原性片段,例如,如本文所述,例如,各自来自伴侣动物患者物种中流行的细菌,例如,包含选自SEQ ID NOS 9-13的序列中的至少10个(例如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸,其中细菌鞭毛蛋白或其抗原片段与标记、纯化标签、固体基质、或另一细菌鞭毛蛋白或其片段中的一种或多种结合;例如,其中该细菌鞭毛蛋白或其片段与聚组氨酸标签(例如N-末端六组氨酸标签)结合,例如,任选地包含一个或多个溶解度增强残基,例如,SEQ ID NO 33 或SEQ ID NO 36的N-末端序列;

[0308] (ii)来自至少两种不同的细菌外膜蛋白C或其抗原片段,例如,如本文所述,例如,各自来自细菌外膜蛋白C或其抗原片段,例如,包含选自SEQ ID NOS 16,17和18的序列中的至少10个(例如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸,其中该细菌外膜蛋白C或其片段与标记、纯化标签、固体基质、或另一细菌外膜蛋白C或其片段中的一种或多种结合;例如,其中该细菌外膜蛋白C或其片段与聚组氨酸标签(例如N-末端六组氨酸标签)结合,例如,任选地包含一个或多个溶解度增强残基,例如SEQ ID NO 33或SEQ ID NO 36的N-末端序列;和/或

[0309] (iii)来自至少一种这样的细菌鞭毛蛋白或其抗原片段,和至少一种这样的细菌外膜蛋白C或其抗原片段。

[0310] 例如,在一些实施方案中,本发明在一个方面提供了试剂1,其中细菌鞭毛蛋白或细菌外膜蛋白C来自选自以下之一或多种的物种:假单胞菌(*Pseudomonas*) (铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),蒙氏假单胞菌(*Pseudomonas monteilii*),海雀假单胞菌

(*Pseudomonas lundensis*) / 腐臭假单胞菌 (*Pseudomonas taetrolens*), *Pseudomonas mosselii*, 霉味假单胞菌 (*Pseudomonas mucidolens*) / 类黄假单胞菌 (*Pseudomonas synxantha*), 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) A, 栖木槿假单胞菌 (*Pseudomonas hibiscicola*), 铁角蕨假单胞菌 (*Pseudomonas asplenii*) / 恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*), 嗜麦芽窄食单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*), 缺陷短波单胞菌 (*Brevundimonas diminuta*), 嗜根寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas rhizophila*), 埃希氏菌 (*Escherichia*) (大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 费格森埃希氏菌 (*Escherichia fergusonii*)), 变形杆菌 (*Proteus*) (*Proteus mirabilis*), 肠杆菌 (*Enterobacter*) (霍氏肠杆菌 (*Enterobacter hormaechei*)), 不动杆菌 (*Acinetobacter*) (不动杆菌基因种 10 (*Acinetobacter genomospecies 10*), 不动杆菌基因种 11 (*Acinetobacter genomospecies 11*)), 鞘氨醇杆菌 (*Sphingobacterium*) (食醇鞘氨醇杆菌 (*Sphingobacterium spiritivorum*)), 和克雷伯氏菌 (*Klebsiella*) (肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)); 肠球菌 (*Enterococcus*) (粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 和屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)), 和乳杆菌 (*Lactobacillus*) (约氏乳杆菌 (*Lactobacillus johnsonii*)); 例如, 其中该细菌鞭毛蛋白或细菌外膜蛋白 C 来自假单胞菌属物种。

[0311] 在另一个实施方案中, 本发明提供了诊断试剂盒, 其包含根据试剂 1 的试剂; 例如, 用于检测来自狗的样品中的 IBD 相关抗体的诊断试剂盒, 该试剂盒包含: (i) 如前两段中所述的试剂 1 的一种或多种试剂; (ii) 检测试剂和 IBD 相关抗体之间形成的复合物的方法。在一些实施方案中, 诊断试剂盒是 ELISA 测定。在一些实施方案中, 试剂盒是条带测定法, 其中抗原例如根据试剂 1 的抗原与条带的特定区域结合。

[0312] 在另一个实施方案中, 本发明提供试剂 1 中所述的任何试剂在制备试剂盒或试剂盒组分中的用途, 所述试剂盒或试剂盒的组分用于实施根据方法 1 以及下列等等的任何的诊断方法。

[0313] 在另一个实施方案中, 本发明提供试剂 1 中描述的任何试剂作为用于诊断的试剂, 例如, 在伴侣动物患者中诊断 IBD, 例如, 在根据方法 1 以及下列等等中的任何的诊断方法中。

[0314] 在另一个实施方案中, 本发明提供了复合物, 其包含抗原, 与抗原结合的内源性 IBD 相关抗体, 和与 IBD 相关抗体结合的标记抗体, 例如其中抗原是根据试剂 1 的试剂。如前所述。

[0315] 在另一个实施方案中, 本发明提供了一种细菌表达构建体, 其表达根据试剂 1 之任何的抗原, 例如, 包含有效连接于编码下述一个或多个的可读框的启动子的细菌表达构建体:

[0316] a. 细菌外膜蛋白 C 或其片段, 其包含选自 SEQ ID NO: 16, 17 和 18 的序列中的至少 10 个 (例如, 至少 20 个, 例如, 至少 30 个) 连续氨基酸; 其中启动子和可读框彼此是异源的, 即其中启动子和可读框天然不有效连接; 或者

[0317] b. 细菌鞭毛蛋白或其片段, 其包含选自 SEQ ID NO: 9-13 的序列中的至少 10 个 (例如, 至少 20 个, 例如, 至少 30 个) 连续氨基酸; 其中启动子和可读框彼此是异源的, 即其中启动子和可读框本质上不有效连接; 要么

[0318] c. 细菌鞭毛蛋白或其片段, 其包含选自 SEQ ID NO: 9-13 的序列中的至少 10 个 (例

如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸,其结合至另一种细菌鞭毛蛋白或其片段结合和/或多聚组氨酸标签,例如N-末端六组氨酸标签,例如,任选地包含一个或多个溶解度增强残基,例如SEQ ID No 33 或SEQ ID NO 36的N-末端序列,例如SEQ ID NO 34的鞭毛蛋白融合蛋白;或者

[0319] d. 细菌外膜蛋白C或其抗原片段,例如,包含选自SEQ ID NO:16,17 和18的序列中的至少10个(例如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸,其中细菌外膜蛋白C或其片段结合至另一种细菌外膜蛋白C或其片段和/或聚His标签,例如N-末端六组氨酸标签,例如,任选地包含一种或多种溶解度增强残基,例如SEQ ID NO 33或SEQ ID NO 36的N末端序列,例如SEQ ID NO 35的OmpC融合蛋白。

[0320] 在另一个实施方案中,本发明提供细菌细胞系,例如大肠杆菌系,其包含前一段的细菌表达构建体。

[0321] X. 在哺乳动物中诊断炎性病症

[0322] 在一个实施方案中,本发明提供了用于在从伴侣动物患者获得的样品中检测一种或多种炎症相关自身抗体的存在和/或水平的方法(方法A),所述抗体例如,针对炎性标志物的内源性抗体,例如选自钙卫蛋白的自身抗体, β -整联蛋白的自身抗体,自身抗体,乳铁蛋白的自身抗体和C-反应蛋白的自身抗体,其中样品选自含有抗体的生理材料,例如,选自以下一种或多种:全血,唾液,粘液分泌物,血清,血浆,粪便和肠组织;所述方法包括以下步骤:

[0323] a. 使与底物或可检测标记结合的一种或多种抗原与所述样品接触,并检测所述一种或多种炎症相关自身抗体与所述一种或多种抗原的结合;和/或

[0324] b. 使标记的抗体与所述样品接触,其中标记的抗体特异性结合来自患者物种的免疫球蛋白,并检测标记的抗体与所述一种或多种炎症相关的自身抗体的结合;和

[0325] c. 任选地,将所述样品分类为炎症样品或非炎症样品,其中所述一种或多种炎症相关自身抗体的存在或水平,单独或组合,与炎性病症的存在相关。

[0326] A.1. 方法A,其中患者选自猫,狗或马。

[0327] A2. 方法A,其中患者是狗。

[0328] A.3. 任何前述方法,其中患者表现出IBD的临床症状,例如,一种或多种下列症状:

[0329] a. 便血;

[0330] b. 粪便钙卫蛋白水平升高;

[0331] c. 粪便乳铁蛋白水平升高;

[0332] d. 贫血;

[0333] e. 腹泻;

[0334] f. 呕吐;

[0335] g. 食欲不振;

[0336] h. 发热;

[0337] i. 持续性痛;或

[0338] j. 近期体重明显减轻。

[0339] A.4. 任何前述方法,其中炎症相关的自身抗体选自钙卫蛋白的自身抗体、 β -整联蛋白的自身抗体、乳铁蛋白的自身抗体、C-反应蛋白的自身抗体及其组合,例如钙卫蛋白

和/或 β -整联蛋白的自身抗体,例如,其中炎症相关的自身抗体是钙卫蛋白的自身抗体,或其中炎症相关的自身抗体是 β -整联蛋白的自身抗体。

[0340] A.5.任何前述方法,其中炎症相关的自身抗体是IgA。

[0341] A.6.任何前述方法,其中炎症相关的自身抗体是分泌型IgA。

[0342] A.7.任何前述方法,其中炎症相关的自身抗体是血清IgA。

[0343] A.8.任何前述方法,其中样品包含唾液。

[0344] A.9.任何前述方法,其中样品包含全血。

[0345] A.10.任何前述方法,其中炎症相关自身抗体的存在表明慢性炎性病症。

[0346] A.11.任何前述方法,其中炎症相关自身抗体的存在表明IBD。

[0347] A.12.任何前述方法,与方法1以及下列等等之任何联合使用。

[0348] A.13.任何前述方法,其中患者中炎性病症的存在,严重性和/或类型与从IgG转变为IgA的抗体类别相关,例如,其中IgG自身抗体相对于相同抗原的IgA自身抗体的比例在健康的动物中更高且在炎性病症的动物中更低。

[0349] A.14.任何前述方法,其还包括将统计算法应用于所述一种或多种炎症相关自身抗体的存在或水平,以获得所述患者的诊断或预后概况,其中特定炎症相关自身抗体的存在或相对水平与炎症的存在、类型或严重程度相关。

[0350] A.15.任何前述方法,其中与底物或可检测标记结合的抗原为

[0351] a.一种分离的肽,其包含钙卫蛋白或其抗原性片段,其包含至少10个(例如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸,其来自野生型钙卫蛋白,例如来自伴侣动物钙卫蛋白,例如包含SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:22中的任何或其任意组合,其中钙卫蛋白或其抗原片段结合至一种或多种标记、纯化标签、固体基质或其他蛋白质或其片段,例如另一种钙卫蛋白或其片段或整联蛋白或其片段;例如,其中钙卫蛋白或其抗原性片段结合至聚His标签,例如,N-末端六组氨酸标签,例如SEQ ID NO 36的N-末端序列;和/或

[0352] b.分离的肽,其为整联蛋白或其抗原片段,包含在野生型整联蛋白的序列中的至少10个(例如,至少20个,例如至少30个)连续氨基酸,例如所述序列来自伴侣动物整联蛋白,例如,SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:32或其任何组合中的任何,其中整联蛋白或其抗原片段结合于标记、纯化标签、固体基质或其他蛋白质或其片段中的一种或多种,例如钙卫蛋白或其片段或其他整联蛋白或其片段;例如,其中整联蛋白或其抗原性片段与聚his标签结合,例如N-末端六组氨酸标签,例如SEQ ID NO 36的N-末端序列。

[0353] A.16.任何前述方法,其中与底物或可检测标记物结合的抗原是包含钙卫蛋白S100A8单体区和钙卫蛋白S100A9单体区的融合蛋白,其中所述区通过接头序列连接。

[0354] A.17.任何前述方法,其中与底物或可检测标记结合的抗原是融合肽,其包含整联蛋白 α (alpha)亚基的一个或多个抗原片段和整联蛋白 β (beta)亚基的一个或多个抗原片段,其中整联蛋白 α (alpha)亚基区和整联蛋白 β (beta)亚基区通过接头序列连接,例如(Gly₄Ser)_n接头,其中n是2,3或4,例如3。

[0355] A.18.任何前述方法还包括将统计算法应用于样品中所述一种或多种炎症相关自身抗体的存在或水平,以及一种或多种另外的IBD相关内源性抗体的存在或水平,例如,所

述内源性抗体选自抗PMN抗体,抗酵母抗体,抗微生物抗体及其组合。

[0356] A.19.任何前述方法,其中所述患者被诊断患有淋巴浆细胞性肠炎(LPE),嗜酸性细胞性胃肠炎(EGE)或肉芽肿性肠炎(GE)。

[0357] A.20.任何前述方法,其中另外测定样品中一种或多种另外的IBD相关内源性抗体的存在或水平,所述抗体选自样品中抗PMN抗体,抗酵母抗体,抗微生物抗体及其组合。

[0358] A.21.前述方法,其中一种或多种另外的IBD相关内源性抗体包含

[0359] a.抗PMN抗体,选自抗PMN抗体(APMNA),核周抗PMN抗体(pAPMNA)及其组合;和/或

[0360] b.抗酵母抗体,选自抗酵母免疫球蛋白A(AYA-IgA),抗酵母免疫球蛋白G(AYA-IgG),抗酵母免疫球蛋白M(AYA-IgM)及其组合;和/或

[0361] C.抗微生物抗体,选自抗外膜蛋白C(ACA)抗体,抗鞭毛蛋白抗体(AFA)及其组合,和/或

[0362] A.22.任何方法A.20,以及下列等等,其中所述一种或多种另外的IBD相关内源性抗体包含抗鞭毛蛋白抗体(AFA),其结合由基因编码的细菌鞭毛蛋白上的一个或多个表位,所述基因能够被选自SEQ ID NO:1,3,5和7中一种或多种的第一引物以及选自SEQ ID NO 2、4、6和8中的一个或多个的第二引物扩增。

[0363] A.23.任何方法A.20,以及下列等等,其中所述一种或多种另外的IBD相关内源性抗体包含抗鞭毛蛋白抗体(AFA),其与细菌鞭毛蛋白或其片段上的一个或多个表位结合,所述表位包含选自SEQ ID NOS 9-13的序列中的至少10个(例如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸。

[0364] A.24.任何方法A.20,以及下列等等,其中所述一种或多种另外的IBD相关内源性抗体包含抗外膜蛋白C抗体(ACA),其结合由基因编码的细菌外膜蛋白C上的一个或多个表位,所述基因能够通过对应于SEQ ID NOS 14和15的引物扩增。

[0365] A.25.任何方法A.20,以及下列等等,其中所述一种或多种另外的IBD相关内源性抗体包含来自伴侣动物患者物种的胃肠道的细菌的抗原的抗体。

[0366] A.26.任何方法A.20,以及下列等等,其中所述一种或多种另外的IBD相关内源性抗体包含来自伴侣动物患者物种的胃肠道的革兰氏阴性细菌的抗原的抗体。

[0367] A.27.任何方法A.20,以及下列等等,其中所述一种或多种另外的IBD相关内源性抗体包含来自伴侣动物患者物种的肠道的细菌的抗原的抗体,其中所述细菌是选自以下的一种或多种的物种:假单胞菌(*Pseudomonas*) (铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),蒙氏假单胞菌(*Pseudomonas monteilii*),海雀假单胞菌(*Pseudomonas lundensis*)/腐臭假单胞菌(*Pseudomonas taetrolens*),*Pseudomonas mosselii*,霉味假单胞菌(*Pseudomonas mucidolens*)/类黄假单胞菌(*Pseudomonas synxantha*),荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)A,栖木槿假单胞菌(*Pseudomonas hibiscicola*),铁角蕨假单胞菌(*Pseudomonas asplenii*)/恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*),缺陷短波单胞菌(*Brevundimonas diminuta*),嗜根寡养单胞菌(*Stenotrophomonas rhizophila*),埃希氏菌(*Escherichia*) (大肠杆菌(*Escherichia coli*),费格森埃希氏菌(*Escherichia fergusonii*)),变形杆菌(*Proteus*) (*Proteus mirabilis*),肠杆菌(*Enterobacter*) (霍氏肠杆菌(*Enterobacter hormaechei*)),不动杆菌(*Acinetobacter*) (不动杆菌基因种10(*Acinetobacter*

genomospecies 10), 不动杆菌基因种11(Acinetobacter genomospecies 11)), 鞘氨醇杆菌(Sphingobacterium) (食醇鞘氨醇杆菌(Sphingobacterium spiritivorum)), 和克雷伯氏菌(Klebsiella) (肺炎克雷伯氏菌(Klebsiella pneumonia)); 肠球菌(Enterococcus) (粪肠球菌(Enterococcus faecalis) 和屎肠球菌(Enterococcus faecium)), 和乳杆菌(Lactobacillus) (约氏乳杆菌(Lactobacillus johnsonii)); 例如, 其中细菌包括假单胞菌属物种中的至少一种。

[0368] A.28. 任何方法A.20, 以及下列等等, 其中所述一种或多种另外的IBD 相关内源性抗体包含抗外膜蛋白C抗体(ACA), 其与细菌外膜蛋白C或其片段上的一个或多个表位结合, 所述表位包含至少10个(例如, 至少20个, 例如至少30个), 选自SEQ ID NOS 16, 17和18的序列中的连续氨基酸。

[0369] A.29. 任何方法A.20, 以及下列等等, 其中所述一种或多种另外的IBD 相关内源性抗体选自APMNA, pAPMNA, AYA-IgA, AYA-IgG, ACA或AFA。

[0370] A.30. 任何方法A.20, 以及下列等等, 其中所述一种或多种另外的IBD 相关内源性抗体是IgA抗体。

[0371] A.31. 任何前述方法, 其中用于检测一种或多种炎症相关自身抗体的存在或水平的免疫测定是酶联免疫吸附测定(ELISA)。

[0372] A.32. 任何前述方法, 其中用于检测一种或多种炎症相关自身抗体的存在或水平的免疫测定是凝集反应-PCR(ADAP)。

[0373] A.33. 任何前述方法, 其中用于检测一种或多种炎症相关自身抗体的存在或水平的免疫测定是免疫组织化学测定。

[0374] A.34. 任何前述方法, 其中用于检测一种或多种炎症相关自身抗体的存在或水平的免疫测定是免疫荧光测定。

[0375] A.35. 任何前述方法, 其中所述样品选自唾液, 血清, 血浆和全血。

[0376] A.36. 任何前述方法, 其中将所述样品分类为炎症样品或非炎症样品的步骤使用选自分类和回归树, 增强树, 神经网络, 随机森林, 支持向量机, 一般卡方自动交互检测器模型, 交互树, 多自适应回归样条, 机器学习分类器及其组合的统计算法进行。

[0377] A.37. 任何前述方法, 包括: (a) 确定至少一种炎症相关自身抗体的存在或水平, (b) 任选地确定样品至少一种标志物的存在或水平, 所述标志物选自抗多形核白细胞(PMN)抗体, 抗微生物抗体, 钙卫蛋白及其组合; (c) 使用基于至少一种标志物的存在或水平的统计算法将样品分类为炎症样品或非炎症样品。

[0378] A.38. 任何前述方法, 其中与底物或可检测标记结合的一种或多种抗原是试剂A中的任何一种, 如下文所述。

[0379] A.39. 任何前述方法, 其中所述一种或多种抗原与底物结合并包含细菌外膜蛋白C或其片段, 所述细菌外膜蛋白C或其片段包含选自以下的序列中的至少10个(例如, 至少20个, 例如, 至少30个)连续氨基酸: SEQ ID NOS 16, 17和18, 任选地所述连续氨基酸结合至聚His标签, 例如N-末端六组氨酸标签, 例如, 任选地包含一个或多个溶解度增强残基, 例如SEQ ID NO 33 或SEQ ID NO 36的N末端序列, 例如SEQ ID NO 35的抗原。

[0380] A.40. 任何前述方法, 其中所述一种或多种抗原与底物结合并包含细菌鞭毛蛋白或其片段, 所述细菌鞭毛蛋白或其片段包含选自SEQ ID NOS 9-13 的序列中的至少10个

(例如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸,任选地与聚His标签结合,例如N-末端六组氨酸标签,例如,任选地包含一个或多个溶解度增强残基,例如SEQ ID NO 33或SEQ ID NO 36的N端序列,例如,SEQ ID NO 34的抗原。

[0381] A.41.任何前述方法,还包括检测与炎性肠病相关的一种或多种内源性抗体(IBD相关抗体)的存在和/或水平的检测存在或水平,例如,其中所述一种或多种IBD相关抗体选自抗PMN抗体,抗酵母抗体,抗微生物抗体及其组合,例如,根据方法1以及以下等等中的任何。

[0382] A.42.任何前述方法,其中与底物或可检测标记结合的一种或多种抗原包含SEQ ID NO 19的抗原和SEQ ID NO 35的抗原。

[0383] A.43.任何前述方法,其中一种或多种抗原与一种或多种底物结合,其中底物包含一个或多个微孔板,使得在需要检测与不同抗原的结合时,不同的抗原在不同的微孔板上或在相同的微孔板的不同的孔中;例如其中微孔板是具有多个样品孔的平板或条带,例如6、24、96、384或1536个样品孔,例如,其中微孔板的每个孔具有10n1至1ml之间的体积,例如在50 μ l和500 μ l 之间。

[0384] A.44.任何前述方法,其中一种或多种抗原与一种或多种底物结合,包括以下步骤:

[0385] a.将一种或多种抗原粘附到它们各自的基质上,

[0386] b.用蛋白质例如牛血清白蛋白阻断底物的任何未包被的表面,

[0387] c.将抗原暴露于样品以形成抗原-抗体复合物,

[0388] d.将由此形成的抗原-抗体复合物暴露于标记抗体,与来自患者物种的免疫球蛋白(例如IgA)结合的标记抗体,例如辣根过氧化物酶(HRP)-抗IgA抗体,

[0389] e.检测标记抗体与抗原-抗体复合物的结合,

[0390] 例如,其中在步骤a-d的每一步之后用缓冲液洗涤基质。

[0391] A.45.任何前述方法,包括将来自患者的样品分类为与患者中的炎性病症例如炎性肠病(IBD)“一致”,或与炎性病症“不一致”,其中样品中与一种或多种抗原结合的IgA的存在和/或水平,单独或组合,与患者中炎性病症的存在相关。

[0392] 在方法A(方法A-1)的特定实施方案中,本发明提供了用于检测从犬患者获得的血清中至少以下IgA标志物的存在和/或水平的方法:

[0393] (i) 细菌外膜蛋白C(OmpC)的内源性IgA,和

[0394] (ii) 犬钙卫蛋白的内源性IgA,

[0395] 所述方法包括以下步骤:

[0396] a) 使与所述底物结合的第一抗原和与底物结合的第二抗原与所述血清接触,且

[0397] b) 使用针对犬IgA的标记抗体检测所述一种或多种IgA标志物与所述一种或多种抗原的结合,

[0398] 其中,

[0399] (i) 第一抗原包含一种或多种来自细菌OmpC的抗原序列;和

[0400] (ii) 第二抗原包含来自犬钙卫蛋白的一种或多种抗原序列。

[0401] 例如,方法A-1提供

[0402] A-1.1.方法A-1,其中第一抗原包含选自SEQ ID NO:16,17和18的序列中的至少20

个连续氨基酸。

[0403] A-1.2.任何前述方法A-1,其中第二抗原包含选自SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22的序列中的至少20个连续氨基酸。

[0404] A-1.3.任何前述方法A-1,其中第二抗原是包含钙卫蛋白S100A8单体区和钙卫蛋白S100A9单体区的融合蛋白,其中所述区通过接头序列连接;例如其中钙卫蛋白S100A8单体区域包含在SEQ ID NO:21的序列中至少20个氨基酸残基,并且钙卫蛋白S100A9单体区域包含在SEQ ID NO:22的序列中至少20个氨基酸残基。

[0405] A-1.4.任何前述方法A-1,其中第一和第二抗原各自包含聚His标签;例如,N-末端六组氨酸标签,例如,任选地还包含一个或多个溶解度增强残基,例如丝氨酸残基,其中第一和第二抗原各自包含选自SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:36的N-末端序列。。

[0406] A-1.5.任何前述方法A-1,其中所述底物包含一个或多个微孔板,其中所述第一抗原和所述第二抗原在不同的微孔板上或同一微孔板的不同孔中,例如,其中微孔板是具有多个样品孔的平板或条带,例如6、24、96、384或1536个样品孔,例如,其中微孔板的每个孔具有10nl至1ml之间的体积,例如在50 μ l和500 μ l之间。

[0407] A-1.6任何前述方法A-1,包括以下步骤:

[0408] a.将第一和第二抗原粘附到它们各自的基质上,

[0409] b.用蛋白质例如牛血清白蛋白阻断底物的任何未包被的表面,

[0410] c.将抗原暴露于血清样品以形成抗原-抗体复合物,

[0411] d.将由此形成的抗原-抗体复合物暴露于针对犬IgA的标记抗体,例如辣根过氧化物酶(HRP)-抗狗IgA抗体,

[0412] e.检测针对犬IgA的标记抗体与抗原-抗体复合物的结合。

[0413] A-1.7.任何前述方法A-1,其中第一抗原包含SEQ ID NO:35的融合蛋白。

[0414] A-1.8.任何前述方法A-1,其中第二抗原包含SEQ ID NO:19的融合蛋白。

[0415] A-1.9.任何前述方法A-1,其中第一抗原包含根据SEQ ID NO:35的融合蛋白,第二抗原包含根据SEQ ID NO:19的融合蛋白。

[0416] A-1.10.任何前述方法A-1,进一步包括将来自犬患者的血清分类为与炎症肠病(IBD)一致或与IBD不一致,其中血清中与第一抗原结合IgA的存在和/或水平和血清中结合第二抗原的IgA的存在和/或水平,分开的或组合地,与犬患者中IBD的存在相关。

[0417] 在另一个实施方案中,本发明提供诊断炎症病症的方法,包括根据方法A和下列等等之任何分别或组合检测一种或多种IBD相关抗体的存在和/或水平。

[0418] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种分类患者是否与炎症的临床亚型相关的方法,该方法包括:(a)确定至少一种炎症相关自身抗体的存在或水平,(b)任选地确定样品中选自抗多形核白细胞(PMN)抗体,抗微生物抗体,钙卫蛋白及其组合的至少一种标志物的存在或水平;(c)使用基于至少一种标志物的存在或水平的统计算法,对样本淋巴浆细胞(LPE) IBD,嗜酸细胞性胃肠炎(EGE) IBD或肉芽肿(GE) IBD或非IBD样品进行分类;例如使用方法A以及下列等等中的任何。

[0419] 另一方面,本发明提供了一种监测哺乳动物炎症进展或消退的方法,该方法包括:(a)确定至少一种炎症相关自身抗体的存在或水平,(b)任选地确定样品中选自抗多形核白细胞(PMN)抗体,抗微生物抗体,钙卫蛋白及其组合的至少一种标志物的存在或水平;(c)使

用基于至少一种标志物的存在或水平的统计算法,确定炎症的存在或严重程度;例如使用方法 A 以及下列等等中的任何。

[0420] 在相关方面,本发明提供了一种用于监测接受可用于治疗炎症的药物的患者中的药物功效的方法,该方法包括:(a) 确定至少一种炎症相关自身抗体的存在或水平,(b) 任选地确定样品中选自抗多形核白细胞(PMN) 抗体,抗微生物抗体,钙卫蛋白及其组合的至少一种标志物的存在或水平;(c) 使用基于至少一种标志物的存在或水平的统计算法,确定炎症的存在或严重程度;例如使用方法A以及下列等等中的任何。

[0421] 在另一个实施方案中,本发明提供了试剂(试剂A),其包含选自以下一种或多种的氨基酸序列:

[0422] a. 一种分离的肽,其为钙卫蛋白或其抗原性片段,其包含至少10个(例如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸,其来自野生型钙卫蛋白,例如来自伴侣动物钙卫蛋白,例如SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:22中的任何或其任意组合,其中钙卫蛋白或其抗原片段结合至一种或多种标记、纯化标签、固体基质或其他蛋白质或其片段,例如另一种钙卫蛋白或其片段或整联蛋白或其片段;例如,其中钙卫蛋白或其抗原性片段结合至聚His标签,例如,N-末端六组氨酸标签,例如 SEQ ID NO 36的N-末端序列;例如根据SEQ ID NO:19的融合蛋白;和

[0423] b. 分离的肽,其为整联蛋白或其抗原片段,包含在野生型整联蛋白的序列中的至少10个(例如,至少20个,例如至少30个)连续氨基酸,例如所述序列来自伴侣动物整联蛋白,例如,SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:32或其任何组合中的任何,其中整联蛋白或其抗原片段结合于标记、纯化标签、固体基质或其他蛋白质或其片段中的一种或多种,例如钙卫蛋白或其片段或其他整联蛋白或其片段;例如,其中整联蛋白或其抗原性片段与聚his标签结合,例如N-末端六组氨酸标签,例如SEQ ID NO 36的N-末端序列。

[0424] 例如,在一些实施方案中,试剂A是包含钙卫蛋白S100A8单体区域和钙卫蛋白S100A9单体区域的融合蛋白,例如,所述钙卫蛋白S100A8单体区域具有包含来自SEQ ID NO:21的序列中的至少20个氨基酸残基的序列,所述S100A9单体区域具有包含来自SEQ ID NO:22的序列中的至少20个氨基酸残基的序列,其中所述区域通过接头序列连接,例如,包含SEQ ID NO: 19的融合蛋白;或包含整联蛋白 α (alpha) 亚基区(例如,包含SEQ ID NO: 29或30的序列中的至少20个氨基酸残基)和整联蛋白 β (beta) 亚基区(例如,包含SEQ ID NO: 31或32的序列中的至少20个氨基酸残基)的融合肽,其中所述区域通过接头序列连接。接头序列可以,例如,包含10-30个氨基酸残基的序列,例如约15个氨基酸残基,例如非带电荷的氨基酸残基,例如甘氨酸和丝氨酸残基,例如(Gly₄Ser)_n接头,其中n是2至5的整数,例如3。

[0425] 例如,在某些实施方案中,试剂A包含犬钙卫蛋白S100A8单体区和犬钙卫蛋白S100A9单体区,其中所述区通过接头序列连接,例如其中犬钙卫蛋白S100A8单体区包含来自SEQ ID NO:21的序列中的至少20个氨基酸残基且犬钙卫蛋白S100A9单体区域包含SEQ ID NO:22的序列中的至少20个氨基酸残基;例如,融合蛋白包含SEQ ID NO:19的序列。

[0426] 在另一个实施方案中,本发明提供了诊断试剂盒,其包含根据试剂A 的试剂;例如,用于检测来自狗的样品中的炎症相关抗体的诊断试剂盒,该试剂盒包含:(i) 如上所述的一种或多种试剂A的试剂;(ii) 检测试剂与炎症相关自身抗体之间形成的复合物的方法。

在一些实施方案中,诊断试剂盒是ELISA测定。在一些实施方案中,试剂盒是条带测定法,其中抗原,例如根据试剂1的抗原与条带的特定区域结合。在一些实施方案中,诊断试剂盒是凝集-PCR (ADAP) 试剂盒。

[0427] 在一些实施方案中,本发明提供了诊断试剂盒,其包含根据试剂A的试剂和根据试剂1的试剂,例如用于方法1以及下列等等或方法A以及下列等等中的任何(包括方法A-1以及下列等等)。例如,在一个实施方案中,本发明提供诊断试剂盒,例如ELISA试验,其包含(i)包含来自细菌OmpC的抗原序列的抗原,例如,根据SEQ ID NO:35的融合蛋白,以及(ii)第二抗原,其包含来自钙卫蛋白的一种或多种抗原序列,例如根据SEQ ID NO:19的融合蛋白。

[0428] 在另一个实施方案中,本发明提供了试剂A中所述的任何试剂在制备试剂盒或试剂盒组分中的用途,所述试剂盒用于实施根据方法A以及下列等等中任何的诊断方法,例如,如上所述的诊断试剂盒。

[0429] 在另一个实施方案中,本发明提供了试剂A中描述的任何试剂,用于诊断,例如诊断伴侣动物患者的炎症,例如,根据方法A以及下列等等中的任何诊断方法。

[0430] 在另一个实施方案中,本发明提供了复合物,其包含抗原,与抗原结合的内源性炎症相关抗体,和与炎症相关抗体结合的标记抗体,例如其中抗原是根据试剂的试剂A的试剂,如上所述。

[0431] 在另一个实施方案中,本发明提供了细菌表达构建体,其包含与可读框有效连接的启动子,所述可读框编码一种或多种包含序列中至少10个(例如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸(所述序列来自野生型钙卫蛋白,例如来自伴侣动物钙卫蛋白),和/或包含来自野生型整联蛋白(例如来自伴侣动物整联蛋白)的序列中的至少10个(例如,至少20个,例如,至少30个)连续氨基酸的连续氨基酸,各自任选地与另外的序列连接,例如,聚His标签;其中启动子和可读框彼此是异源的,即其中启动子和可读框天然不有效连接。

[0432] 在另一个实施方案中,本发明提供细菌细胞系,例如大肠杆菌系,其包含前段的细菌表达构建体。

[0433] XI. 疗法和治疗监控

[0434] 一旦将患者样品分类为炎症样品,例如,一旦伴侣动物样品被分类为IBD,例如IBD或IBD亚型,本发明的方法,系统和代码可以进一步包括向个体施用治疗有效量的用于治疗与特定炎性病症相关的一种或多种症状的药物。对于治疗应用,药物可以单独施用或与一种或多种另外的抗炎或抗IBD药物和/或一种或多种下述药物联合施用,所述药物减少与抗炎或抗-IBD药物相关的副作用。

[0435] 抗炎药或抗IBD药可以根据需要与合适的药物赋形剂一起施用,并且可以通过任何可接受的施用方式进行。因此,给药可以是,例如,静脉内,局部,皮下,经皮,透皮,肌肉内,口服,经颊,舌下,牙龈,腭,肠胃外,皮内,鼻内,直肠,阴道或通过吸入。“共同施用”是指抗炎或抗IBD药物在施用第二种药物(例如,另一种IBD药物,可用于减少IBD药物的副作用的药物等)的同时,之前或之后施用。

[0436] 可以重复施用治疗有效量的抗炎或抗IBD药物,例如,至少2,3,4,5,6,7,8或更多次,或者可以通过持续输施用剂量注。剂量可以采取固体,半固体,冻干粉末或液体剂量形式,例如片剂,丸剂,小丸,胶囊剂,粉剂,溶液剂,混悬剂,乳剂,栓剂,保留灌肠剂,乳膏剂,

软膏,洗剂,凝胶,气溶胶,泡沫等,可以以适合简单给药精确剂量的单位剂量形式递送。

[0437] 如本文所用,术语“单位剂量形式”包括适合作为伴侣动物的单位剂量的物理上离散的单位,每个单位含有预定量的药物,经计算可产生所需的起效,耐受性和/或治疗效果,其与合适的药物赋形剂(例如安瓿)联合。此外,可以制备更浓缩的剂量形式,然后可以从中制备更稀释的单位剂量形式。因此,浓度更高的剂量形式将含有基本上超过例如抗炎或抗IBD药物的量的例如至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10或更多倍的量。

[0438] 制备此类剂量形式的方法是本领域技术人员已知的(参见,例如, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)。剂量形式通常包括常规药物载体或赋形剂并且可以另外包括其他药剂,载体,佐剂,稀释剂,组织渗透增强剂,增溶剂等。适当的赋形剂可以通过本领域熟知的方法调整适合于特定的剂量形式和给药途径(参见例如, Remington's Pharmaceutical Sciences, 同上)。

[0439] 合适的赋形剂的实例包括但不限于乳糖,右旋糖,蔗糖,山梨糖醇,甘露醇,淀粉,阿拉伯树胶,磷酸钙,藻酸盐,明胶,硅酸钙,微晶纤维素,聚乙烯吡咯烷酮,纤维素,水,盐水,糖浆,甲基纤维素,乙基纤维素,羟丙基甲基纤维素和聚丙烯酸如Carbopols。剂量形式可另外包括润滑剂,例如滑石,硬脂酸镁和矿物油;润湿剂;乳化剂;助悬剂;防腐剂,如甲基-,乙基-和丙基-羟基-苯甲酸酯;pH调节剂,如无机和有机酸和碱;甜味剂;和矫味剂。剂量形式还可包含可生物降解的聚合物珠,葡聚糖和环糊精包合络合物。

[0440] 对于口服给药,治疗有效剂量可以是片剂,胶囊,乳剂,混悬剂,溶液,糖浆,喷雾剂,锭剂,粉剂和缓释剂的形式。用于口服给药的合适赋形剂包括药物级的甘露醇,乳糖,淀粉,硬脂酸镁,糖精钠,滑石,纤维素,葡萄糖,明胶,蔗糖,碳酸镁等。

[0441] 在一些实施方案中,治疗有效剂量采取丸剂,片剂或胶囊的形式,因此,剂量形式可以与IBD药物一起含有以下任何物质:稀释剂,例如乳糖,蔗糖,磷酸二钙等;一种崩解剂,如淀粉或其衍生物;例如硬脂酸镁等润滑剂;和粘合剂,如淀粉,阿拉伯树胶,聚乙烯吡咯烷酮,明胶,纤维素及其衍生物。IBD药物也可以配制成栓剂,例如置于聚乙二醇(PEG)载体中。

[0442] 液体剂量形式可以如下制备:通过将IBD药物和任选的一种或多种药学上可接受的佐剂溶解或分散在载体中,所述载体例如,含水盐水(例如, 0.9%w/v氯化钠),葡萄糖水溶液,甘油,乙醇等,以形成溶液或悬浮液,例如用于口服,局部或静脉内给药。IBD药物也可以配制成保留灌肠剂。

[0443] 对于局部给药,治疗有效剂量可以是乳液,洗剂,凝胶,泡沫,乳膏,胶,溶液,悬浮液,软膏和透皮贴剂的形式。对于吸入给药,IBD药物可以通过雾化器以干粉或液体形式递送。对于肠胃外给药,治疗有效剂量可以是无菌可注射溶液和无菌包装粉末的形式。可注射溶液可以在约4.5至约7.5的pH下配制。治疗有效剂量也可以冻干形式提供。这些剂量形式可包括缓冲剂,例如碳酸氢盐,用于在给药前重构,或缓冲剂可包括在冻干剂量形式中,用于例如用水重构。冻干剂量形式还可包含合适的血管收缩剂,例如肾上腺素。冻干剂量形式可以在注射器中提供,任选地与缓冲剂组合包装用于重构,使得重构的剂量形式可以立即施用于患者。

[0444] 在用于治疗IBD或其临床亚型的治疗用途中,IBD药物可以每日约 0.001mg/kg至约1000mg/kg的初始剂量施用。日剂量范围为约0.01mg/kg 至约500mg/kg,约0.1mg/kg至约200mg/kg,约1mg/kg至约100mg/kg,或约10mg/kg至约50mg/kg使用。然而,剂量可以根据个

体的需要,IBD症状的严重程度和所使用的IBD药物而变化。例如,根据本文所述的方法,考虑到分类为患有IBD的个体中IBD症状的严重性,可以根据经验确定剂量。在本发明的上下文中,给伴侣动物患者施用的剂量应足以影响随时间的有益治疗反应。剂量的大小还可以通过伴随在这种伴侣动物患者中施用特定 IBD药物的任何不良副作用的存在,性质和程度来确定。确定特定情况的适当剂量在从业者的技能范围内。通常,用较小剂量开始治疗,所述较小剂量小于IBD药物的最佳剂量。此后,剂量以小增量增加,直到达到环境下的最佳效果。为方便起见,如果需要,可以将日总剂量分开并在一天中分部分给药。

[0445] 如本文所用,术语“IBD药物”包括可用于治疗与IBD相关的一种或多种症状的药物的所有药学上可接受的形式。例如,IBD药物可以是外消旋或异构体混合物,与离子交换树脂结合的固体复合物等。此外,IBD药物可以是溶剂化形式。该术语还旨在包括所述IBD药物的所有药学上可接受的盐,衍生物和类似物,以及它们的组合。例如,IBD药物的药学上可接受的盐包括但不限于酒石酸盐,琥珀酸盐,tartarate,二酒石酸盐,二盐酸盐,水杨酸盐,半琥珀酸盐,柠檬酸盐,马来酸盐,盐酸盐,氨基甲酸盐,硫酸盐,硝酸盐和苯甲酸盐形式,如以及它们的组合等。任何形式的IBD药物都适用于本发明的方法,例如IBD药物的药学上可接受的盐,IBD药物的游离碱,或其混合物。

[0446] 如本文所用,抗炎药包括IBD药物和用于治疗其他炎性病症的药物,包括皮质类固醇,NSAIDs和结合炎性细胞因子的单克隆抗体或可溶性受体,例如TNF α 的单克隆抗体。

[0447] 例如,可用于治疗与炎性病症如IBD或其临床亚型相关的一种或多种症状的合适药物包括但不限于氨基水杨酸盐(例如美沙拉嗪,柳氮磺胺吡啶等),皮质类固醇(例如泼尼松),硫嘌呤(例如硫唑嘌呤,6-巯基嘌呤等),甲氨蝶呤,单克隆抗体(例如英夫利昔单抗),其游离碱,其药学上可接受的盐,其衍生物,其类似物,及其组合。本领域技术人员将知道适用于本发明的其他抗炎药或IBD药。

[0448] 还可以以周期性的时间间隔监测患者,以便一旦来自这样的患者的样品被分类为IBD样品,就评估某种治疗方案的功效。例如,某些标志物的水平基于诸如药物的治疗的治疗效果而改变。监测患者以评估反应并在个体化方法中理解某些药物或治疗的效果。此外,患者可能对药物没有反应,但标志物可能会发生变化,这表明这些伴侣动物患者属于可通过其标志物水平鉴定的特殊群(无反应)。这些患者可以停止他们目前的治疗并预定替代治疗。

[0449] 例如,在另一个实施方案中,本发明提供了用于治疗伴侣动物患者中的炎性病症(例如IBD)的方法(方法2),包括检测一种或多种内源性抗体的存在和/或水平。其根据方法1以及以下等等的方法,和/或方法A以及以下等等的方法的任何,并且,给所述患者施用治疗有效量的用于治疗与炎性病症例如IBD相关的一种或多种症状的药物,例如

[0450] 2.1.方法2,其中伴侣动物患者是猫,狗或马,例如狗。

[0451] 2.2.方法2以及下列等等之任何,其中伴侣动物患者表现出一种或多种炎性病症的临床症状,例如IBD,例如一种或多种下列症状:

[0452] a. 便血;

[0453] b. 粪便钙卫蛋白水平升高;

[0454] c. 粪便乳铁蛋白水平升高;

[0455] d. 贫血;

- [0456] e. 腹泻;
- [0457] f. 呕吐;
- [0458] g. 食欲不振;或
- [0459] h. 近期体重明显减轻。
- [0460] 2.3. 方法2以及下列等等之任何,其中患者对抗生素没有反应。
- [0461] 2.4. 方法2以及下列等等之任何,其中所述药物选自兽医已知的组,包括氨基水杨酸盐,皮质类固醇,硫嘌呤,甲氨蝶呤,单克隆抗体,其游离碱,其药学上可接受的盐,其衍生物,其类似物,及其组合;
- [0462] a. 例如,选自一个或多个的
- [0463] i. 奥沙拉嗪(狗:10-20mg/kg,口服(P0),一日三次(tid))
- [0464] ii. 美沙拉嗪(狗:10mg/kg,P0,tid);
- [0465] iii. 泼尼松或泼尼松龙(2mg/kg/天狗或猫);
- [0466] iv. 地塞米松(0.25mg/kg/天狗或猫);
- [0467] v. 布地奈德(肠溶衣)(1mg/m²/天,P0,狗,或1mg/猫/天,P0);
- [0468] vi. 硫唑嘌呤(2.2mg/kg/天,P0,在狗中);
- [0469] vii. 环孢菌素(5-10mg/kg/天,P0,在狗或猫中)。
- [0470] 2.5. 方法2以及下列等等之任何,其中伴侣动物患者是狗。
- [0471] 2.6. 方法2以及下列等等之任何,其中该方法还包括通过重复步骤来评估患者对治疗的反应,所述步骤包括根据方法A或以下等等中任何方法检测患者的一种或多种内源性抗体的存在和/或水平。
- [0472] 2.7. 方法2以及下列等等之任何,进一步包括根据方法1以及下列等等,或方法A以及下列等等将来自分析的伴侣动物患者的样品分类为与IBD的临床亚型相关的步骤,所述方法包括:
- [0473] a. 确定所述样品中选自抗PMN抗体,抗酵母抗体,抗微生物抗体,钙卫蛋白及其组合的一种或多种标记物的存在或水平;和
- [0474] b. 使用基于所述一种或多种标志物的存在或水平的统计算法将所述样品分类为淋巴浆细胞性肠炎(LPE)样品,嗜酸性细胞性胃肠炎(EGE)样品,肉芽肿性肠炎(GE)或非IBD样品。
- [0475] 2.8. 前述方法,其中所述统计算法选自分类和回归树,增强树,神经网络,随机森林,支持向量机,一般卡方自动交互检测器模型,交互树,多自适应回归样条,机器学习分类器及其组合。
- [0476] 2.9. 方法2中以及下列等等之任何,进一步包括给伴侣动物患者提供抗原限制或水解蛋白质和/或高水平不溶性纤维的饮食。
- [0477] 本发明的其他特征和优点从以下对其实施方案的描述和权利要求中是显而易见的。
- [0478] 如在全文中所使用的,范围用作描述该范围内的每个值的简写。可以选择范围内的任何值作为范围的端点。另外,本文引用的所有参考文献均通过引用整体并入本文。如果本公开中的定义与引用的参考文献中的定义发生冲突,则以本公开为准。
- [0479] 除非另有说明,否则本文和说明书中其他地方表述的所有百分比和量应理解为指

重量百分比。给出的量基于材料的活性重量。

实施例

[0480] 提供以下实施例以任何方式说明而不是限制要求保护的发明。

[0481] 实施例1-从存在IBD的狗的活组织检查样品中分离的微生物的鉴定

[0482] 该实施例说明了从患有IBD的狗的活组织检查样品中分离的微生物的鉴定。

[0483] 在获得所有者的知情同意并使用16S rRNA基因测序进行基因分型后,从具有炎症性肠病 (IBD) 的20只狗的活组织检查样品中分离微生物培养物。

[0484] 从患有IBD的狗的活组织检查样品中分离以下生物,包括属,种和它们各自的代表百分比。革兰氏阴性微生物的代表比例高于革兰氏阳性微生物:

[0485] (i) 革兰氏阴性:假单胞菌 (47.9%) (铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 蒙氏假单胞菌 (*Pseudomonas monteilii*), 海雀假单胞菌 (*Pseudomonas lundensis*)/腐臭假单胞菌 (*Pseudomonas taetrolens*), *Pseudomonas mosselii*, 霉味假单胞菌 (*Pseudomonas mucidolens*)/类黄假单胞菌 (*Pseudomonas synxantha*), 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) A, 栖木槿假单胞菌 (*Pseudomonas hibiscicola*), 铁角蕨假单胞菌 (*Pseudomonas asplenii*)/恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*), 嗜麦芽窄食单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*), 缺陷短波单胞菌 (*Brevundimonas diminuta*), 嗜根寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas rhizophila*), 埃希氏菌 (10.4%) (大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 费格森埃希氏菌 (*Escherichia fergusonii*)), 变形杆菌 (8.3 %) (*Proteus mirabilis*), 肠杆菌 (6.3%) (霍氏肠杆菌 (*Enterobacter hormaechei*)), 不动杆菌 (4.2%) (不动杆菌基因种10 (*Acinetobacter genomospecies 10*), 不动杆菌基因种11 (*Acinetobacter genomospecies 11*)), 鞘氨醇杆菌 (*Sphingobacterium*) (2.1%) (食醇鞘氨醇杆菌 (*Sphingobacterium spiritivorum*)) 和克雷伯氏菌 (*Klebsiella*) (2.1%) (肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumonia*));

[0486] (ii) 革兰氏阳性:肠球菌16.7% (屎肠球菌, 粪肠球菌) 和乳杆菌 (2.1 %) (约氏乳杆菌)。

[0487] 实施例2-APMNA水平的测定

[0488] 该实施例阐述了使用直接ELISA测定法分析样品中的APMNA水平。

[0489] 多形核白细胞 (PMN) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 用于检测狗血清中APMNA的水平。简而言之,微量滴定板每孔涂有 12.5×10^3 至 200×10^3 PMN,从收集自单只狗或多只狗的狗血样中分离。在18-25°C下离心全血后回收一层PMN,并用低渗溶液处理以裂解红细胞。用冷的95%甲醇和5%乙酸处理PMN 20 ± 10 分钟以固定细胞。将细胞在18-25°C下与磷酸盐缓冲盐水中的1%牛血清白蛋白 (BSA) 一起温育 60 ± 30 分钟,以阻断非特异性抗体结合。接下来,用Tris缓冲盐水-吐温 (TBS-T:Tris 缓冲盐水吐温,25.0mM Tris-HCl,2.7mM氯化钾,137mM氯化钠,0.05 %吐温-20,pH 7.4 ± 0.2) 洗涤3次后,对照将血清和测试样品血清以1:100至1:200稀释度加入微量滴定板中,并在18-25°C温育 60 ± 30 分钟。用TBS-T 洗涤3次后,以1:2000稀释度加入碱性磷酸酶偶联的抗狗免疫球蛋白A 抗体以标记PMN结合的抗体,并在18-25°C温育 60 ± 30 分钟。加入对硝基苯酚磷酸盐底物溶液,使显色进行 30 ± 30 分钟。使用ELISA板读数器在405nm下测量光密度 (OD)。

[0490] 为了确定APMNA-IgA的碱基截止值,可以使用具有固定ELISA单位 (EU/mL) 值的校准物和阴性对照样品。例如,将患者样品的OD值与校准器的OD值进行比较,并乘以校准器指定的值。具有大于基础截止值的平均EU值的患者样品被标记为APMNA反应性的ELISA阳性。类似地,具有小于或等于基础截止值的平均EU值的测试样品被确定为对APMNA 反应性为阴性。

[0491] 使用上述ELISA方法从疾病犬和表观健康的狗(对照)的血清样品获得的典型结果报告如下。使用非配对t检验比较数据,并使用EU(Elisa 单位/mL)表示为平均值±标准误差(SEM)。这些结果表明,与正常血清相比,PMN与IBD血清具有差异反应性,并且对PMN的免疫反应性可用于诊断IBD。

[0492] 表1. 来自疾病犬和对照狗的血清样品中的APMNA-IgA水平。

[0493]

来自疾病狗样品中的APMNA-IgA±SEM平均值	141.9±18.06
来自对照狗样品中的APMNA-IgA±SEM平均值	42.21±4.90
p值	<0.0001

[0494] 实施例3—鞭毛蛋白编码区的分离

[0495] 在获得所有者的知情同意后,从具有炎性肠病(IBD)的狗的培养物分离的活组织检查样品中克隆鞭毛蛋白编码区。使用具有超高密度抨击珠的 ZR真菌/细菌DNA分离试剂盒(Zymo-Research),根据制造商的方案从活组织检查样品中分离的冷冻微生物培养物中提取基因组DNA。将DNA制备物储存在-20℃。通过PCR扩增扩增目的基因的编码区。PCR反应在25μl终体积中进行,所述体积中含有补充有Taq DNA聚合酶(Thermo Fisher scientific) 的反应主混合物,DNA模板和0.5μM的每种正向和反向引物。将PCR反应混合物在94℃变性4-5分钟,然后扩增30个循环(95℃30秒,50℃30秒,72℃60秒)和72℃延伸10分钟,使用SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8的引物进行PCR反应。将PCR产物克隆到载体pJET1.2中并测序。从呈现IBD的狗的活组织检查样品中分离的鞭毛蛋白基因的氨基酸序列报告为SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO: 12和SEQ ID NO:13。然后根据制造商的推荐(Life Technologies)将编码区克隆到含有组氨酸标签的细菌表达载体中。组氨酸标签在蛋白质的N-末端表达,紧接在N-末端甲硫氨酸之后,并含有额外的丝氨酸和甘氨酸以增强组氨酸标签的呈现。包含额外的丝氨酸和甘氨酸以及六组氨酸序列的N-末端序列如SEQ ID NO 36所示。在一些实例中,具有较长序列的N末端序列以提高溶解度。使用带镍的纯化树脂纯化重组产物。

[0496] 实施例4—抗鞭毛蛋白抗体(AFA)水平的测定

[0497] 该实施例阐述制备重组鞭毛蛋白和使用直接ELISA测定法分析样品中的抗鞭毛蛋白抗体(AFA)水平。

[0498] 以下方案描述了鞭毛蛋白的纯化。将核酸序列克隆到聚组氨酸标记的蛋白质表达载体中以产生具有SEQ ID No.33的N-末端序列的HIS-鞭毛蛋白融合蛋白。例如,包含SEQ ID NO.9的鞭毛蛋白序列的最终序列是SEQ ID No.34的融合蛋白。用作抗原的各种鞭毛蛋白的融合蛋白以相同的方式表达。在大肠杆菌中表达后,使用镍纯化柱纯化融合蛋白。通过考马斯染色显示纯化的蛋白质具有预期的分子量。

[0499] 通过直接ELISA测定法检测结合鞭毛蛋白的狗IgA和IgG抗体,基本如下。来自健康和疾病狗的血清一式两份地分析对鞭毛蛋白的IgA反应性。将微量滴定板在4℃下用100μL/孔在碳酸盐溶液(100.0mM NaHCO₃-Na₂CO₃缓冲液,pH 9.5±0.5)中的0.2μg/mL鞭毛蛋白包被过夜。将板用TBS-T(Tris 缓冲盐水吐温,25.0mM Tris-HCl,2.7mM氯化钾,137mM氯化钠,0.05%吐温20,pH 7.4±0.2)洗涤三次并用200μL/孔TBS/BSA封闭(Tris缓冲盐水,25.0mM Tris-HCl,2.7mM氯化钾,137mM氯化钠,pH7.4±0.2,1%BSA),在18-25℃下保持1小时。用TBS-T洗涤板三次后,将标准和样品制备物加入每个孔中,并在18-25℃温育1小时。然后将板用TBS-T洗涤三次,并在18-25℃下用在TBS/BSA中1:5000稀释的辣根过氧化物酶(HRP)-抗狗IgA抗体孵育1小时。将板用TBS-T洗涤三次,并使用100μL/孔的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物显色。用0.33M H₂SO₄终止反应,并使用ELISA板读数器在450nm下测量光密度(OD)。使用四参数方程拟合标准曲线并用于估计样品中的抗体水平。抗鞭毛蛋白阳性反应性定义为高于用对照血清获得的平均反应性的两个标准差的反应性。

[0500] 使用上述ELISA方法从疾病狗和表观健康的狗(对照)的血清样品获得的典型结果报告如下。使用Mann Whitney检验比较数据,并使用EU(Elisa 单位/mL)表示为均值±均值的标准误(SEM)。这些结果表明,与对照血清相比,鞭毛蛋白差异地与IBD血清反应,并且对鞭毛蛋白多肽的免疫反应性可用于诊断IBD。

[0501] 表2. 来自疾病狗和对照狗的血清样品中的AFA-IgA水平。

鞭毛蛋白的来源	疾病狗 均值 ± SEM	对照狗 均值 ± SEM	p值
SEQ ID NO: 9	328.90 ± 50.55	48.84 ± 10.64	< 0.0001
[0502] SEQ ID NO: 10	303.90 ± 41.08	78.63 ± 12.62	0.0009
SEQ ID NO: 11	186.60 ± 33.08	50.83 ± 9.66	0.0019
SEQ ID NO: 12	244.40 ± 37.31	26.78 ± 10.26	< 0.0001
SEQ ID NO: 13	181.80 ± 35.00	20.15 ± 6.39	0.1784

[0503] 实施例5—分离OMPC编码区域

[0504] 该实施例阐述了外膜蛋白C(OmpC)编码区的克隆。

[0505] 从具有IBD的狗的培养物分离的活组织检查样品克隆OmpC编码区。使用具有超高密度抨击珠的ZR真菌/细菌DNA分离试剂盒(Zymo-Research),根据制造商的方案从活组织检查样品中分离的冷冻微生物培养物中提取基因组DNA。将DNA制剂储存在-20℃直至分析。通过PCR扩增扩增目的基因的编码区。PCR反应在25μl终体积中进行,所述体积含有补充有Taq DNA聚合酶(Thermo Fisher scientific)的反应主混合物,DNA模板,和0.5μM的每种SEQ ID NO:14的正向引物和SEQ ID NO:15的反向引物。PCR反应混合物在94℃变性4-5分钟,然后扩增30个循环(95℃30秒,50℃30秒,72℃60秒)和在72℃下延伸10分钟。将PCR产物克隆到载体pJET1.2中并测序。然后根据制造商的建议(Life Technologies)将编码区克隆到含有组氨酸标签的细菌表达载体中。使用带镍的纯化树脂纯化重组产物。从呈现IBD

的狗的活组织检查样品中分离的OmpC基因的氨基酸序列报告为SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, 和SEQ ID NO:18。

[0506] 实施例6—抗OmpC抗体 (ACA) 水平的测定

[0507] 该实施例阐述了制备OmpC蛋白质级分和使用直接ELISA测定法分析样品中的抗OmpC抗体 (ACA) 水平。

[0508] 以下方案描述了OmpC蛋白的纯化。将核酸序列克隆到具有额外溶解度序列的聚组氨酸标记蛋白表达载体中,以产生具有SEQ ID No.33的N末端序列的HIS-OmpC融合蛋白。例如,包含SEQ ID No.16的OmpC序列的最终序列是SEQ ID No.35的融合蛋白。用作抗原的各种OmpC蛋白的融合蛋白以相同的方式表达。在大肠杆菌中表达后,使用镍纯化柱在变性条件下纯化融合蛋白。通过考马斯染色显示纯化的蛋白质具有预期的分子量。

[0509] 结合OmpC的狗IgA抗体 (ACA-IgA) 的检测基本上通过直接ELISA测定进行,如下所述。将ELISA板在4°C下用100 μ l/孔在碳酸盐溶液 (100.0mM NaHCO₃-Na₂CO₃缓冲液, pH 9.5 \pm 0.5) 中的0.5 μ g/mL OmpC包被过夜。将板用TBS-T (Tris缓冲盐水吐温, 25.0mM Tris-HCl, 2.7mM氯化钾, 137mM 氯化钠, 0.05%吐温20, pH 7.4 \pm 0.2) 洗涤三次并用200 μ L/孔TBS/BSA封闭 (Tris缓冲盐水, 25.0mM Tris-HCl, 2.7mM氯化钾, 137mM氯化钠, pH7.4 \pm 0.2, 1% BSA), 在18-25°C下保持1小时。用TBS-T洗涤板三次后,将标准和样品制备物加入每个孔中,并在18-25°C温育1小时。然后将板用TBS-T洗涤三次,并在18-25°C下用在TBS/BSA中1:5000稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) -抗狗IgA抗体、在TBS/BSA中以1:10000稀释的根过氧化物酶 (HRP) -抗狗IgG1抗体、在TBS/BSA中以1:10000稀释的根过氧化物酶 (HRP) -抗狗 IgG2抗体、在TBS/BSA中以1:10000稀释的根过氧化物酶 (HRP) -抗狗IgM 抗体孵育1小时。将板用TBS-T洗涤三次,并使用100 μ L/孔的3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 基质显色。用0.33M H₂SO₄终止反应,并使用ELISA板读数器在450nm下测量光密度 (OD)。使用四参数方程拟合标准曲线并用于估计样品中的抗体水平。OmpC阳性反应性定义为高于用表观正常 (对照) 血清获得的平均反应性的两个标准差的反应性。

[0510] 使用上述ELISA方法从疾病狗和表观健康的狗 (对照) 的血清样品获得的典型结果报告如下。使用Mann Whitney检验比较数据,并使用EU (Elisa 单位/mL) 表示为均值 \pm 均值的标准误 (SEM)。这些结果表明,与正常血清相比,来自表达SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的克隆的OmpC蛋白差异地与IBD血清反应,并且对OmpC多肽的免疫反应性可以用于诊断IBD。从菌株大肠杆菌K12中纯化K12OmpC。

[0511] 表3. 来自疾病狗和对照狗的血清样品中的ACA-IgA水平。

OmpC的来源	疾病狗	对照狗	p值
	均值 \pm SEM	均值 \pm SEM	
大肠杆菌K12	37.15 \pm 7.27	41.3 \pm 10.06	0.3374
SEQ ID NO: 16	270.30 \pm 39.06	10.47 \pm 3.45	< 0.0001
SEQ ID NO: 17	317.90 \pm 48.91	53.18 \pm 12.17	< 0.0001
SEQ ID NO: 18	236.70 \pm 37.87	12.90 \pm 2.57	< 0.0001

[0513] 实施例7-犬科钙卫蛋白编码区的分离和重组多肽的制备

[0514] 该实施例阐述了钙卫蛋白编码区的克隆和钙卫蛋白多肽级分的制备。

[0515] 通过组装合成的寡核苷酸克隆钙卫蛋白基因的编码区。合成的构建体分别包括NdeI和HindIII作为目的基因的5'-和3'-末端的侧翼限制性位点,和N-末端区域的组氨酸标签,以产生HIS-钙卫蛋白融合多肽。设计编码区序列以优化大肠杆菌中的多肽表达。然后将组装的产物亚克隆到表达载体中,其中编码基因的N-末端区域有效连接至起始密码子和诱导型启动子系统。将表达构建体在大肠杆菌BL21中转化并铺在含有卡那霉素(50 μ g/mL)的LB琼脂平板上用于选择。分析全细胞裂解物的克隆选择。基因的氨基酸序列报告为SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,和SEQ ID NO:22,并且分别对应于犬科异嵌合多肽S100A8/A9,犬科多肽S100A12,犬科多肽S100A8和犬科多肽S100A9的核苷酸序列。

[0516] 以下方案描述了钙卫蛋白多肽的纯化。钙卫蛋白编码区的核酸序列被设计为包括聚组氨酸标签以产生HIS-钙卫蛋白融合多肽。在大肠杆菌中表达后,使用镍纯化柱纯化融合多肽。对于接种物制备和生产,将重组大肠杆菌细胞培养过夜(种子培养)。然后将种子培养物接种到较大烧瓶或微型生物反应器中的培养基中,比例为1至25,并培养直至在600nm处达到0.6-0.9的光密度(OD)。在该细胞密度下,用1mM IPTG(异丙基 β -D-1-硫代吡喃半乳糖苷)诱导细胞,并再进行发酵4-16小时。然后收获细胞并裂解。使用带镍的纯化树脂从全细胞裂解物中纯化重组多肽。通过考马斯染色显示纯化的重组多肽具有预期的分子量。将纯化的多肽制备物在二聚化缓冲液(具有钙,镁,20%甘油,0.02%叠氮化钠的Dulbecco磷酸盐缓冲液(DPBS),pH 7.0-7.2)中稀释5倍。将反应物在2-8 $^{\circ}$ C温育至少24小时。

[0517] 实施例8-狗血清样品中抗钙卫蛋白抗体(ACN)水平的测定

[0518] 该实施例阐述了使用多种钙卫蛋白多肽,应用直接ELISA测定法分析血清样品中的抗钙卫蛋白抗体(ACN)水平。

[0519] 结合钙卫蛋白的狗IgA抗体(ACN-IgA)的检测基本上通过直接ELISA测定进行,如下所述。将ELISA板在4 $^{\circ}$ C下用100 μ l/孔在碳酸盐溶液(100.0mM NaHCO₃-Na₂CO₃缓冲液,pH 9.5 \pm 0.5)中的0.5 μ g/mL钙卫蛋白包被过夜。将板用TBS-T(Tris缓冲液吐温,25.0mM Tris-HCl,2.7mM 氯化钾,137mM氯化钠,0.05%吐温20,pH 7.4 \pm 0.2)洗涤三次并用200 μ L/孔TBS/BSA封闭(Tris缓冲液吐温,25.0mM Tris-HCl,2.7mM氯化钾,137mM氯化钠,pH7.4 \pm 0.2,1%BSA),在18-25 $^{\circ}$ C下保持1小时。用TBS-T洗涤板三次后,将标准和样品制备物加入每个孔中,并在18-25 $^{\circ}$ C温育1小时。然后将板用TBS-T洗涤三次,并在18-25 $^{\circ}$ C下用在TBS/BSA中1:5000稀释的辣根过氧化物酶(HRP)-抗狗IgA抗体孵育1小时。将板用TBS-T洗涤三次,并使用100 μ L/孔的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物显色。用0.33M H₂SO₄终止反应,并使用ELISA板读数器在450nm下测量光密度(OD)。使用四参数方程拟合标准曲线并用于估计样品中的抗体水平。

[0520] 使用上述ELISA方法从疾病狗和表现健康的狗(对照)的血清样品获得的典型结果报告如下。使用Mann Whitney检验比较数据,并使用光密度值表示为均值 \pm 均值的标准误(SEM)。这些结果表明,与正常血清相比,来自表达SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22的克隆的钙卫蛋白多肽差异地与IBD血清反应,并且对钙卫蛋白多肽的免疫反应性可用于诊断IBD。

[0521] 表1.来自疾病狗和对照狗的血清样品中的ACN-IgA水平。

[0522]

钙卫蛋白的来源	描述	疾病狗 均值 ± SEM	对照狗 均值 ± SEM	p 值
SEQ ID NO: 19	异嵌合肽 S100A8/S100A9 的二聚体	0.488 ± 0.126	0.068 ± 0.017	0.0027
SEQ ID NO: 20	肽 S100A12 的二聚体	0.539 ± 0.138	0.062 ± 0.017	0.0021
SEQ ID NO: 21 和 SEQ ID NO: 22	肽 S100A8 和肽 S100A9 的二聚体	0.623 ± 0.151	0.110 ± 0.029	0.0027

[0523] 实施例9-狗血清样品中抗钙卫蛋白抗体 (ACN) 水平的测定

[0524] 该实施例阐述了使用SEQ ID NO:19的钙卫蛋白多肽,应用直接ELISA 测定法分析样品中的抗钙卫蛋白抗体 (ACN) 水平。

[0525] 结合钙卫蛋白的狗IgA抗体 (ACN-IgA) 的检测基本上通过直接ELISA 测定进行,如下所述。将ELISA板在4℃下用100μl/孔在碳酸盐溶液 (100.0mM NaHCO₃-Na₂CO₃缓冲液,pH 9.5±0.5) 中的0.5μg/mL钙卫蛋白包被过夜。将板用TBS-T (Tris缓冲盐水吐温,25.0mM Tris-HCl,2.7mM 氯化钾,137mM氯化钠,0.05%吐温20,pH 7.4±0.2) 洗涤三次并用200 μL/孔TBS/BSA封闭 (Tris缓冲盐水,25.0mM Tris-HCl,2.7mM氯化钾, 137mM氯化钠,pH7.4±0.2,1%BSA), 在18-25℃下保持1小时。用TBS-T 洗涤板三次后,将标准和样品制备物加入每个孔中,并在18-25℃温育1小时。然后将板用TBS-T洗涤三次,并在18-25℃下用在TBS/BSA中1:5000 稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) -抗狗IgA抗体孵育1小时。将板用TBS-T 洗涤三次,并使用100μL/孔的3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 底物显色。用0.33M H₂SO₄终止反应,并使用ELISA板读数器在450nm下测量光密度 (OD)。使用四参数方程拟合标准曲线并用于估计样品中的抗体水平。

[0526] 使用上述ELISA方法从疾病狗 (N=60) 和表观健康的狗 (对照,N= 28) 的血清样品获得的典型结果报告如下,其中所述疾病狗是通过内窥镜检查然后使用活组织检查确认IBD的诊断。使用Mann Whitney检验比较数据,并使用EU (Elisa单位) 表示为均值±均值的标准误 (SEM)。这些结果表明,与正常血清相比,来自表达SEQ ID NO:1的克隆的钙卫蛋白多肽差异地与IBD血清反应,并且对钙卫蛋白多肽的免疫反应性可用于诊断 IBD。

[0527] 表2. 来自疾病狗和对照狗的血清样品中的ACN-IgA水平。

[0528]

钙卫蛋白 的来源	描述	疾病狗 均值 ± SEM (EU)	对照狗 均值 ± SEM (EU)	p 值
SEQ ID NO:19	异嵌合肽 S100A8/S100A9 的 二聚体	45.45 ± 12.71	3.849 ± 0.488	< 0.0001

[0529] 实施例10-犬科整联蛋白编码区的分离和重组多肽的制备

[0530] 该实施例阐述了整联蛋白编码区的克隆和整联蛋白多肽级分的制备。

[0531] 使用从狗分离的cDNA作为模板,通过PCR扩增克隆犬科整联蛋白 α -4和犬科整联蛋白 β -7的编码区的片段。PCR反应在25 μ L终体积中进行,该体积含有补充有Taq DNA聚合酶(Thermo Fisher scientific),DNA模板和0.5 μ M各正向引物和反向引物的反应主混合物。为了扩增整联蛋白 α -4 编码区的片段,使用SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24的正向引物和SEQ ID NO:25的反向引物。为了扩增整联蛋白 β -7编码区的片段,使用SEQ ID NO:26的正向引物和SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的反向引物。将 PCR反应混合物在94 $^{\circ}$ C变性4-5分钟,然后扩增30个循环(95 $^{\circ}$ C 30秒, 50 $^{\circ}$ C 30秒,72 $^{\circ}$ C 60秒)和72 $^{\circ}$ C延伸10分钟。整联蛋白 α -4编码区的克隆片段的氨基酸序列报告为SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30。整联蛋白 β -7编码区的克隆片段的氨基酸序列报告为SEQ ID NO:31和SEQ ID NO: 32。根据制造商的推荐(Life Technologies)将PCR产物克隆到含有组氨酸标签的细菌表达载体中。

[0532] 以下方案描述了纯化的重组整联蛋白多肽的制备。整联蛋白编码区的核酸序列包括聚组氨酸标签以产生HIS-整联蛋白融合多肽。在大肠杆菌中表达后,使用镍纯化柱纯化融合多肽。对于接种物制备和生产,将重组大肠杆菌细胞培养过夜(种子培养)。将种子培养物以1比25的比例接种到较大的烧瓶或微型生物反应器中的培养基中,并培养直至在600nm处达到 0.6-0.9的光密度(OD)。在该细胞密度下,用1mM IPTG(异丙基 β -D-1- 硫代吡喃半乳糖苷)诱导细胞,并再进行发酵4-16小时。然后收获细胞并裂解。使用带镍的纯化树脂从全细胞裂解物中纯化重组多肽。通过考马斯染色显示纯化的重组多肽具有预期的分子量。

[0533] 实施例11-狗血清样品中抗整联蛋白抗体(AIN)水平的测定

[0534] 该实施例阐述了使用直接ELISA测定法分析样品中的抗整联蛋白抗体(AIN)水平。

[0535] 结合整联蛋白的狗IgA抗体(AIN-IgA)的检测基本上通过直接ELISA 测定进行,如下所述。将ELISA板在4 $^{\circ}$ C下以100 μ L/孔在碳酸盐溶液(100.0mM NaHCO₃-Na₂CO₃缓冲液,pH 9.5 \pm 0.5)中的0.2 μ g/mL整联蛋白多肽制备物包被过夜。将板用TBS-T(Tris缓冲盐水吐温,25.0mM Tris-HCl,2.7mM氯化钾,137mM氯化钠,0.05%吐温20,pH 7.4 \pm 0.2)洗涤三次并用200 μ L/孔TBS/BSA封闭(Tris缓冲盐水,25.0mM Tris-HCl, 2.7mM氯化钾,137mM氯化钠,pH7.4 \pm 0.2,1%BSA),在18-25 $^{\circ}$ C下保持1小时。用TBS-T洗涤板三次后,将标准和样品制备物加入每个孔中,并在18-25 $^{\circ}$ C温育1小时。然后将板用TBS-T洗涤三次,并在18-25 $^{\circ}$ C下用在TBS/BSA中1:5000稀释的辣根过氧化物酶(HRP)-抗狗IgA抗体孵育1小时。将板用TBS-T洗涤三次,并使用100 μ L/孔的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物显色。用0.33M H₂SO₄终止反

应,并使用ELISA板读数器在450nm下测量光密度(OD)。使用四参数方程拟合标准曲线并用于估计样品中的抗体水平。

[0536] 使用上述ELISA方法从疾病狗和表观健康的狗(对照)的血清样品获得的典型结果报告如下。使用Mann Whitney检验比较数据,并使用EU(Elisa 单位)表示为均值±均值的标准误(SEM)。另外,显示了对每种整联蛋白多肽通过绘制灵敏度对1-特异性而产生的接受者操作特征(ROC)曲线的曲线下面积(AUC)。

[0537] 这些结果表明,与正常血清相比,衍生自表达SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:31,和SEQ ID NO:32的克隆的整联蛋白多肽制备物差异地与IBD血清反应。对整联蛋白多肽的免疫反应性可用于诊断IBD。

[0538] 表3. 来自疾病狗和对照狗的血清样品中的AIN-IgA水平。

[0539]

整联蛋白	整联蛋白多肽	疾病狗 均值 ± SEM (EU)	对照狗 均值 ± SEM (EU)	p 值
SEQ ID NO: 29	α4	168.8 ± 55.74	16.92 ± 6.49	0.0001
SEQ ID NO: 30	α4	149.1 ± 54.65	24.78 ± 5.81	0.002
SEQ ID NO: 31	β7	149.3 ± 51.56	16.06 ± 4.12	0.0002
SEQ ID NO: 32	β7	145.9 ± 48.17	26.43 ± 6.26	0.0057
SEQ ID NO: 29 & SEQ ID NO: 31	α4 & β7	165.2 ± 55.95	23.73 ± 6.43	0.0013

[0540] 表4. 使用不同整联蛋白多肽在对照狗和疾病狗之间进行区分的ROC曲线获得的曲线下面积值(AUC)。

	AUC	标准误	P 值
SEQ ID NO: 29	0.844	0.069	0.0005
SEQ ID NO: 30	0.784	0.079	0.0038
[0541] SEQ ID NO: 31	0.850	0.062	0.0004
SEQ ID NO: 32	0.750	0.088	0.0109
SEQ ID NO: 29 和 SEQ ID NO: 31	0.797	0.079	0.0025

[0542] 实施例12-人血清样品中抗钙卫蛋白抗体IgA (ACN-IgA) 水平的测定

[0543] 该实施例阐述了使用直接ELISA测定法分析人血清样品中的抗钙卫蛋白抗体IgA (ACN) 水平。

[0544] 结合钙卫蛋白的人IgA抗体 (ACN-IgA) 的检测通过直接ELISA测定基本如下进行,

使用的人血清来自表观正常 (N) 和炎性肠病 (IBD) 受试者,特别是溃疡性结肠炎 (UC) 和克罗恩氏病 (CD) 受试者。

[0545] 将ELISA板在4℃下以100μL/孔在碳酸盐溶液 (100.0mM NaHCO₃-Na₂CO₃缓冲液, pH 9.5±0.5) 中的0.2μg/mL重组大肠杆菌衍生的人钙卫蛋白S100A8/S100A9异二聚体 (R&D Systems, 目录号8226-S8) 包被过夜。将板用TBS-T (Tris缓冲盐水吐温, 25.0mM Tris-HCl, 2.7mM 氯化钾, 137mM氯化钠, 0.05%吐温20, pH 7.4±0.2) 洗涤三次并用200 μL/孔TBS/BSA封闭 (Tris缓冲盐水, 25.0mM Tris-HCl, 2.7mM氯化钾, 137mM氯化钠, pH7.4±0.2, 1% BSA), 在18-25℃下保持1小时。用TBS-T 洗涤板三次后, 将标准和样品制备物加入每个孔中, 并在18-25℃温育1小时。然后将板用TBS-T洗涤三次, 并在18-25℃下用在TBS/BSA中1:2000 稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) -抗人IgA抗体孵育1小时。将板用TBS-T 洗涤三次, 并使用100μL/孔的3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 底物显色。用0.33M H₂SO₄终止反应, 并使用ELISA板读数器在450nm下测量光密度 (OD)。

[0546] 使用上述ELISA方法从IBD受试者、特别是溃疡性结肠炎 (UC) 和克罗恩病 (CD) 受试者和表观正常受试者的人血清样品获得的典型结果报告如下。使用Mann Whitney检验比较数据, 并使用光密度值表示为均值±均值的标准误 (SEM)。这些结果表明, 与正常血清相比, 钙卫蛋白差异地与 IBD血清反应, 并且对钙卫蛋白多肽的免疫反应性可用于诊断IBD。

[0547] 表5. 来自对照受试者 (正常) 和疾病受试者 (溃疡性结肠炎和克罗恩病) 的人血清样品中的ACN-IgA水平

[0548]

受试者组别	描述	均值 ± SEM
组 1	溃疡性结肠炎 (UC)	0.527 ± 0.052
组 2	表观正常(N)	0.442 ± 0.023
组 3	克罗恩病(CD)	0.779 ± 0.068
Mann Whitney 检验		P 值
组 1 vs 组 2	UC vs N	0.17
组 2 vs 组 3	N vs CD	< 0.0001

[0549] 实施例13-人血清样品中抗钙卫蛋白抗体IgG (ACN-IgG) 水平的测定

[0550] 该实施例阐述了使用直接ELISA测定法分析人血清样品中的抗钙卫蛋白抗体IgG (ACN-IgG) 水平。

[0551] 结合钙卫蛋白的人IgG抗体 (ACN-IgG) 的检测通过直接ELISA测定基本如下进行, 使用的人血清来自表观正常 (N) 和炎性肠病 (IBD) 受试者, 特别是溃疡性结肠炎 (UC) 和克罗恩病 (CD) 受试者。

[0552] 将ELISA板在4℃下以100μL/孔在碳酸盐溶液 (100.0mM NaHCO₃-Na₂CO₃缓冲液, pH 9.5±0.5) 中的0.2μg/mL重组大肠杆菌衍生的人钙卫蛋白S100A8/S100A9异二聚体 (R&D Systems, 目录号8226-S8) 包被过夜。将板用TBS-T (Tris缓冲盐水吐温, 25.0mM Tris-HCl, 2.7mM 氯化钾, 137mM氯化钠, 0.05%吐温20, pH 7.4±0.2) 洗涤三次并用200 μL/孔TBS/BSA封闭 (Tris缓冲盐水, 25.0mM Tris-HCl, 2.7mM氯化钾, 137mM氯化钠, pH7.4±0.2, 1%

BSA), 在18-25℃下保持1小时。用TBS-T 洗涤板三次后, 将标准和样品制备物加入每个孔中, 并在18-25℃温育1小时。然后将板用TBS-T洗涤三次, 并在18-25℃下用在TBS/BSA中1:10000 稀释的辣根过氧化物酶 (HRP)-抗人IgG抗体孵育1小时。将板用TBS-T 洗涤三次, 并使用100μL/孔的3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 底物显色。用0.33M H₂SO₄终止反应, 并使用ELISA板读数器在450nm下测量光密度 (OD)。

[0553] 使用上述ELISA方法从IBD受试者、特别是溃疡性结肠炎 (UC) 和克罗恩病 (CD) 受试者和表观正常受试者的人血清样品获得的典型结果报告如下。使用Mann Whitney检验比较数据, 并使用光密度值表示为均值±均值的标准误 (SEM)。

[0554] 表6. 来自对照受试者 (正常) 和疾病受试者 (溃疡性结肠炎和克罗恩病) 的人血清样品中的ACN-IgG水平

受试者组别	描述	均值 ± SEM
组 1	溃疡性结肠炎 (UC)	0.584 ± 0.078
组 2	表观正常(N)	0.510 ± 0.048
组 3	克罗恩病 (CD)	0.639 ± 0.076
Mann Whitney 检验		P 值
组 1 vs 组 2	UC vs N	0.2949
组 2 vs 组 3	N vs CD	0.3093

[0555] 实施例14-人血清样品中抗整联蛋白抗体IgA (AIN-IgA) 水平的测定

[0557] 该实施例阐述了使用直接ELISA测定法分析人血清样品中的抗整联蛋白抗体IgA (AIN-IgA) 水平。

[0558] 结合整联蛋白的人IgA抗体 (AIN-IgA) 的检测通过直接ELISA测定基本上如下进行, 使用的人血清来自表观正常 (N) 和炎性肠病 (IBD) 受试者, 特别是溃疡性结肠炎 (UC), 和克罗恩病 (CD) 受试者。

[0559] 将ELISA板在4℃下以100μL/孔在碳酸盐溶液 (100.0mM NaHCO₃-Na₂CO₃缓冲液, pH 9.5±0.5) 中的0.2μg/mL重组CHO细胞衍生的人整联蛋白α4β7 (R&D Systems, 目录号5397-A3) 包被过夜。将板用 TBS-T (Tris缓冲盐水吐温, 25.0mM Tris-HCl, 2.7mM氯化钾, 137mM氯化钠, 0.05%吐温20, pH 7.4±0.2) 洗涤三次并用200μL/孔TBS/BSA封闭 (Tris缓冲盐水, 25.0mM Tris-HCl, 2.7mM氯化钾, 137mM氯化钠, pH7.4 ±0.2, 1%BSA), 在18-25℃下保持1小时。用TBS-T洗涤板三次后, 将标准和样品制备物加入每个孔中, 并在18-25℃温育1小时。然后将板用 TBS-T洗涤三次, 并在18-25℃下用在TBS/BSA中1:2000稀释的辣根过氧化物酶 (HRP)-抗人IgA抗体孵育1小时。将板用TBS-T洗涤三次, 并使用100μL/孔的3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 基质显色。用0.33M H₂SO₄终止反应, 并使用ELISA板读数器在450nm下测量光密度 (OD)。

[0560] 使用上述ELISA方法从IBD受试者、特别是溃疡性结肠炎 (UC) 和克罗恩病 (CD) 受试者和表观正常受试者的人血清样品获得的典型结果报告如下。使用Mann Whitney检验比较数据, 并使用光密度值表示为均值±均值的标准误 (SEM)。这些结果表明, 与正常血清相比,

整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 差异地与IBD血清反应,并且对整联蛋白多肽的免疫反应性可用于诊断IBD。
 [0561] 表7.来自对照受试者(正常)和疾病受试者(溃疡性结肠炎和克罗恩病)的人血清样品中的AIN-IgA水平

受试者组别	描述	均值 \pm SEM
组 1	溃疡性结肠炎 (UC)	0.485 \pm 0.043
组 2	表观正常(N)	0.387 \pm 0.024
组 3	克罗恩病 (CD)	0.695 \pm 0.057
Mann Whitney 检验		P 值
组 1 vs 组 2	UC vs N	0.065
组 2 vs 组 3	N vs CD	< 0.0001

[0563] 实施例15-人血清样品中抗整联蛋白抗体IgG (AIN-IgG) 水平的测定

[0564] 该实施例阐述了使用直接ELISA测定法分析人血清样品中的抗整联蛋白抗体IgG (AIN-IgG) 水平。

[0565] 结合整联蛋白的人IgG抗体 (AIN-IgG) 的检测通过直接ELISA测定基本上如下进行,使用的人血清来自表观正常 (N) 和炎性肠病 (IBD) 受试者,特别是溃疡性结肠炎 (UC) 和克罗恩病 (CD) 受试者。

[0566] 将ELISA板在4°C下以100 μ L/孔在碳酸盐溶液(100.0mM NaHCO₃-Na₂CO₃缓冲液,pH 9.5 \pm 0.5)中的0.2 μ g/mL重组CHO细胞衍生的人整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ (R&D Systems,目录号5397-A3)包被过夜。将板用 TBS-T(Tris缓冲盐水吐温,25.0mM Tris-HCl,2.7mM氯化钾,137mM氯化钠,0.05%吐温20,pH 7.4 \pm 0.2)洗涤三次并用200 μ L/孔TBS/BSA封闭(Tris缓冲盐水,25.0mM Tris-HCl,2.7mM氯化钾,137mM氯化钠,pH7.4 \pm 0.2,1%BSA),在18-25°C下保持1小时。用TBS-T洗涤板三次后,将标准和样品制备物加入每个孔中,并在18-25°C温育1小时。然后将板用 TBS-T洗涤三次,并在18-25°C下用在TBS/BSA中1:10000稀释的辣根过氧化物酶(HRP)-抗人IgG抗体孵育1小时。将板用TBS-T洗涤三次,并使用100 μ L/孔的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物显色。用0.33M H₂SO₄终止反应,并使用ELISA板读数器在450nm下测量光密度(OD)。

[0567] 使用上述ELISA方法从IBD受试者、特别是溃疡性结肠炎 (UC) 和克罗恩病 (CD) 受试者和表观正常受试者的人血清样品获得的典型结果报告如下。使用Mann Whitney检验比较数据,并使用光密度值表示为均值 \pm 均值的标准误(SEM)。

[0568] 表8.来自对照受试者(正常)和疾病受试者(溃疡性结肠炎和克罗恩病)的人血清样品中的AIN-IgG水平

受试者组别	描述	均值 ± SEM
组 1	溃疡性结肠炎 (UC)	0.477 ± 0.057
组 2	表观正常(N)	0.510 ± 0.050
组 3	克罗恩病 (CD)	0.596 ± 0.072
Mann Whitney 检验		P 值
组 1 vs 组 2	UC vs N	0.2034
组 2 vs 组 3	N vs CD	0.1186

[0570] 实施例16-狗血清样品中ACA, APMNA, ACNA和AFA水平的测定

[0571] 该实施例阐述了使用直接ELISA测定法分析抗OmpC抗体水平(ACA), 抗犬科多形核白细胞抗体水平(APMNA), 抗钙卫蛋白抗体水平(ACNA) 和抗鞭毛蛋白抗体水平(AFA)。从三群组狗中收集血清样品: (i) “IBD狗”群组包括基于慢性胃肠道症状确认诊断为IBD的狗, 排除潜在的感染、内分泌或肿瘤疾病, 以及组织学炎症表现; (ii) “非IBD”群组包括主要具有急性胃肠道症状的狗; 和 (iii) “正常狗”群组包括没有明显胃肠道症状的狗。

[0572] 研究设计和入选标准。

[0573] 这是一项多中心研究, 旨在开发方法和系统, 以准确检测和测量狗中炎性肠病 (IBD) 相关标志物的内源性抗体的存在和/或水平。这些方法和系统通过使用非侵入性手段识别来自患者的样品是否与炎症疾病相关, 从而方便地提供对指导治疗决定有用的信息。在该研究中, 从具有胃肠症状的 IBD群组的狗和来自没有明显胃肠道症状的正常群组的狗中收集一次血清样品。狗主人签署知情同意书, 让他们的狗参加研究。如果IBD狗符合以下入选标准, 则被视为有资格参与: 呕吐, 腹泻, 厌食, 体重减轻或这些症状的某些组合至少3周; 在样本采集之前至少10天没有施用免疫抑制药物或抗生素; 并且通过活组织检查样品的组织病理学分析确认IBD。基于慢性胃肠道症状, 排除潜在的感染性、内分泌或肿瘤性疾病以及组织学炎症表现, 确认对狗的诊断为IBD。进行完整的临床评估, 包括血液学, 临床生物化学, 和根据需要进行粪便浮选, 贾第鞭毛虫 (Giardia) 抗原测试和腹部超声, 以排除感染、内分泌或肿瘤疾病。在IBD群组的所有狗中进行胃十二指肠镜检查, 并且用灵活的内窥镜活检钳收集来自胃, 十二指肠和结肠的活组织检查样品。根据犬科炎性肠病活动指数 (CIBDAI) 对所有IBD 狗进行评分。将全厚度活组织检查和/或内窥镜活组织检查立即置于冰冷的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 和4%缓冲的多聚甲醛溶液中直至处理。所有组织样品均由临床病理学家根据世界小动物兽医协会 (WSAVA) 指南进行处理和分级。对多种形态学参数 (即上皮损伤, 隐窝扩张, 乳房扩张, 粘膜纤维化) 和炎性组织学参数 (如浆细胞, 固有层淋巴细胞, 嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞) 进行评分, 并将得到的最终评分细分为组织学严重程度组: WSAVA评分为0=正常, 1-6=轻度, 7-12=中度, >13=严重。

[0574] 测定狗血清中对OMPC, PMN, 钙卫蛋白和鞭毛蛋白的抗体水平。

[0575] 通过直接ELISA测定检测针对特定抗原的犬科IgA抗体水平。来自IBD 狗, 非IBD狗和正常狗群组的血清一式两份地如前所述分析对OmpC (ACA-IgA), 犬科多形核白细胞 (APMNA-IgA), 犬科钙调蛋白 (ACNA-IgA) 和鞭毛蛋白的IgA (AFA-IgA) 反应性。

[0576] 用于制备包被材料的OmpC、钙卫蛋白和鞭毛蛋白的重组多肽分别是序列SEQ ID No:35,SEQ ID No:19和SEQ ID No:34的肽。如实施例2 中所述,从犬科血中分离PMN。

[0577] 简而言之,为了测定血清中的APMNA-IgA水平,将微量滴定板每孔用从每只狗收集的血液样品中分离的 12.5×10^3 至 200×10^3 个PMN包被。在18-25℃下离心全血并用低渗溶液处理以裂解红细胞,回收PMN层。用冷的95%甲醇和5%乙酸处理PMN 20±10分钟以固定细胞。将细胞在18-25℃下与磷酸盐缓冲盐水中的1%牛血清白蛋白(BSA)一起温育60±30分钟,以阻断非特异性抗体结合。接下来,用Tris缓冲盐水-吐温(TBS-T: Tris缓冲盐水吐温,25.0mM Tris-HCl,2.7mM氯化钾,137mM氯化钠,0.05%吐温20,pH 7.4±0.2)洗涤3次后,将对照血清和测试样品血清以1:50至1:100的稀释度加入微量滴定板中,并在18-25℃温育60±30分钟。用TBS-T洗涤3次后,加入1:2000稀释的碱性磷酸酶偶联的抗狗IgA以标记PMN结合的抗体,并在18-25℃温育60±30分钟。加入对硝基酚磷酸盐底物溶液,使显色进行30±10分钟。使用ELISA板读数器在405nm下测量光密度(OD)。

[0578] 对于所有其他标志物,将微量滴定板在4℃下以100μL/孔在碳酸盐溶液(100.0mM NaHCO₃-Na₂CO₃缓冲液,pH 9.5±0.5)中的0.2μg/mL至0.5 μg/mL抗原包被过夜。将板用TBS-T(Tris缓冲盐水吐温,25.0mM Tris-HCl,2.7mM氯化钾,137mM氯化钠,0.05%吐温20,pH 7.4±0.2)洗涤三次并用200μL/孔TBS/BSA封闭(Tris缓冲盐水,25.0mM Tris-HCl,2.7mM氯化钾,137mM氯化钠,pH7.4±0.2,1%BSA),在18-25℃下保持1小时。用TBS-T洗涤板三次后,将标准和样品制备物加入每个孔中,并在18-25℃温育1小时。然后将板用TBS-T洗涤三次,并在18-25℃下用在TBS/BSA中1:5000稀释的辣根过氧化物酶(HRP)-抗狗IgA抗体孵育1小时。将板用TBS-T洗涤三次,并使用100μL/孔的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物显色。用0.33M H₂SO₄终止反应,并使用ELISA板读数器在450nm下测量光密度(OD)。

[0579] 使用Softmax软件(Molecular Devices),相对于从具有阳性信号的狗获得的标准/校准物/参照确定抗体水平。受试样品的结果表示为ELISA单位/mL。循环ACA,APMNA,ACNA和AFA水平高于正常群组平均值两个标准差的血清可分别称为ACA阳性,APMNA阳性,ACNA阳性和AFA 阳性,而数值小于参照值可称为阴性。

[0580] 统计分析

[0581] 使用Graphpad Prism(GraphPad Software,La Jolla California USA)或Microsoft Office Excel(2013,Microsoft,Redmond,WA,USA)进行统计学分析。计算平均值,中位值,最小值,最大值和百分位数。通过ANOVA用Bonferroni的事后多重比较测试分析数据,并将其表示为平均值(±SEM)和p值。统计分析包括接受者操作特征(ROC)曲线下的面积和根据需要对每种标志物(单变量分析)和标志物组合(多变量分析)的诊断灵敏度和特异性的计算。可以使用多个参考值来计算性能、灵敏度和特异性的度量。p值<0.05被认为是显著的。

[0582] 结果

[0583] IBD狗群组包括70只不同年龄,性别和品种的狗,表现出慢性胃肠道症状。非IBD狗群组包括23只主要表现出急性胃肠道症状的狗。正常狗群组由五十八只不同年龄,性别和品种的狗组成,在临床现场就诊时没有明显的胃肠道症状。

[0584] 在所有登记的受试者中测定针对OmpC(ACA),犬科多形核白细胞(APMNA),钙卫蛋白(ACNA)和鞭毛蛋白(AFA)的IgA抗体的水平。

[0585] 使用上述ELISA方法从IBD狗和正常狗的血清样品获得的典型结果报告如下。使用对每个标志物通过绘制灵敏度对1-特异性而产生的接受者操作特征(ROC)曲线的曲线下面积(AUC)比较各组之间的数据。这些结果表明,与正常狗血清和非IBD狗血清相比,标志物差异地与IBD狗血清反应,并且对标志物的免疫反应性可用于检测IBD。

[0586] 表9.使用OmpC(ACA),PMN(APMNA),钙卫蛋白(ACNA)和鞭毛蛋白(AFA)标志物在IBD狗和正常狗群组之间进行区分的ROC曲线获得的曲线下面积值(AUC)。

[0587]

	ACA-IgA	APMNA-IgA	ACNA-IgA	AFA-IgA
ROC曲线下面积	0.915	0.924	0.774	0.766
P值	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
特异性	93%	91%	86%	80%
灵敏度	87%	86%	66%	64%
不确定的	4%	10%	7%	21%

[0588] 下表总结了在IBD,非IBD和正常群组中鉴定的阳性样品的百分比。具有比正常群组的平均值高两个标准差的值的样品被鉴定为阳性样品。数据显示IBD群组中阳性样本数显着更高。

[0589] 表10.每个群组的阳性血清样品的百分比。

[0590]

群组	ACA-IgA	APMNA-IgA	ACNA-IgA	AFA-IgA
IBD狗	75.7	77.1	42.9	38.6
非IBD狗	13.0	13.0	13.0	0.0
正常狗	3.4	8.6	8.6	8.6

[0591] 通过ANOVA用Bonferroni的事后多重比较检验分析数据,并且p值和平均值(\pm SEM)显示在下表中。数据显示IBD狗与非IBD狗群组和IBD狗与正常狗群组之间存在显着的统计学差异。正常狗与非IBD狗群组之间没有显着的统计学差异。

[0592] 表11.通过使用Bonferroni的事后多重比较检验的ANOVA分析获得的四种标志物ACA,APMNA,ACNA和AFA的P值结果。

[0593]

群组比较	ACA	APMNA	ACNA	AFA
正常vs IBD	<0.0001	0.0005	0.0009	<0.0001
非IBD vs IBD	<0.0001	<0.0001	0.0166	<0.0001
正常vs非IBD	0.6231	0.7873	0.9051	0.7770

[0594] 表12.对于IBD狗,非IBD狗和正常狗群组的四种标志物:ACA, APMNA,ACNA和AFA获得的均值 \pm SEM结果。

[0595]

群组	IBD	非IBD	正常
ACA	251.5 \pm 29.40	31.51 \pm 18.48	10.15 \pm 1.96
APMNA	121.8 \pm 12.42	26.04 \pm 5.15	20.96 \pm 1.42
ACNA	47.22 \pm 11.04	9.072 \pm 1.50	6.852 \pm 0.68

AFA	189.7±31.82	13.5±3.11	26.66±5.14
-----	-------------	-----------	------------

[0596] 总之,这些结果表明,在样品中检测OmpC、犬科多形核白细胞、钙卫蛋白和鞭毛蛋白、与炎性肠病 (IBD) 相关的标志物的内源性抗体的存在和 /或水平的方法可用于在狗中评估IBD。

[0597] 实施例17-在纵向研究中测定狗血清样品中的ACA和ACNA

[0598] 该实施例阐述了使用狗血清样品分析抗OmpC抗体水平 (ACA) 和抗钙卫蛋白抗体水平 (ACNA) 以监测疾病进展期间的标志物水平。

[0599] 在该研究中,从患有胃肠道症状的狗中收集血清样品,所述症状为例如长时间的呕吐,腹泻,厌食,体重减轻、或某种组合。血清样品在初次就诊时收集,并且可以在主治医师开出的治疗完成后在随访中收集。

[0600] 收集血清样品并在2至8°C短时间保存并在-10至-20°C长时间保存直至分析。

[0601] 使用先前描述的直接ELISA方法,测定针对OmpC (ACA) 和钙卫蛋白 (ACNA) 的狗IgA抗体的水平。

[0602] 使用Softmax软件 (Molecular Devices),相对于从具有阳性信号的狗获得的标准/校准物/参照,确定抗体水平。测试样品的结果表示为ELISA 单位/mL。具有循环ACA和ACNA水平的血清可以分类为低,中或高。这三个类别按如下方式定义:针对每个标志物(单变量分析)和针对标志物组合(多变量分析),适当地,分析受试者工作特征曲线 (ROC) 曲线下面积和计算诊断灵敏度和特异性。

[0603] 对于通过测试对OmpC和钙卫蛋白的免疫反应性而归类为阳性的狗,下面列出了典型的结果。

[0604] 表13.通过使用直接ELISA方法从收集自患有胃肠道症状的狗的血清样品获得的ACA-IgA和ACNA-IgA水平结果。

[0605]

受试者	血清样品	ACA-IgA (EU/mL)	ACNA-IgA (EU/mL)
狗 1	初次就诊	2021.6 (高)	60.5 (高)
狗 1	随访	497.6 (高)	60.1 (高)
狗 2	初次就诊	42.4 (高)	9.5 (中间)
狗 2	随访	2.7 (低)	4.9 (低)

[0606] 在测试OmpC和钙卫蛋白血清阳性的狗上进行活组织检查,基于该活组织检查,病理学家确认炎性肠病的证据。例如,对于狗2,观察到具有嗜酸性粒细胞的中度淋巴浆细胞性肠炎和轻度淋巴浆细胞性胃炎:来自胃的组织切片具有轻度炎症的特征,淋巴细胞和浆细胞在胃基质内轻度积聚;来自肠的组织切片具有中度炎症的特征,淋巴细胞和浆细胞在固有层中具有中度积聚,绒毛结构肿胀,并且乳糜管 (lacteals) 在绒毛尖端偶尔扩张。

[0607] 这些结果表明,检测样品中与炎性肠病 (IBD) 相关的一种或多种内源性抗体的存在和/或水平的方法,可用于检测和监测IBD。序列表

[0608]

SEQ ID NO	基因	序列
SEQ ID NO: 1	鞭毛蛋白	FW:5'-gctttaactgtaaacaccaac-3'
SEQ ID NO: 2	鞭毛蛋白	REV:5'-ctactgaagcagtttcagga-3'
SEQ ID NO: 3	鞭毛蛋白	FW:5'-gctttatctgtaataccaacac-3'
SEQ ID NO: 4	鞭毛蛋白	REV:5'-ttactgaagcagtttcagtaccg-3'
SEQ ID NO: 5	鞭毛蛋白	FW:5'-gcacaagtcattaataccaac-3'
SEQ ID NO: 6	鞭毛蛋白	REV:5'-ttaacgtaacagagacagaac-3'
SEQ ID NO: 7	鞭毛蛋白	FW:5'-gcacaagtcattaataccaac-3'
SEQ ID NO: 8	鞭毛蛋白	REV:5'-ttaaccctgcagcagaga-3'
SEQ ID NO: 9	鞭毛蛋白	MALTVNTNIASVTTQVNLNKASTAQTSMQRLSSGLRINSAKD DAAGLQIANRLTSQINGLGQAVKNANDGISIAQTAEGAMQAST DILQKMRTLALSSATGSLSPDDRKSNNDEYQALTAELNRISATTT FGGQKLLDGSYGTKAIQVGANANETINLTLDNVSAKSIGSQQL KTGNISISKDGLAAGELAVTGNNGQTKTVNYGPGASAKDVAAQL NGAIGGLTATASTEVKLDASGATAAAPANFDLTVGGSTVSFVGV TDNASLADQLKSNAAKLGISVNYDESTKNLEIKSDTGENITFAP KAGAPGVKIAAKNGSGTYGAAVPLNAAAGDKSVVTGQISLDS AKGYSIADGAGANGAGSTAALYGTGVTSVSSKKTNVSDTDVTS ATNAQNAVAVIDKAIGSIDSVRSGLGATQNRLTTTVDNLQNIQK NSTAARSTVQDVDFASETAELTKQQTLLQASTAILSQANQLPSS VLKLLQ
SEQ ID NO: 10	鞭毛蛋白	MALSVNTNIASITTQGNLTKASTAQTSMQRLSSGLRINSAKDD AAGLQISNRLTSQINGLGQAVKNANDGISIAQTAEGAMQASTDI LQKMRTLALSSATGSLSADDRKSNNDEYQALTAELTRISQTTTF GGQKLLDGSYGTKAIQVGANANETINLTLDNVAANNIGSQQVK SVAITPSATGVDAGTVTVTGNNGQTKDVTVTAGDSAKTIAANLN GAIGGLTATASTEVSQFSVDKTAPAAINFELTVGSQKVSFVGVTD ASLADQLKSNAAKLGISVNYDESNGGSLSVKSDTGENLVFGAG DAAAQAGIKVNAKDGNGEYAASGTALTAADLYVTGAISLDSAK GYSLTGGGVTKLFSAAAGTAATSVKTTIADTDVTDATKAQNALA VIDKAIGSIDSVRSGLGATQNRLQTTVDNLQNIQKNSTAARSTV QDVDFASETAELTKQQTLLQASTAILSQANQLPSSVLKLLQ
SEQ ID NO: 11	鞭毛蛋白	MAQVINTNYLSLVTQNNLNKSGTLGSAIERLSSGLRINSAKDD AAGQAIANRFTSNVNGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNN LQRIRELTVQAKNGTNSNSDITSIQNEVKERLDEINRISEQTFN GVKVLSGEKSEMVIQVGTNDNETIKFNLDKVDNDTLGVASDKL FDTKTEKKGVTGEGAIDAADIGVTGATKYEGGTVKEYKVDG KVSADKVFNDGTDKDYLVSKSDFKLKAGTADTAFTGSKTTEF KADAGKDVKTLNVKDDALATLTKAINTIDESRSKLGAIQNRFE STINNLNNTVNNLSASRSRILDADYATEVSNMSRGQILQQAGTS VLAQANQVPQTVLSLLR
SEQ ID NO: 12	鞭毛蛋白	MAQVINTNSLSLITQNNINKNQSALSSIERLSSGLRINSAKDDA AGQAIANRFTSNIKGLTQAARNANDGISLAQTTEGALSEINNNL

[0609]

		QRVRELTVQATTGTNSDSLSSIQDEIKSRLDEIDRVSGQTQFNG VNVLAKNGTMKIQVGANDGQTIIDLQKIDSSTLGLNGLSVSK NSLNVSEPVQTQINNAANTAPLKVDLSAVATDLGVDASSLTLNSV LDKDG NATKNYVVKSGNDYFAASVDRATGKVALNKADVEYT DPANGLTTAATQAGQFVKVSADKDG NATAFVTFQGKNYAAKA ASLVD TG DATTAAQGT AATTNKVTLQLSDKAAVIGTGTAANPQ FPATSATAEFAGTATNDPLALLDKAIASVDKFRSSLGAVQNRLSS AVTNLNNTTTNLSEAQSRIQDADYATEVSNMSKAQIVQQAGNS VLSKANQVPQQVLSLLQG
SEQ ID NO: 13	鞭毛蛋白	MAQVINTNSLSLITQNNINKNQSALSSSIERLSSGLRINSAKDDA AGQAIANRFTSNIKGLTQAARNANDGISVAQTTEGALSEINNNL QRVRELTVQATTGTNSQSDLSIQDEIKSRLDEIDRVSGQTQFNG VNVPAKD GSMKIQVGANDGQTITIDLKIDSSTLKLTFNNGS GSVANTAATKADLAAAIGTPGAADSTGAIAYTVSAGLTKTTAA DVLSSLADGTTITATGVKNGFAAGATS NAYKLNKDNNTFTYDT TATTAELQSYLTPKAGDTATFSVEIGGTTQDVLSSDGKLTAKD GSKLYIDTTGNLTQNGGNGVGT LAEATLSGLALNNNNGAAAV KSTITTADNTSIVLNGSSNGTEGTIAVTGAVISSAALQSASKTTGF TVGTADTAGYISVGT DGSVQAYDVATSGNKDSY TNTDGLTTD NTTKLYLQKDGSVTNGSGKAVYVEADGDFTTDAATKAATTTDP LAALDDAISQIDKFRSSLGAIQNRLDSAVTNLNNTTTNLSEAQSR IQDADYATEVSNMSKAQIIQQAGNSVLAKANQVPQQVLSLLQG
SEQ ID NO: 14	OMPC	FW:5'-ctgaagtttacaacaagac-3'
SEQ ID NO: 15	OMPC	REV:5'-ttagaactggtaaaccagacc-3'
SEQ ID NO: 16	OMPC	AEVYNKDGNKLDLYGKVDGLHYFSDNKSEDGDQTYVRLGFK GETQVTDQLTG YGQWEYQIQGNTSEDNKENS WTRVAFAGLKF QDVGSFDYGRNYGVVYDVTSWTDVLP EFGGDTYGSDFMQQ RGNGFATYRNTDFFGLVDGLNFAVQYQGKNGSVSGEGMTNNG RGALRQNGDGVGGSITYDYEGFGIGAAVSSSKRTDDQNGSYTS NGVVRNYIGTGDR AETYTGGLKYDANNIYLAAQYTQTYNATR VGSLGWANKAQNF EAVAQYQDFGLRPSLAYLQSKGKNLGVIN GRNYDDEDILKYVDVGATYYFNKNMSTYVDYKINLLDDNQFT RDAGINTDNIVALGLVYQF
SEQ ID NO: 17	OMPC	AEVYNKDGNKLDLYGKVDGLHYFSDNKDVDGDQTYMRLGFK GETQVTDQLTG YGQWEYQIQGNSAENENNS WTRVAFAGLKFQ DVGSFDYGRNYGVVYDVTSWTDVLP EFGGDTYGSDFMQQR GNGFATYRNTDFFGLVDGLNFAVQYQGKNGSVSGEGMTNNGR GALRQNGDGVGGSITYDYEGFGIGGAISSSKRTDDQNSPLYIGN GDRAETYTGGLKYDANNIYLAAQYTQTYNATRVGSLGWANKA QNFEAVAQYQDFGLRPSVAYLQSKGKNLGVINGRNYDDEDIL KYVDVGATYYFNKNMSTYVDYKINLLDDNQFTRDAGINTDNIV ALGLVYQF
SEQ ID NO: 18	OMPC	AEVYNKDGNKLDLYGKVDGLHYFSDNDSKDGDKTYMRLGFK GETQVTDQLTG YGQWEYQIQGNEPESDNSS WTRVAFAGLKFQD VGSFDYGRNYGVVYDVTSWTDVLP EFGGDTYDSDNFMQQRG

[0610]

		NGFATYRNTDFDFGLVDGLDFAVQYQGKNGSAHGEGMTTNGRD DVFEQNGDGVGGSITYNYEGFGIGA AVSSSKRTWDQNNTGLIG TGDRAETYTGGLKYDANNIYLAAQYTQTYNATRVGSLGWANK AQNFEAVAQYQDFGLRPSLAYLQSKGKNLGRGYDDEDILKYV DVGATYYFNKNMSTYVDYKINLLDDNRFRTRDAGINTDDIVALG LVYQF
SEQ ID NO: 19	异嵌合的 S100A8/ S100A9	MGSSHHHHHGLTELESAINSLIEVYHKYSLVKGNHALYRDDL KKLLETECPQYMKKKDADTWQELDVNSDGAINFEEFLILVIKV GVASHKDIHKEGGGGSGGGGSGGGGSADQMSQLECSIETIINIFH QYSVRLEHDPKLNQKEMKQLVKKELPNFLKKQKKNDAINKIM EDLDTNGDKELNFEFEFSILVARLTVASHEEMHKNAPEGEGHSHG PGFGEQSQGHCHSHGGHGHGHSH
SEQ ID NO: 20	S100A12	MGSSHHHHHGHGKLEDHLEGIVDVFHRY SARVGHPTLSK GEM KQLIIRELPNTLKN TKDQATVDKLFQDL DADKDGQVNFNEFISL VSVVLDTSHKNTHKE
SEQ ID NO: 21	S100A8	MGSSHHHHHGLTELESAINSLIEVYHKYSLVKGNHALYRDDL KKLLETECPQYMKKKDADTWQELDVNSDGAINFEEFLILVIKV GVASHKDIHKE
SEQ ID NO: 22	S100A9	MGSSHHHHHGHGADQMSQLECSIETIINIFHQYSVRLEHDPKLNQ KEMKQLVKKELPNFLKKQKKNDAINKIMEDLDTNGDKELNFE EFSILVARLTVASHEEMHKNAPEGEGHSHGPGFGEQSQGFFIXHG GHGHGHSH
SEQ ID NO: 23	$\alpha 4$	FW: 5'-GTGTCTGCCTCTCGACCTCGG-3'
SEQ ID NO: 24	$\alpha 4$	FW: 5'-CAGAGAATTGAAGGATTTCAAATCAGC-3'
SEQ ID NO: 25	$\alpha 4$	REV: 5'-TTATGTGAAATGACGTTTGGGTCTTTG-3'
SEQ ID NO: 26	$\beta 7$	FW:5'-GAATTGGATGCCAAGATCTCC-3'
SEQ ID NO: 27	$\beta 7$	REV:5'-TTACAGTGTGTGCAGCTCCACAGTCAG-3'
SEQ ID NO: 28	$\beta 7$	REV:5'-TTAGTGATCCGCGCCTCTCTCTTG-3'
SEQ ID NO: 29	$\alpha 4$	WLVVGAPTARWLANASVVNPGAIYRCRIGGNPGLTCEQLQLGS PSGEPGKTCLEERDNQWLGVTL SRQPGENGSI VTCGHRWKNIF YIKNENKLP MGVCYGMPSDLRTEL SKRIAPCYQDYVRKFGENF ASCQAGISSFYTEDLIVMGAPGSSYWTGSLFVYNITTNKYKAFL DRQNQVKFGSYLGYSVGAGHFRSPHTTEVVG GAPQHEQIGKAY IFSIEAKELSILHEMKGKGLGSYFGASVCAVDLNADGFSDLLVGA PMQSTIREEGRV FVYINSGSGAVMNEMETELIGSDKYAARFGESI VNLGDIDNDGFEDVAVGAPQEDDLRGAVYIYNGRADGISTAFSQ RIEGFQISKLSMFGQSIGQIDADNNGYVDVAVGAFRSDSAVLL RTRPVVIVEVSLNHPESVNRTNFDCVENGLPSVCMDLTL CFSYK GKEVPGYIVLLYNMSLDVNRKIDSPSRFYFSSNGTSDVITGSMK

[0611]

		VSSKVPNCRTHQAFMRKDVRDILTPIQIEAAYRLGQHVIKRRSTE EFPPLQPILQQKKERDIIKTFINARFCAHENC SADLQVSARIGFL KPHENKTYVAVGSMKTVMLNVSLFNAGDDAYETALHIRLPSGL YFIKILDLEEKQINCEVTDSSGSVKLDCSIGYIYMDRLSRMDISFL LDVSSLSQAEEDLSLTVHATCANEREMDNLNKVTLAIPLKYEVM LSVHG FVNPTSFYIGPKEENEPDTCMAEKMNFTFHVINTGHSMA PNVSVEIMVPNSFAPQTDKLFNILDVQPAGECHFKEYQRKCALE QEKGAMKILKDIFTFLSKTDKLLFCMKADPYCLTILCHLGKME SGKEASVHIQLEGRPYLSEMDETSALKFEVRVTAPEPNPKVIEL NKDENVAHV LLEGLHHQRPKRHFT
SEQ ID NO: 30	$\alpha 4$	VSASRPRPGSTPPPPWQVYPVAEAWEGGASSSGSGEQGPRAGG CGAPAGSSPKVLVAKSGARGLSSSWWGRRGDAQARGFGAGSW ELEGDLAHVCAHLHGCPGLWLVVGAPTARWLANASVVNPGAI YRCRIGGNPGLTCEQLQLGSPSGEPCGKTCLEERDNQWLGVTL RQPGENGSI VTCGHRWKNIFYIKNENKLP MGVCYGMPSDLRTEL SKRIAPCYQDYVRKFGENFASCQAGISSFYTEDLIVMGAPGSSY WTGSLFVYNITTNKYKAFLDRQNQVKFGSYLGYSVGAGHFRSP HTTEVVGAPQHEQIGKAYIFSIEAKELSILHEMKGKGLGSYFGA SVCVDLNADGFSDLLVGAPMQSTIREEGRVFVYINSGSGAVMN EMETELIGSDKYAARFGESIVNLGDIDNDGFEDVAVGAPQEDDL RGAVYIYNGRADGISTAFSQRIEGFQISKLSMFGQSISGQIDADN NGYVDVAVGAFRSDSAVLLRTRPVVIVEVSLNHPESVNR TNFDC VENGLPSVCMDLTLCF SYKGKEVPGYIVLLYNMSLDVNRKIDSP SRFYFSSNGTSDVITGSMKVSSKVPNCRTHQAFMRKDVRDILTPI QIEAAYRLGQHVIKRRSTEEFPPLQPILQQKKERDIIKTFINARFC AHENC SADLQVSARIGFLKPHENKTYVAVGSMKTVMLNVSLFN AGDDAYETALHIRLPSGLYFIKILDLEEKQINCEVTDSSGSVKLDC SIGYIYMDRLSRMDISFLLDVSSLSQAEEDLSLTVHATCANEREM DNLNKVTLAIPLKYEVM LSVHG FVNPTSFYIGPKEENEPDTCMA EKMNFTFHVINTGHSMA PNVSVEIMVPNSFAPQTDKLFNILDVQ PAGECHFKEYQRKCALEQEKGAMKILKDIFTFLSKTDKLLFCM KADPYCLTILCHLGKME SGKEASVHIQLEGRPYLSEMDETSALK FEVRVTAPEPNPKVIELNKDENVAHV LLEGLHHQRPKRHFT
SEQ ID NO: 31	$\beta 7$	ELDAKISSAEKATEWRDPDLSLLGSCQPAPSCRECILSHPSCAWC KQLFWGLGIRDQDASPF GSWG GSPWPAHRCR PALWCLFCDPPP PPPASAPRLSPGPSRRCTLDPLL CRRLHRAPCALCPACTLHPALR LGTPCATSTWPARPLAQSPCPLPGFGSFVDKTVLPFVSTVPAKL RHPCPTRLERCQPPFSFRHVLSLTGDATAFEREVGRQSVSGNLD PEGGFDAILQAALCQEKIGWRNVSRLLVFTSDDTFHTAGDGKLG GIFMPSDGHCHLDSNGLYSRSPFDYPSVGQVAQALSTANIQPIFA VTSATLPVYQELSKLIPKSAVGELSEDSSNVVQLIMDAYNSLSST VTLEHSALPPGVHISYESLCGDPEKREAEAGDRGQC SHVPINHT VNFLVTLQATRCLPEPHLLRLRALGFSEELTVELHL
SEQ ID NO: 32	$\beta 7$	ELDAKISSAEKATEWRDPDLSLLGSCQPAPSCRECILSHPSCAWC KQLFWGLGIRDQDASPF GSWG GSPWPAHRCR PALWCLFCDPPP

[0612]

		PPPASAPRLSPGPSRRCTLDPLLCRRLHRAPCALCPAPCTLHPALR LGTPCATSTWPARPLAQSPCPLPGFGSFVDKTVLPFVSTVPAKL RHPCPTRLERCQPPFSFRHVLSTGDATAFEREVGRQSVSGNLDS PEGGFDAILQAALCQEKIGWRNVSRLLVFTSDDTFHTAGDGKLG GIFMPSDGHCHLDSNGLYSRSPFDYPSVGQVAQALSTANIQPIFA VTSATLPVYQELSKLIPKSAVGELSEDSSNVVQLIMDAYNSLST VTLEHSALPPGVHISYESLCGDPEKREAEAGDRGQC SHVPINHT VNFLVTLQATRCLPEPHLLRLRALGFSEELTVELHTLDCNCSDT QPQAPHCSDGQGLLQCGVCSCAPGRLGRLCECSEAELSSPDLES GCRAPNGTGPLCSGKGRQCQCGRCSCSGQSSGPLCECDDASCER HEGILCGGFGHCQCGRCHCHANRTGSACECSMDTDSCLGPEGE VCSGHGDCKCNRCQCRDGYFGALCEQCSGCKTSCERHRDCAE CGAFGTGPLATNCSVACAHYNVTLALVPVLDGWDGCKERTLDNQ LLFFLVEEEAGGMVVLTVRPQERGADH
SEQ ID NO: 33	标签	MGSSHHHHHHGSGLVPRGSASMSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKV SDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFKRQKEMDSLRFYDGIQADQTPE DLDMEDNDIIEAHREQIGG
SEQ ID NO: 34	鞭毛蛋白	MGSSHHHHHHGSGLVPRGSASMSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKV SDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFKRQKEMDSLRFYDGIQADQTPE DLDMEDNDIIEAHREQIGGALTVNTNIASVTTQVNLNKASTAQTTSMQRL SSGLRINSAKDDAAGLQIANRLTSQINGLGQAVKNANDGISIAQTAEGAM QASTDILQKMRTLALSSATGSLSPDDRKSNNDEYQALTAELNRISATTTFG GQKLLDGSYGTAKAIQVGANANETINLTDNVSAKSIGSQQLKTGNISISKD GLAAGELAVTGNGQTKTVNYGPGASAKDVAAQLNGAIGGLTATASTEVK LDASGATAAAPANFDLTVGGSTVSFVGVTDNASLADQLKSNAAKLGISVN YDESTKNLEIKSDTGENITFAPKAGAPGVKIAAKNGSGTYGAAVPLNAAA GDKSVVTGQISLDSAKGYSIADGAGANGAGSTAALYGTGVTSVSSKKTN VSDTDVTSATNAQNAVAVIDKAIGSIDSVRSGLGATQNRLLTTVDNLQNIQ KNSTAARSTVQDVFASETAELTKQQTLLQASTAILSQANQLPSSVLKLLQ
SEQ ID NO: 35	OMPC	MGSSHHHHHHGSGLVPRGSASMSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKV SDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFKRQKEMDSLRFYDGIQADQTPE DLDMEDNDIIEAHREQIGGAEVYKDGKLDLYGKVDGLHYFSDNKSED GDQTYVRLGFKGETQVTDQLTGYGQWEYQIQGNTSEDNKENSWTRVAF AGLKFQDVGSFDYGRNYGVVYDVTSWTDVLPFEGDQTYGSDNFMQQR GNGFATYRNTDFFGLVDGLNFAVQYQGKNGSVSSEGMTNNGRGALRQN GDGVGGSITYDYEGFGIGA AVSSSKRTDDQNGSYTSNGVVRNYIGTGDR ETYTGGLKYDANNIYLAQYQTQYNATRVGSLGWANKAQNFEAVAQYQ FDFGLRPSLAYLQSKGKNLGVINGRNYDDEDILKYVDVGATYYFNKNMS TYVDYKINLLDDNQFTRDAGINTDNIVALGLVYQF
SEQ ID NO: 36	聚His标签	MGSSHHHHHHG

[0613] 参考文献

[0614] Xavier,R.J.&Podolsky,D.K.Nature 448:427-434 (2007) .

[0615] Cerquetella,M等人,World J.Gastroent.16:1050-1056 (2010) .

[0616] Hall,EJ.Hill's Pet Nutrition(2009) .

[0617] Hasida等人,J.Clin.Lab.Anal.11:267-286 (1997) .

- [0618] Braun, J., 美国专利号6,033,864, 公开日:3月7日(2000) .
- [0619] Walsh&Rose, 美国专利号6,218,129, 公开日:4月17日(2001) .
- [0620] Lindberg等人, Gut, 33:909-913(1992) .
- [0621] Sendid等人, Clin.Diag.Lab.Immunol., 3:219-226(1996) .
- [0622] Frosh等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 82:1194-1198(1985) .
- [0623] Fukazawa, Y, 在"Immunology of Fungal Disease," E.Kurstak等人(编著), Marcel Dekker Inc., New York, pp.37-62(1989) .
- [0624] Kikuchi等人, Planta, 190:525-535(1993) .
- [0625] Nikaido, H. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67:593-656(2003) .
- [0626] Braun&Sutton, 美国专利号6,309,643, 公开日:10月30日(2001) .
- [0627] Scalice, E.R.&Daiss, J.L., 美国专利号6,838,250, 公开日:1月4日(2005) .
- [0628] Krakauer, T., 美国专利号6,406,862, 公开日:6月18日(2002) .
- [0629] Melnick, J.L.&Wallis, C., 美国专利号4,277,250, 公开日:7月7日, 1981
- [0630] Okuda, S.&Uchida, K., 美国专利号4,920,045, 公开日:4月24日(1990) .
- [0631] Nolan, J.P.&Mandy, F. Cytometry 69:318-325(2006) .
- [0632] Felici, F等人, Methods Enzymol. 267:116-129(1996) .
- [0633] The immunoassay handbook, 第4版, D.Wild ed. Newnes, (2013) .
- [0634] Harlow和Lane. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York(1988) .
- [0635] Buechler, K., 美国专利号6,019,944, 公开日:2月1日(2000) .
- [0636] Anderson, M. Nucleic Acid Hybridization, Springer Verlag, New York(1999) .
- [0637] Hardinam, G. Microarray Methods and Applications: The Nuts and Bolts Series, DNA Press(2003) .
- [0638] Baldi, P.&G. Westley Hatfield. DNA Microarrays and Gene Expression: From Experiments to Data Analysis and Modeling, Cambridge University Press, (2002) .
- [0639] Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990) .

序 列 表

	<110> 维蒂卡实验室公司 (Vetica Labs, Inc.)	
	<120> 在伴侣动物中检测炎症标志物和治疗炎性病症的方法	
	<130> VTL-01-PCT	
	<150> US 62/252, 266	
	<151> 2015-11-06	
	<150> US 62/373, 307	
	<151> 2016-08-10	
	<160> 36	
	<170> PatentIn 版本 3.5	
	<210> 1	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未鉴定的细菌物种 (Unidentified Bacteria Species)	
	<400> 1	
	gctttaactg taaacaccaa c	21
[0001]	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未鉴定的细菌物种	
	<400> 2	
	ctactgaagc agtttcagga	20
	<210> 3	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未鉴定的细菌物种	
	<400> 3	
	gctttatctg ttaataccaa catc	24
	<210> 4	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未鉴定的细菌物种	

	<400> 4	
	ttactgaagc agtttcagta ccg	23
	<210> 5	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未鉴定的细菌物种	
	<400> 5	
	gcacaagtca ttaataccaa c	21
	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未鉴定的细菌物种	
	<400> 6	
	ttaacgtaac agagacagaa c	21
[0002]	<210> 7	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未鉴定的细菌物种	
	<400> 7	
	gcacaagtca ttaataccaa c	21
	<210> 8	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未鉴定的细菌物种	
	<400> 8	
	ttaaccctgc agcagaga	18
	<210> 9	
	<211> 484	
	<212> PRT	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未鉴定的细菌物种	

<400> 9
 Met Ala Leu Thr Val Asn Thr Asn Ile Ala Ser Val Thr Thr Gln Val
 1 5 10 15
 Asn Leu Asn Lys Ala Ser Thr Ala Gln Thr Thr Ser Met Gln Arg Leu
 20 25 30
 Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Leu
 35 40 45
 Gln Ile Ala Asn Arg Leu Thr Ser Gln Ile Asn Gly Leu Gly Gln Ala
 50 55 60
 Val Lys Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Ala Glu Gly
 65 70 75 80
 Ala Met Gln Ala Ser Thr Asp Ile Leu Gln Lys Met Arg Thr Leu Ala
 85 90 95
 Leu Ser Ser Ala Thr Gly Ser Leu Ser Pro Asp Asp Arg Lys Ser Asn
 100 105 110
 Asn Asp Glu Tyr Gln Ala Leu Thr Ala Glu Leu Asn Arg Ile Ser Ala
 115 120 125
 Thr Thr Thr Phe Gly Gly Gln Lys Leu Leu Asp Gly Ser Tyr Gly Thr
 130 135 140
 Lys Ala Ile Gln Val Gly Ala Asn Ala Asn Glu Thr Ile Asn Leu Thr
 145 150 155 160
 Leu Asp Asn Val Ser Ala Lys Ser Ile Gly Ser Gln Gln Leu Lys Thr
 [0003] 165 170 175
 Gly Asn Ile Ser Ile Ser Lys Asp Gly Leu Ala Ala Gly Glu Leu Ala
 180 185 190
 Val Thr Gly Asn Gly Gln Thr Lys Thr Val Asn Tyr Gly Pro Gly Ala
 195 200 205
 Ser Ala Lys Asp Val Ala Ala Gln Leu Asn Gly Ala Ile Gly Gly Leu
 210 215 220
 Thr Ala Thr Ala Ser Thr Glu Val Lys Leu Asp Ala Ser Gly Ala Thr
 225 230 235 240
 Ala Ala Ala Pro Ala Asn Phe Asp Leu Thr Val Gly Gly Ser Thr Val
 245 250 255
 Ser Phe Val Gly Val Thr Asp Asn Ala Ser Leu Ala Asp Gln Leu Lys
 260 265 270
 Ser Asn Ala Ala Lys Leu Gly Ile Ser Val Asn Tyr Asp Glu Ser Thr
 275 280 285
 Lys Asn Leu Glu Ile Lys Ser Asp Thr Gly Glu Asn Ile Thr Phe Ala
 290 295 300
 Pro Lys Ala Gly Ala Pro Gly Val Lys Ile Ala Ala Lys Asn Gly Ser
 305 310 315 320
 Gly Thr Tyr Gly Ala Ala Val Pro Leu Asn Ala Ala Ala Gly Asp Lys
 325 330 335
 Ser Val Val Thr Gly Gln Ile Ser Leu Asp Ser Ala Lys Gly Tyr Ser
 340 345 350

Ile Ala Asp Gly Ala Gly Ala Asn Gly Ala Gly Ser Thr Ala Ala Leu
 355 360 365
 Tyr Gly Thr Gly Val Thr Ser Val Ser Ser Lys Lys Thr Asn Val Ser
 370 375 380
 Asp Thr Asp Val Thr Ser Ala Thr Asn Ala Gln Asn Ala Val Ala Val
 385 390 395 400
 Ile Asp Lys Ala Ile Gly Ser Ile Asp Ser Val Arg Ser Gly Leu Gly
 405 410 415
 Ala Thr Gln Asn Arg Leu Thr Thr Thr Val Asp Asn Leu Gln Asn Ile
 420 425 430
 Gln Lys Asn Ser Thr Ala Ala Arg Ser Thr Val Gln Asp Val Asp Phe
 435 440 445
 Ala Ser Glu Thr Ala Glu Leu Thr Lys Gln Gln Thr Leu Gln Gln Ala
 450 455 460
 Ser Thr Ala Ile Leu Ser Gln Ala Asn Gln Leu Pro Ser Ser Val Leu
 465 470 475 480
 Lys Leu Leu Gln

<210> 10

<211> 476

<212> PRT

[0004] <213> 未知

<220>

<223> 未鉴定的细菌物种

<400> 10

Met Ala Leu Ser Val Asn Thr Asn Ile Ala Ser Ile Thr Thr Gln Gly
 1 5 10 15
 Asn Leu Thr Lys Ala Ser Thr Ala Gln Thr Thr Ser Met Gln Arg Leu
 20 25 30
 Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Leu
 35 40 45
 Gln Ile Ser Asn Arg Leu Thr Ser Gln Ile Asn Gly Leu Gly Gln Ala
 50 55 60
 Val Lys Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Ala Glu Gly
 65 70 75 80
 Ala Met Gln Ala Ser Thr Asp Ile Leu Gln Lys Met Arg Thr Leu Ala
 85 90 95
 Leu Ser Ser Ala Thr Gly Ser Leu Ser Ala Asp Asp Arg Lys Ser Asn
 100 105 110
 Asn Asp Glu Tyr Gln Ala Leu Thr Ala Glu Leu Thr Arg Ile Ser Gln
 115 120 125
 Thr Thr Thr Phe Gly Gly Gln Lys Leu Leu Asp Gly Ser Tyr Gly Thr
 130 135 140
 Lys Ala Ile Gln Val Gly Ala Asn Ala Asn Glu Thr Ile Asn Leu Thr

145 150 155 160
 Leu Asp Asn Val Ala Ala Asn Asn Ile Gly Ser Gln Gln Val Lys Ser
 165 170 175
 Val Ala Ile Thr Pro Ser Ala Thr Gly Val Asp Ala Gly Thr Val Thr
 180 185 190
 Val Thr Gly Asn Gly Gln Thr Lys Asp Val Thr Val Thr Ala Gly Asp
 195 200 205
 Ser Ala Lys Thr Ile Ala Ala Asn Leu Asn Gly Ala Ile Gly Gly Leu
 210 215 220
 Thr Ala Thr Ala Ser Thr Glu Val Gln Phe Ser Val Asp Lys Thr Ala
 225 230 235 240
 Pro Ala Ala Asn Phe Glu Leu Thr Val Gly Ser Gln Lys Val Ser Phe
 245 250 255
 Val Gly Val Thr Asp Thr Ala Ser Leu Ala Asp Gln Leu Lys Ser Asn
 260 265 270
 Ala Ala Lys Leu Gly Ile Ser Val Asn Tyr Asp Glu Ser Asn Gly Gly
 275 280 285
 Ser Leu Ser Val Lys Ser Asp Thr Gly Glu Asn Leu Val Phe Gly Ala
 290 295 300
 Gly Asp Ala Ala Ala Gln Ala Gly Ile Lys Val Asn Ala Lys Asp Gly
 305 310 315 320
 Asn Gly Glu Tyr Ala Ala Ser Gly Thr Ala Leu Thr Ala Ala Asp Leu
 [0005] 325 330 335
 Tyr Val Thr Gly Ala Ile Ser Leu Asp Ser Ala Lys Gly Tyr Ser Leu
 340 345 350
 Thr Gly Gly Gly Val Thr Lys Leu Phe Ser Ala Ala Gly Thr Ala Ala
 355 360 365
 Thr Ser Val Lys Thr Thr Ile Ala Asp Thr Asp Val Thr Asp Ala Thr
 370 375 380
 Lys Ala Gln Asn Ala Leu Ala Val Ile Asp Lys Ala Ile Gly Ser Ile
 385 390 395 400
 Asp Ser Val Arg Ser Gly Leu Gly Ala Thr Gln Asn Arg Leu Gln Thr
 405 410 415
 Thr Val Asp Asn Leu Gln Asn Ile Gln Lys Asn Ser Thr Ala Ala Arg
 420 425 430
 Ser Thr Val Gln Asp Val Asp Phe Ala Ser Glu Thr Ala Glu Leu Thr
 435 440 445
 Lys Gln Gln Thr Leu Gln Gln Ala Ser Thr Ala Ile Leu Ser Gln Ala
 450 455 460
 Asn Gln Leu Pro Ser Ser Val Leu Lys Leu Leu Gln
 465 470 475

 <210> 11
 <211> 365
 <212> PRT

Ala Asp Val Glu Tyr Thr Asp Pro Ala Asn Gly Leu Thr Thr Ala Ala
 260 265 270
 Thr Gln Ala Gly Gln Phe Val Lys Val Ser Ala Asp Lys Asp Gly Asn
 275 280 285
 Ala Thr Ala Phe Val Thr Phe Gln Gly Lys Asn Tyr Ala Ala Lys Ala
 290 295 300
 Ala Ser Leu Val Asp Thr Gly Asp Ala Thr Thr Ala Ala Gln Gly Thr
 305 310 315 320
 Ala Ala Thr Thr Asn Lys Val Thr Leu Gln Leu Ser Asp Lys Ala Ala
 325 330 335
 Val Ile Gly Thr Gly Thr Ala Ala Asn Pro Gln Phe Pro Ala Thr Ser
 340 345 350
 Ala Thr Ala Glu Phe Ala Gly Thr Ala Thr Asn Asp Pro Leu Ala Leu
 355 360 365
 Leu Asp Lys Ala Ile Ala Ser Val Asp Lys Phe Arg Ser Ser Leu Gly
 370 375 380
 Ala Val Gln Asn Arg Leu Ser Ser Ala Val Thr Asn Leu Asn Asn Thr
 385 390 395 400
 Thr Thr Asn Leu Ser Glu Ala Gln Ser Arg Ile Gln Asp Ala Asp Tyr
 405 410 415
 Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Lys Ala Gln Ile Val Gln Gln Ala
 420 425 430
 [0008] Gly Asn Ser Val Leu Ser Lys Ala Asn Gln Val Pro Gln Gln Val Leu
 435 440 445
 Ser Leu Leu Gln Gly
 450

<210> 13
 <211> 572
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 未鉴定的细菌物种
 <400> 13

Met Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Ile Thr Gln Asn
 1 5 10 15
 Asn Ile Asn Lys Asn Gln Ser Ala Leu Ser Ser Ser Ile Glu Arg Leu
 20 25 30
 Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln
 35 40 45
 Ala Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ser Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala
 50 55 60
 Ala Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Val Ala Gln Thr Thr Glu Gly
 65 70 75 80
 Ala Leu Ser Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Thr

	85	90	95
	Val Gln Ala Thr Thr Gly Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile		
	100	105	110
	Gln Asp Glu Ile Lys Ser Arg Leu Asp Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly		
	115	120	125
	Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val Asn Val Pro Ala Lys Asp Gly Ser Met		
	130	135	140
	Lys Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Gln Thr Ile Thr Ile Asp Leu		
	145	150	155
	Lys Lys Ile Asp Ser Ser Thr Leu Lys Leu Thr Gly Phe Asn Val Asn		
	165	170	175
	Gly Ser Gly Ser Val Ala Asn Thr Ala Ala Thr Lys Ala Asp Leu Ala		
	180	185	190
	Ala Ala Ala Ile Gly Thr Pro Gly Ala Ala Asp Ser Thr Gly Ala Ile		
	195	200	205
	Ala Tyr Thr Val Ser Ala Gly Leu Thr Lys Thr Thr Ala Ala Asp Val		
	210	215	220
	Leu Ser Ser Leu Ala Asp Gly Thr Thr Ile Thr Ala Thr Gly Val Lys		
	225	230	235
	Asn Gly Phe Ala Ala Gly Ala Thr Ser Asn Ala Tyr Lys Leu Asn Lys		
	245	250	255
[0009]	Asp Asn Asn Thr Phe Thr Tyr Asp Thr Thr Ala Thr Thr Ala Glu Leu		
	260	265	270
	Gln Ser Tyr Leu Thr Pro Lys Ala Gly Asp Thr Ala Thr Phe Ser Val		
	275	280	285
	Glu Ile Gly Gly Thr Thr Gln Asp Val Val Leu Ser Ser Asp Gly Lys		
	290	295	300
	Leu Thr Ala Lys Asp Gly Ser Lys Leu Tyr Ile Asp Thr Thr Gly Asn		
	305	310	315
	Leu Thr Gln Asn Gly Gly Asn Asn Gly Val Gly Thr Leu Ala Glu Ala		
	325	330	335
	Thr Leu Ser Gly Leu Ala Leu Asn Asn Asn Asn Gly Ala Ala Ala Val		
	340	345	350
	Lys Ser Thr Ile Thr Thr Ala Asp Asn Thr Ser Ile Val Leu Asn Gly		
	355	360	365
	Ser Ser Asn Gly Thr Glu Gly Thr Ile Ala Val Thr Gly Ala Val Ile		
	370	375	380
	Ser Ser Ala Ala Leu Gln Ser Ala Ser Lys Thr Thr Gly Phe Thr Val		
	385	390	395
	Gly Thr Ala Asp Thr Ala Gly Tyr Ile Ser Val Gly Thr Asp Gly Ser		
	405	410	415
	Val Gln Ala Tyr Asp Val Ala Thr Ser Gly Asn Lys Asp Ser Tyr Thr		
	420	425	430
	Asn Thr Asp Gly Thr Leu Thr Thr Asp Asn Thr Thr Lys Leu Tyr Leu		
	435	440	445

Gln Lys Asp Gly Ser Val Thr Asn Gly Ser Gly Lys Ala Val Tyr Val
 450 455 460
 Glu Ala Asp Gly Asp Phe Thr Thr Asp Ala Ala Thr Lys Ala Ala Thr
 465 470 475 480
 Thr Thr Asp Pro Leu Ala Ala Leu Asp Asp Ala Ile Ser Gln Ile Asp
 485 490 495
 Lys Phe Arg Ser Ser Leu Gly Ala Ile Gln Asn Arg Leu Asp Ser Ala
 500 505 510
 Val Thr Asn Leu Asn Asn Thr Thr Thr Asn Leu Ser Glu Ala Gln Ser
 515 520 525
 Arg Ile Gln Asp Ala Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Lys
 530 535 540
 Ala Gln Ile Ile Gln Gln Ala Gly Asn Ser Val Leu Ala Lys Ala Asn
 545 550 555 560
 Gln Val Pro Gln Gln Val Leu Ser Leu Leu Gln Gly
 565 570

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> 未知

<220>

[0010] <223> 未鉴定的细菌物种

<400> 14

ctgaagttta caacaagac

20

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<223> 未鉴定的细菌物种

<400> 15

ttagaactgg taaaccagac c

21

<210> 16

<211> 355

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 未鉴定的细菌物种

<400> 16

Ala Glu Val Tyr Asn Lys Asp Gly Asn Lys Leu Asp Leu Tyr Gly Lys
 1 5 10 15

Val Asp Gly Leu His Tyr Phe Ser Asp Asn Lys Ser Glu Asp Gly Asp

	20		25		30
Gln Thr Tyr Val Arg Leu Gly Phe Lys Gly Glu Thr Gln Val Thr Asp					
	35		40		45
Gln Leu Thr Gly Tyr Gly Gln Trp Glu Tyr Gln Ile Gln Gly Asn Thr					
	50		55		60
Ser Glu Asp Asn Lys Glu Asn Ser Trp Thr Arg Val Ala Phe Ala Gly					
65		70		75	80
Leu Lys Phe Gln Asp Val Gly Ser Phe Asp Tyr Gly Arg Asn Tyr Gly					
	85		90		95
Val Val Tyr Asp Val Thr Ser Trp Thr Asp Val Leu Pro Glu Phe Gly					
	100		105		110
Gly Asp Thr Tyr Gly Ser Asp Asn Phe Met Gln Gln Arg Gly Asn Gly					
	115		120		125
Phe Ala Thr Tyr Arg Asn Thr Asp Phe Phe Gly Leu Val Asp Gly Leu					
	130		135		140
Asn Phe Ala Val Gln Tyr Gln Gly Lys Asn Gly Ser Val Ser Gly Glu					
145		150		155	160
Gly Met Thr Asn Asn Gly Arg Gly Ala Leu Arg Gln Asn Gly Asp Gly					
	165		170		175
Val Gly Gly Ser Ile Thr Tyr Asp Tyr Glu Gly Phe Gly Ile Gly Ala					
	180		185		190
Ala Val Ser Ser Ser Lys Arg Thr Asp Asp Gln Asn Gly Ser Tyr Thr					
[0011]	195		200		205
Ser Asn Gly Val Val Arg Asn Tyr Ile Gly Thr Gly Asp Arg Ala Glu					
	210		215		220
Thr Tyr Thr Gly Gly Leu Lys Tyr Asp Ala Asn Asn Ile Tyr Leu Ala					
225		230		235	240
Ala Gln Tyr Thr Gln Thr Tyr Asn Ala Thr Arg Val Gly Ser Leu Gly					
	245		250		255
Trp Ala Asn Lys Ala Gln Asn Phe Glu Ala Val Ala Gln Tyr Gln Phe					
	260		265		270
Asp Phe Gly Leu Arg Pro Ser Leu Ala Tyr Leu Gln Ser Lys Gly Lys					
	275		280		285
Asn Leu Gly Val Ile Asn Gly Arg Asn Tyr Asp Asp Glu Asp Ile Leu					
	290		295		300
Lys Tyr Val Asp Val Gly Ala Thr Tyr Tyr Phe Asn Lys Asn Met Ser					
305		310		315	320
Thr Tyr Val Asp Tyr Lys Ile Asn Leu Leu Asp Asp Asn Gln Phe Thr					
	325		330		335
Arg Asp Ala Gly Ile Asn Thr Asp Asn Ile Val Ala Leu Gly Leu Val					
	340		345		350
Tyr Gln Phe					
	355				

<210> 17

<211> 346
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 未鉴定的细菌物种
 <400> 17
 Ala Glu Val Tyr Asn Lys Asp Gly Asn Lys Leu Asp Leu Tyr Gly Lys
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Leu His Tyr Phe Ser Asp Asn Lys Asp Val Asp Gly Asp
 20 25 30
 Gln Thr Tyr Met Arg Leu Gly Phe Lys Gly Glu Thr Gln Val Thr Asp
 35 40 45
 Gln Leu Thr Gly Tyr Gly Gln Trp Glu Tyr Gln Ile Gln Gly Asn Ser
 50 55 60
 Ala Glu Asn Glu Asn Asn Ser Trp Thr Arg Val Ala Phe Ala Gly Leu
 65 70 75 80
 Lys Phe Gln Asp Val Gly Ser Phe Asp Tyr Gly Arg Asn Tyr Gly Val
 85 90 95
 Val Tyr Asp Val Thr Ser Trp Thr Asp Val Leu Pro Glu Phe Gly Gly
 100 105 110
 Asp Thr Tyr Gly Ser Asp Asn Phe Met Gln Gln Arg Gly Asn Gly Phe
 115 120 125
 [0012] Ala Thr Tyr Arg Asn Thr Asp Phe Phe Gly Leu Val Asp Gly Leu Asn
 130 135 140
 Phe Ala Val Gln Tyr Gln Gly Lys Asn Gly Ser Val Ser Gly Glu Gly
 145 150 155 160
 Met Thr Asn Asn Gly Arg Gly Ala Leu Arg Gln Asn Gly Asp Gly Val
 165 170 175
 Gly Gly Ser Ile Thr Tyr Asp Tyr Glu Gly Phe Gly Ile Gly Gly Ala
 180 185 190
 Ile Ser Ser Ser Lys Arg Thr Asp Asp Gln Asn Ser Pro Leu Tyr Ile
 195 200 205
 Gly Asn Gly Asp Arg Ala Glu Thr Tyr Thr Gly Gly Leu Lys Tyr Asp
 210 215 220
 Ala Asn Asn Ile Tyr Leu Ala Ala Gln Tyr Thr Gln Thr Tyr Asn Ala
 225 230 235 240
 Thr Arg Val Gly Ser Leu Gly Trp Ala Asn Lys Ala Gln Asn Phe Glu
 245 250 255
 Ala Val Ala Gln Tyr Gln Phe Asp Phe Gly Leu Arg Pro Ser Val Ala
 260 265 270
 Tyr Leu Gln Ser Lys Gly Lys Asn Leu Gly Val Ile Asn Gly Arg Asn
 275 280 285
 Tyr Asp Asp Glu Asp Ile Leu Lys Tyr Val Asp Val Gly Ala Thr Tyr
 290 295 300
 Tyr Phe Asn Lys Asn Met Ser Thr Tyr Val Asp Tyr Lys Ile Asn Leu

	305		310		315		320
	Leu Asp Asp Asn Gln Phe Thr Arg Asp Ala Gly Ile Asn Thr Asp Asn						
		325		330		335	
	Ile Val Ala Leu Gly Leu Val Tyr Gln Phe						
		340		345			
	<210>	18					
	<211>	343					
	<212>	PRT					
	<213>	未知					
	<220>						
	<223>	未鉴定的细菌物种					
	<400>	18					
	Ala Glu Val Tyr Asn Lys Asp Gly Asn Lys Leu Asp Leu Tyr Gly Lys						
	1	5		10		15	
	Val Asp Gly Leu His Tyr Phe Ser Asp Asn Asp Ser Lys Asp Gly Asp						
		20		25		30	
	Lys Thr Tyr Met Arg Leu Gly Phe Lys Gly Glu Thr Gln Val Thr Asp						
		35		40		45	
	Gln Leu Thr Gly Tyr Gly Gln Trp Glu Tyr Gln Ile Gln Gly Asn Glu						
		50		55		60	
[0013]	Pro Glu Ser Asp Asn Ser Ser Trp Thr Arg Val Ala Phe Ala Gly Leu						
	65	70		75		80	
	Lys Phe Gln Asp Val Gly Ser Phe Asp Tyr Gly Arg Asn Tyr Gly Val						
		85		90		95	
	Val Tyr Asp Val Thr Ser Trp Thr Asp Val Leu Pro Glu Phe Gly Gly						
		100		105		110	
	Asp Thr Tyr Asp Ser Asp Asn Phe Met Gln Gln Arg Gly Asn Gly Phe						
		115		120		125	
	Ala Thr Tyr Arg Asn Thr Asp Phe Phe Gly Leu Val Asp Gly Leu Asp						
		130		135		140	
	Phe Ala Val Gln Tyr Gln Gly Lys Asn Gly Ser Ala His Gly Glu Gly						
	145	150		155		160	
	Met Thr Thr Asn Gly Arg Asp Asp Val Phe Glu Gln Asn Gly Asp Gly						
		165		170		175	
	Val Gly Gly Ser Ile Thr Tyr Asn Tyr Glu Gly Phe Gly Ile Gly Ala						
		180		185		190	
	Ala Val Ser Ser Ser Lys Arg Thr Trp Asp Gln Asn Asn Thr Gly Leu						
		195		200		205	
	Ile Gly Thr Gly Asp Arg Ala Glu Thr Tyr Thr Gly Gly Leu Lys Tyr						
		210		215		220	
	Asp Ala Asn Asn Ile Tyr Leu Ala Ala Gln Tyr Thr Gln Thr Tyr Asn						
	225	230		235		240	
	Ala Thr Arg Val Gly Ser Leu Gly Trp Ala Asn Lys Ala Gln Asn Phe						
		245		250		255	

Glu Ala Val Ala Gln Tyr Gln Phe Asp Phe Gly Leu Arg Pro Ser Leu
 260 265 270
 Ala Tyr Leu Gln Ser Lys Gly Lys Asn Leu Gly Arg Gly Tyr Asp Asp
 275 280 285
 Glu Asp Ile Leu Lys Tyr Val Asp Val Gly Ala Thr Tyr Tyr Phe Asn
 290 295 300
 Lys Asn Met Ser Thr Tyr Val Asp Tyr Lys Ile Asn Leu Leu Asp Asp
 305 310 315 320
 Asn Arg Phe Thr Arg Asp Ala Gly Ile Asn Thr Asp Asp Ile Val Ala
 325 330 335
 Leu Gly Leu Val Tyr Gln Phe
 340

<210> 19

<211> 243

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 异嵌合的 S100A8/S100A9

<400> 19

[0014] Met Gly Ser Ser His His His His His His Gly Leu Thr Glu Leu Glu
 1 5 10 15
 Ser Ala Ile Asn Ser Leu Ile Glu Val Tyr His Lys Tyr Ser Leu Val
 20 25 30
 Lys Gly Asn Tyr His Ala Leu Tyr Arg Asp Asp Leu Lys Lys Leu Leu
 35 40 45
 Glu Thr Glu Cys Pro Gln Tyr Met Lys Lys Lys Asp Ala Asp Thr Trp
 50 55 60
 Phe Gln Glu Leu Asp Val Asn Ser Asp Gly Ala Ile Asn Phe Glu Glu
 65 70 75 80
 Phe Leu Ile Leu Val Ile Lys Val Gly Val Ala Ser His Lys Asp Ile
 85 90 95
 His Lys Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 100 105 110
 Gly Ser Ala Asp Gln Met Ser Gln Leu Glu Cys Ser Ile Glu Thr Ile
 115 120 125
 Ile Asn Ile Phe His Gln Tyr Ser Val Arg Leu Glu His Pro Asp Lys
 130 135 140
 Leu Asn Gln Lys Glu Met Lys Gln Leu Val Lys Lys Glu Leu Pro Asn
 145 150 155 160
 Phe Leu Lys Lys Gln Lys Lys Asn Asp Asn Ala Ile Asn Lys Ile Met
 165 170 175
 Glu Asp Leu Asp Thr Asn Gly Asp Lys Glu Leu Asn Phe Glu Glu Phe
 180 185 190
 Ser Ile Leu Val Ala Arg Leu Thr Val Ala Ser His Glu Glu Met His

195 200 205
 Lys Asn Ala Pro Glu Gly Glu Gly His Ser His Gly Pro Gly Phe Gly
 210 215 220
 Glu Gly Ser Gln Gly His Cys His Ser His Gly Gly His Gly His Gly
 225 230 235 240
 His Ser His

<210> 20
 <211> 102
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> S100A12
 <400> 20

[0015]

Met Gly Ser Ser His His His His His His Gly Thr Lys Leu Glu Asp
 1 5 10 15
 His Leu Glu Gly Ile Val Asp Val Phe His Arg Tyr Ser Ala Arg Val
 20 25 30
 Gly His Pro Asp Thr Leu Ser Lys Gly Glu Met Lys Gln Leu Ile Ile
 35 40 45
 Arg Glu Leu Pro Asn Thr Leu Lys Asn Thr Lys Asp Gln Ala Thr Val
 50 55 60
 Asp Lys Leu Phe Gln Asp Leu Asp Ala Asp Lys Asp Gly Gln Val Asn
 65 70 75 80
 Phe Asn Glu Phe Ile Ser Leu Val Ser Val Val Leu Asp Thr Ser His
 85 90 95
 Lys Asn Thr His Lys Glu
 100

<210> 21
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> S100A8
 <400> 21

Met Gly Ser Ser His His His His His His Gly Leu Thr Glu Leu Glu
 1 5 10 15
 Ser Ala Ile Asn Ser Leu Ile Glu Val Tyr His Lys Tyr Ser Leu Val
 20 25 30
 Lys Gly Asn Tyr His Ala Leu Tyr Arg Asp Asp Leu Lys Lys Leu Leu
 35 40 45
 Glu Thr Glu Cys Pro Gln Tyr Met Lys Lys Lys Asp Ala Asp Thr Trp
 50 55 60

	<210> 24	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未鉴定的细菌物种	
	<400> 24	
	cagagaattg aaggatttca aatcagc	27
	<210> 25	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未鉴定的细菌物种	
	<400> 25	
	ttatgtgaaa tgacgtttgg gtctttg	27
	<210> 26	
	<211> 21	
	<212> DNA	
[0017]	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未鉴定的细菌物种	
	<400> 26	
	gaattggatg ccaagatctc c	21
	<210> 27	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未鉴定的细菌物种	
	<400> 27	
	ttacagtgtg tgcagctcca cagtcag	27
	<210> 28	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未鉴定的细菌物种	
	<400> 28	
	ttagtgatcc gcgcctctct cttg	24

<210> 29
 <211> 909
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 未鉴定的细菌物种
 <400> 29
 Trp Leu Val Val Gly Ala Pro Thr Ala Arg Trp Leu Ala Asn Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Val Asn Pro Gly Ala Ile Tyr Arg Cys Arg Ile Gly Gly Asn Pro
 20 25 30
 Gly Leu Thr Cys Glu Gln Leu Gln Leu Gly Ser Pro Ser Gly Glu Pro
 35 40 45
 Cys Gly Lys Thr Cys Leu Glu Glu Arg Asp Asn Gln Trp Leu Gly Val
 50 55 60
 Thr Leu Ser Arg Gln Pro Gly Glu Asn Gly Ser Ile Val Thr Cys Gly
 65 70 75 80
 His Arg Trp Lys Asn Ile Phe Tyr Ile Lys Asn Glu Asn Lys Leu Pro
 85 90 95
 Met Gly Val Cys Tyr Gly Met Pro Ser Asp Leu Arg Thr Glu Leu Ser
 100 105 110
 [0018] Lys Arg Ile Ala Pro Cys Tyr Gln Asp Tyr Val Arg Lys Phe Gly Glu
 115 120 125
 Asn Phe Ala Ser Cys Gln Ala Gly Ile Ser Ser Phe Tyr Thr Glu Asp
 130 135 140
 Leu Ile Val Met Gly Ala Pro Gly Ser Ser Tyr Trp Thr Gly Ser Leu
 145 150 155 160
 Phe Val Tyr Asn Ile Thr Thr Asn Lys Tyr Lys Ala Phe Leu Asp Arg
 165 170 175
 Gln Asn Gln Val Lys Phe Gly Ser Tyr Leu Gly Tyr Ser Val Gly Ala
 180 185 190
 Gly His Phe Arg Ser Pro His Thr Thr Glu Val Val Gly Gly Ala Pro
 195 200 205
 Gln His Glu Gln Ile Gly Lys Ala Tyr Ile Phe Ser Ile Glu Ala Lys
 210 215 220
 Glu Leu Ser Ile Leu His Glu Met Lys Gly Lys Lys Leu Gly Ser Tyr
 225 230 235 240
 Phe Gly Ala Ser Val Cys Ala Val Asp Leu Asn Ala Asp Gly Phe Ser
 245 250 255
 Asp Leu Leu Val Gly Ala Pro Met Gln Ser Thr Ile Arg Glu Glu Gly
 260 265 270
 Arg Val Phe Val Tyr Ile Asn Ser Gly Ser Gly Ala Val Met Asn Glu
 275 280 285
 Met Glu Thr Glu Leu Ile Gly Ser Asp Lys Tyr Ala Ala Arg Phe Gly

Ser Arg Met Asp Ile Ser Phe Leu Leu Asp Val Ser Ser Leu Ser Gln
 660 665 670
 Ala Glu Glu Asp Leu Ser Leu Thr Val His Ala Thr Cys Ala Asn Glu
 675 680 685
 Arg Glu Met Asp Asn Leu Asn Lys Val Thr Leu Ala Ile Pro Leu Lys
 690 695 700
 Tyr Glu Val Met Leu Ser Val His Gly Phe Val Asn Pro Thr Ser Phe
 705 710 715 720
 Ile Tyr Gly Pro Lys Glu Glu Asn Glu Pro Asp Thr Cys Met Ala Glu
 725 730 735
 Lys Met Asn Phe Thr Phe His Val Ile Asn Thr Gly His Ser Met Ala
 740 745 750
 Pro Asn Val Ser Val Glu Ile Met Val Pro Asn Ser Phe Ala Pro Gln
 755 760 765
 Thr Asp Lys Leu Phe Asn Ile Leu Asp Val Gln Pro Ala Gly Glu Cys
 770 775 780
 His Phe Lys Thr Tyr Gln Arg Lys Cys Ala Leu Glu Gln Glu Lys Gly
 785 790 795 800
 Ala Met Lys Ile Leu Lys Asp Ile Phe Thr Phe Leu Ser Lys Thr Asp
 805 810 815
 Lys Lys Leu Leu Phe Cys Met Lys Ala Asp Pro Tyr Cys Leu Thr Ile
 820 825 830
 [0020] Leu Cys His Leu Gly Lys Met Glu Ser Gly Lys Glu Ala Ser Val His
 835 840 845
 Ile Gln Leu Glu Gly Arg Pro Tyr Leu Ser Glu Met Asp Glu Thr Ser
 850 855 860
 Ala Leu Lys Phe Glu Val Arg Val Thr Ala Phe Pro Glu Pro Asn Pro
 865 870 875 880
 Lys Val Ile Glu Leu Asn Lys Asp Glu Asn Val Ala His Val Leu Leu
 885 890 895
 Glu Gly Leu His His Gln Arg Pro Lys Arg His Phe Thr
 900 905

 <210> 30
 <211> 1015
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 未鉴定的细菌物种
 <400> 30
 Val Ser Ala Ser Arg Pro Arg Pro Gly Ser Thr Pro Pro Pro Pro Pro
 1 5 10 15
 Trp Gln Val Tyr Pro Val Ala Glu Ala Trp Glu Gly Gly Ala Ser Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ser Gly Glu Gln Gly Pro Arg Ala Gly Gly Cys Gly Ala Pro

Gly Ser Asp Lys Tyr Ala Ala Arg Phe Gly Glu Ser Ile Val Asn Leu
 405 410 415
 Gly Asp Ile Asp Asn Asp Gly Phe Glu Asp Val Ala Val Gly Ala Pro
 420 425 430
 Gln Glu Asp Asp Leu Arg Gly Ala Val Tyr Ile Tyr Asn Gly Arg Ala
 435 440 445
 Asp Gly Ile Ser Thr Ala Phe Ser Gln Arg Ile Glu Gly Phe Gln Ile
 450 455 460
 Ser Lys Ser Leu Ser Met Phe Gly Gln Ser Ile Ser Gly Gln Ile Asp
 465 470 475 480
 Ala Asp Asn Asn Gly Tyr Val Asp Val Ala Val Gly Ala Phe Arg Ser
 485 490 495
 Asp Ser Ala Val Leu Leu Arg Thr Arg Pro Val Val Ile Val Glu Val
 500 505 510
 Ser Leu Asn His Pro Glu Ser Val Asn Arg Thr Asn Phe Asp Cys Val
 515 520 525
 Glu Asn Gly Leu Pro Ser Val Cys Met Asp Leu Thr Leu Cys Phe Ser
 530 535 540
 Tyr Lys Gly Lys Glu Val Pro Gly Tyr Ile Val Leu Leu Tyr Asn Met
 545 550 555 560
 Ser Leu Asp Val Asn Arg Lys Ile Asp Ser Pro Ser Arg Phe Tyr Phe
 565 570 575
 [0022] Ser Ser Asn Gly Thr Ser Asp Val Ile Thr Gly Ser Met Lys Val Ser
 580 585 590
 Ser Lys Val Pro Asn Cys Arg Thr His Gln Ala Phe Met Arg Lys Asp
 595 600 605
 Val Arg Asp Ile Leu Thr Pro Ile Gln Ile Glu Ala Ala Tyr Arg Leu
 610 615 620
 Gly Gln His Val Ile Arg Lys Arg Ser Thr Glu Glu Phe Pro Pro Leu
 625 630 635 640
 Gln Pro Ile Leu Gln Gln Lys Lys Glu Arg Asp Ile Ile Glu Lys Thr
 645 650 655
 Ile Asn Phe Ala Arg Phe Cys Ala His Glu Asn Cys Ser Ala Asp Leu
 660 665 670
 Gln Val Ser Ala Arg Ile Gly Phe Leu Lys Pro His Glu Asn Lys Thr
 675 680 685
 Tyr Val Ala Val Gly Ser Met Lys Thr Val Met Leu Asn Val Ser Leu
 690 695 700
 Phe Asn Ala Gly Asp Asp Ala Tyr Glu Thr Ala Leu His Ile Arg Leu
 705 710 715 720
 Pro Ser Gly Leu Tyr Phe Ile Lys Ile Leu Asp Leu Glu Glu Lys Gln
 725 730 735
 Ile Asn Cys Glu Val Thr Asp Ser Ser Gly Ser Val Lys Leu Asp Cys
 740 745 750
 Ser Ile Gly Tyr Ile Tyr Met Asp Arg Leu Ser Arg Met Asp Ile Ser

Arg Glu Cys Ile Leu Ser His Pro Ser Cys Ala Trp Cys Lys Gln Leu
 35 40 45
 Phe Trp Gly Leu Gly Ile Arg Asp Gln Asp Ala Ser Pro Phe Gly Ser
 50 55 60
 Trp Gly Gly Pro Ser Pro Trp Pro Ala His Arg Cys Arg Pro Ala Leu
 65 70 75 80
 Trp Cys Leu Phe Cys Asp Pro Pro Pro Pro Pro Ala Ser Ala Pro
 85 90 95
 Arg Leu Ser Pro Gly Pro Ser Arg Arg Cys Thr Leu Asp Pro Leu Leu
 100 105 110
 Cys Arg Arg Leu His Arg Ala Pro Cys Ala Leu Cys Pro Ala Pro Cys
 115 120 125
 Thr Leu His Pro Ala Leu Arg Leu Gly Thr Pro Cys Ala Thr Ser Thr
 130 135 140
 Trp Pro Ala Arg Pro Leu Ala Gln Pro Ser Pro Cys Pro Leu Pro Gly
 145 150 155 160
 Phe Gly Ser Phe Val Asp Lys Thr Val Leu Pro Phe Val Ser Thr Val
 165 170 175
 Pro Ala Lys Leu Arg His Pro Cys Pro Thr Arg Leu Glu Arg Cys Gln
 180 185 190
 Pro Pro Phe Ser Phe Arg His Val Leu Ser Leu Thr Gly Asp Ala Thr
 195 200 205
 [0024] Ala Phe Glu Arg Glu Val Gly Arg Gln Ser Val Ser Gly Asn Leu Asp
 210 215 220
 Ser Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Leu Gln Ala Ala Leu Cys Gln
 225 230 235 240
 Glu Lys Ile Gly Trp Arg Asn Val Ser Arg Leu Leu Val Phe Thr Ser
 245 250 255
 Asp Asp Thr Phe His Thr Ala Gly Asp Gly Lys Leu Gly Gly Ile Phe
 260 265 270
 Met Pro Ser Asp Gly His Cys His Leu Asp Ser Asn Gly Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Ser Pro Glu Phe Asp Tyr Pro Ser Val Gly Gln Val Ala Gln Ala
 290 295 300
 Leu Ser Thr Ala Asn Ile Gln Pro Ile Phe Ala Val Thr Ser Ala Thr
 305 310 315 320
 Leu Pro Val Tyr Gln Glu Leu Ser Lys Leu Ile Pro Lys Ser Ala Val
 325 330 335
 Gly Glu Leu Ser Glu Asp Ser Ser Asn Val Val Gln Leu Ile Met Asp
 340 345 350
 Ala Tyr Asn Ser Leu Ser Ser Thr Val Thr Leu Glu His Ser Ala Leu
 355 360 365
 Pro Pro Gly Val His Ile Ser Tyr Glu Ser Leu Cys Gly Asp Pro Glu
 370 375 380
 Lys Arg Glu Ala Glu Ala Gly Asp Arg Gly Gln Cys Ser His Val Pro

580 585 590
 Gln Cys Arg Asp Gly Tyr Phe Gly Ala Leu Cys Glu Gln Cys Ser Gly
 595 600 605
 Cys Lys Thr Ser Cys Glu Arg His Arg Asp Cys Ala Glu Cys Gly Ala
 610 615 620
 Phe Gly Thr Gly Pro Leu Ala Thr Asn Cys Ser Val Ala Cys Ala His
 625 630 635 640
 Tyr Asn Val Thr Leu Ala Leu Val Pro Val Leu Asp Asp Gly Trp Cys
 645 650 655
 Lys Glu Arg Thr Leu Asp Asn Gln Leu Leu Phe Phe Leu Val Glu Glu
 660 665 670
 Glu Ala Gly Gly Met Val Val Leu Thr Val Arg Pro Gln Glu Arg Gly
 675 680 685
 Ala Asp His
 690

<210> 33
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> TAG
 <400> 33

[0027]

Met Gly Ser Ser His His His His His His Gly Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15
 Arg Gly Ser Ala Ser Met Ser Asp Ser Glu Val Asn Gln Glu Ala Lys
 20 25 30
 Pro Glu Val Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Thr His Ile Asn Leu Lys
 35 40 45
 Val Ser Asp Gly Ser Ser Glu Ile Phe Phe Lys Ile Lys Lys Thr Thr
 50 55 60
 Pro Leu Arg Arg Leu Met Glu Ala Phe Ala Lys Arg Gln Gly Lys Glu
 65 70 75 80
 Met Asp Ser Leu Arg Phe Leu Tyr Asp Gly Ile Arg Ile Gln Ala Asp
 85 90 95
 Gln Thr Pro Glu Asp Leu Asp Met Glu Asp Asn Asp Ile Ile Glu Ala
 100 105 110
 His Arg Glu Gln Ile Gly Gly
 115

<210> 34
 <211> 602
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

<223> 鞭毛蛋白
 <400> 34
 Met Gly Ser Ser His His His His His His Gly Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15
 Arg Gly Ser Ala Ser Met Ser Asp Ser Glu Val Asn Gln Glu Ala Lys
 20 25 30
 Pro Glu Val Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Thr His Ile Asn Leu Lys
 35 40 45
 Val Ser Asp Gly Ser Ser Glu Ile Phe Phe Lys Ile Lys Lys Thr Thr
 50 55 60
 Pro Leu Arg Arg Leu Met Glu Ala Phe Ala Lys Arg Gln Gly Lys Glu
 65 70 75 80
 Met Asp Ser Leu Arg Phe Leu Tyr Asp Gly Ile Arg Ile Gln Ala Asp
 85 90 95
 Gln Thr Pro Glu Asp Leu Asp Met Glu Asp Asn Asp Ile Ile Glu Ala
 100 105 110
 His Arg Glu Gln Ile Gly Gly Ala Leu Thr Val Asn Thr Asn Ile Ala
 115 120 125
 Ser Val Thr Thr Gln Val Asn Leu Asn Lys Ala Ser Thr Ala Gln Thr
 130 135 140
 Thr Ser Met Gln Arg Leu Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys
 145 150 155 160
 [0028] Asp Asp Ala Ala Gly Leu Gln Ile Ala Asn Arg Leu Thr Ser Gln Ile
 165 170 175
 Asn Gly Leu Gly Gln Ala Val Lys Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile
 180 185 190
 Ala Gln Thr Ala Glu Gly Ala Met Gln Ala Ser Thr Asp Ile Leu Gln
 195 200 205
 Lys Met Arg Thr Leu Ala Leu Ser Ser Ala Thr Gly Ser Leu Ser Pro
 210 215 220
 Asp Asp Arg Lys Ser Asn Asn Asp Glu Tyr Gln Ala Leu Thr Ala Glu
 225 230 235 240
 Leu Asn Arg Ile Ser Ala Thr Thr Thr Phe Gly Gly Gln Lys Leu Leu
 245 250 255
 Asp Gly Ser Tyr Gly Thr Lys Ala Ile Gln Val Gly Ala Asn Ala Asn
 260 265 270
 Glu Thr Ile Asn Leu Thr Leu Asp Asn Val Ser Ala Lys Ser Ile Gly
 275 280 285
 Ser Gln Gln Leu Lys Thr Gly Asn Ile Ser Ile Ser Lys Asp Gly Leu
 290 295 300
 Ala Ala Gly Glu Leu Ala Val Thr Gly Asn Gly Gln Thr Lys Thr Val
 305 310 315 320
 Asn Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Lys Asp Val Ala Ala Gln Leu Asn
 325 330 335
 Gly Ala Ile Gly Gly Leu Thr Ala Thr Ala Ser Thr Glu Val Lys Leu

	340	345	350
	Asp Ala Ser Gly Ala Thr Ala Ala Ala Pro Ala Asn Phe Asp Leu Thr		
	355	360	365
	Val Gly Gly Ser Thr Val Ser Phe Val Gly Val Thr Asp Asn Ala Ser		
	370	375	380
	Leu Ala Asp Gln Leu Lys Ser Asn Ala Ala Lys Leu Gly Ile Ser Val		
	385	390	395
	Asn Tyr Asp Glu Ser Thr Lys Asn Leu Glu Ile Lys Ser Asp Thr Gly		
	405	410	415
	Glu Asn Ile Thr Phe Ala Pro Lys Ala Gly Ala Pro Gly Val Lys Ile		
	420	425	430
	Ala Ala Lys Asn Gly Ser Gly Thr Tyr Gly Ala Ala Val Pro Leu Asn		
	435	440	445
	Ala Ala Ala Gly Asp Lys Ser Val Val Thr Gly Gln Ile Ser Leu Asp		
	450	455	460
	Ser Ala Lys Gly Tyr Ser Ile Ala Asp Gly Ala Gly Ala Asn Gly Ala		
	465	470	475
	Gly Ser Thr Ala Ala Leu Tyr Gly Thr Gly Val Thr Ser Val Ser Ser		
	485	490	495
	Lys Lys Thr Asn Val Ser Asp Thr Asp Val Thr Ser Ala Thr Asn Ala		
	500	505	510
[0029]	Gln Asn Ala Val Ala Val Ile Asp Lys Ala Ile Gly Ser Ile Asp Ser		
	515	520	525
	Val Arg Ser Gly Leu Gly Ala Thr Gln Asn Arg Leu Thr Thr Thr Val		
	530	535	540
	Asp Asn Leu Gln Asn Ile Gln Lys Asn Ser Thr Ala Ala Arg Ser Thr		
	545	550	555
	Val Gln Asp Val Asp Phe Ala Ser Glu Thr Ala Glu Leu Thr Lys Gln		
	565	570	575
	Gln Thr Leu Gln Gln Ala Ser Thr Ala Ile Leu Ser Gln Ala Asn Gln		
	580	585	590
	Leu Pro Ser Ser Val Leu Lys Leu Leu Gln		
	595	600	
<210>	35		
<211>	474		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	OMPC		
<400>	35		
Met Gly Ser Ser His His His His His His Gly Ser Gly Leu Val Pro			
1	5	10	15
Arg Gly Ser Ala Ser Met Ser Asp Ser Glu Val Asn Gln Glu Ala Lys			
	20	25	30

Pro Glu Val Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Thr His Ile Asn Leu Lys
 35 40 45
 Val Ser Asp Gly Ser Ser Glu Ile Phe Phe Lys Ile Lys Lys Thr Thr
 50 55 60
 Pro Leu Arg Arg Leu Met Glu Ala Phe Ala Lys Arg Gln Gly Lys Glu
 65 70 75 80
 Met Asp Ser Leu Arg Phe Leu Tyr Asp Gly Ile Arg Ile Gln Ala Asp
 85 90 95
 Gln Thr Pro Glu Asp Leu Asp Met Glu Asp Asn Asp Ile Ile Glu Ala
 100 105 110
 His Arg Glu Gln Ile Gly Gly Ala Glu Val Tyr Asn Lys Asp Gly Asn
 115 120 125
 Lys Leu Asp Leu Tyr Gly Lys Val Asp Gly Leu His Tyr Phe Ser Asp
 130 135 140
 Asn Lys Ser Glu Asp Gly Asp Gln Thr Tyr Val Arg Leu Gly Phe Lys
 145 150 155 160
 Gly Glu Thr Gln Val Thr Asp Gln Leu Thr Gly Tyr Gly Gln Trp Glu
 165 170 175
 Tyr Gln Ile Gln Gly Asn Thr Ser Glu Asp Asn Lys Glu Asn Ser Trp
 180 185 190
 Thr Arg Val Ala Phe Ala Gly Leu Lys Phe Gln Asp Val Gly Ser Phe
 195 200 205
 [0030] Asp Tyr Gly Arg Asn Tyr Gly Val Val Tyr Asp Val Thr Ser Trp Thr
 210 215 220
 Asp Val Leu Pro Glu Phe Gly Gly Asp Thr Tyr Gly Ser Asp Asn Phe
 225 230 235 240
 Met Gln Gln Arg Gly Asn Gly Phe Ala Thr Tyr Arg Asn Thr Asp Phe
 245 250 255
 Phe Gly Leu Val Asp Gly Leu Asn Phe Ala Val Gln Tyr Gln Gly Lys
 260 265 270
 Asn Gly Ser Val Ser Gly Glu Gly Met Thr Asn Asn Gly Arg Gly Ala
 275 280 285
 Leu Arg Gln Asn Gly Asp Gly Val Gly Gly Ser Ile Thr Tyr Asp Tyr
 290 295 300
 Glu Gly Phe Gly Ile Gly Ala Ala Val Ser Ser Ser Lys Arg Thr Asp
 305 310 315 320
 Asp Gln Asn Gly Ser Tyr Thr Ser Asn Gly Val Val Arg Asn Tyr Ile
 325 330 335
 Gly Thr Gly Asp Arg Ala Glu Thr Tyr Thr Gly Gly Leu Lys Tyr Asp
 340 345 350
 Ala Asn Asn Ile Tyr Leu Ala Ala Gln Tyr Thr Gln Thr Tyr Asn Ala
 355 360 365
 Thr Arg Val Gly Ser Leu Gly Trp Ala Asn Lys Ala Gln Asn Phe Glu
 370 375 380
 Ala Val Ala Gln Tyr Gln Phe Asp Phe Gly Leu Arg Pro Ser Leu Ala

专利名称(译)	在伴侣动物中检测炎症标志物和治疗炎性病症的方法		
公开(公告)号	CN108780088A	公开(公告)日	2018-11-09
申请号	CN201680078281.X	申请日	2016-11-04
[标]发明人	G·汉森		
发明人	J·埃斯特鲁奇 G·汉森		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/58 G01N33/563 G01N33/564 G01N33/569		
CPC分类号	C07K16/12 C07K16/18 C07K16/2839 C07K16/28 G01N33/5005 G01N33/564 G01N2333/195 G01N2333/4727 G01N2333/4737 G01N2333/70546 G01N2333/79 G01N2800/24 A23K50/40 G01N33 /56911 G01N33/6854 G01N33/6893 G01N2800/06		
优先权	62/252266 2015-11-06 US 62/373307 2016-08-10 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了准确检测和测量来自伴侣动物的生物样品中针对特定抗原的内源性抗体(例如内源性IgA)的水平的方法和系统,其可用于诊断伴侣动物例如狗或猫的炎性疾病,包括肠病(IBD)。这类方法和系统通过使用非侵入性手段鉴定来自患者的样品是否与炎性疾病相关,从而方便地提供对指导治疗决定有用的信息。

钙卫蛋白的来源	描述	疾病狗 均值 ± SEM (EU)	对照狗 均值 ± SEM (EU)	p 值
SEQ ID NO:19	异嵌合肽 S100A8/S100A9 的 二聚体	45.45 ± 12.71	3.849 ± 0.488	<0.0001