

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-517967

(P2020-517967A)

(43) 公表日 令和2年6月18日(2020.6.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 0 1 A	4 C 0 8 4
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 U	
<b>A 6 1 K 38/57 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 4 1 B	
<b>A 6 1 P 1/00 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 74 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-558662 (P2019-558662)  
 (86) (22) 出願日 平成30年4月25日 (2018. 4. 25)  
 (85) 翻訳文提出日 令和1年11月6日 (2019. 11. 6)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/029436  
 (87) 国際公開番号 W02018/200722  
 (87) 国際公開日 平成30年11月1日 (2018. 11. 1)  
 (31) 優先権主張番号 62/490, 003  
 (32) 優先日 平成29年4月25日 (2017. 4. 25)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 62/614, 333  
 (32) 優先日 平成30年1月5日 (2018. 1. 5)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(71) 出願人 519379190  
 プロテラ バイオロジックス、インコーポ  
 レーテッド  
 アメリカ合衆国 02903 ロードアイ  
 ランド州、プロビデンス、エディ ストリ  
 ート 349  
 (74) 代理人 110002572  
 特許業務法人平木国際特許事務所  
 (72) 発明者 リム、ヨウーピン  
 アメリカ合衆国 02903 ロードアイ  
 ランド州、プロビデンス、エディ ストリ  
 ート 349

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インターα阻害剤タンパク質を定量化する方法

(57) 【要約】

I A I P リガンドベースのアッセイを用いて、サンプル（例えば、対象由来の）中の I A I P レベルを定量化する方法を本明細書に記載する。I A I P - I A I P リガンド複合体の測定方法、並びに前述の I A I P 定量化方法を用いた対象の評価、監視及び処置方法も開示する。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

対象由来のサンプル中のインター 阻害剤タンパク質 ( I A I P ) を定量化する方法であって：

a ) 前記サンプルを結合剤と接触させて I A I P - 結合剤複合体を生成することであって、前記結合剤は支持体に結合される、生成することと；

b ) 前記 I A I P - 結合剤複合体を検出剤と接触させることと；

c ) 前記 I A I P - 結合剤複合体に結合した前記検出剤の量を検出して、前記サンプル中の I A I P を定量化することと、を含む、方法。

**【請求項 2】**

前記 I A I P がインタクト I A I P である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記結合剤が、 I A I P に結合する I A I P リガンドである、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記結合剤が、 I A I P に特異的に結合する抗体である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記検出剤が I A I P リガンドを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記検出剤が更に、前記 I A I P リガンド検出剤に結合する抗体を含む、請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記検出剤が、 I A I P に特異的に結合する抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記 I A I P が I A I P - I A I P リガンド複合体である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記結合剤が、 I A I P に結合する I A I P リガンドである、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記 I A I P - I A I P リガンド複合体の前記 I A I P リガンドが前記結合剤とは異なる、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記結合剤が、前記 I A I P - I A I P リガンド複合体の前記 I A I P リガンドに結合する抗体である、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記結合剤が、前記 I A I P - I A I P リガンド複合体の I A I P に特異的に結合する抗体である、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記検出剤が、 I A I P に結合する I A I P リガンドを含む、請求項 8 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記検出剤が、更に、前記 I A I P リガンド検出剤に結合する抗体を含む、請求項 13 に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記 I A I P - I A I P リガンド複合体の前記 I A I P リガンドが、前記 I A I P リガンド検出剤とは異なる、請求項 13 又は 14 に記載の方法。

**【請求項 16】**

前記検出剤が、前記 I A I P - I A I P リガンド複合体の前記 I A I P リガンドに結合する抗体である、請求項 8 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 17】

前記検出剤が、前記 I A I P - I A I P リガンド複合体の I A I P に特異的に結合する抗体である、請求項 8 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 4、6、7、11、12、14、16、及び 17 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 19】

前記抗体が M A b 69.26 又は M A b 69.31 である、請求項 4、7、12、及び 17 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 20】

前記 I A I P リガンドが、エンドキシリン ( L P S )、ヘパリン、ヒストン、ヒアルロン酸、ビトロネクチン、フィブロネクチン、ラミニン、テネイシン C、アグリカン、フォン・ヴィルブランド因子、ペントラキシン - 3 ( P T X 3 )、T N F - 刺激遺伝子 - 6 ( T S G - 6 )、因子 I X、補体成分、因子 X I I I a、及び組織トランスグルタミナーゼからなる群から選択される、請求項 3、5、6、及び 8 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

10

## 【請求項 21】

前記補体成分が、C 1 q、C 2、C 3、C 4、C 5、C 6、C 8、プロパージン、又は因子 D である、請求項 28 に記載の方法。

## 【請求項 22】

前記検出剤が標識を含む、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 23】

前記標識が、ビオチン、酵素、酵素基質、放射標識、発光化合物、コロイド金、粒子、又は蛍光染料である、請求項 22 に記載の方法。

## 【請求項 24】

前記支持体が、プレート、粒子、ナノ粒子、樹脂、膜、バイオチップ、容器、試験片、又はビーズである、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 25】

前記方法が更に、ステップ b ) と c ) の間に洗浄ステップを含む、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 26】

前記方法が更に、ステップ b ) と c ) の間に洗浄ステップを含む、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 27】

前記方法が更に、ステップ a ) 又はステップ b ) に先立ってブロッキングステップを含む、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 28】

ステップ a ) 及び / 又は b ) の前記接触させるステップが、p H 約 7 . 0 ~ 約 3 . 5 で行われる、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 29】

前記 p H が約 5 . 0 ~ 約 3 . 5 である、請求項 28 に記載の方法。

40

## 【請求項 30】

前記 p H が約 4 . 0 である、請求項 29 に記載の方法。

## 【請求項 31】

前記サンプルが流体である、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 32】

前記流体が、血液、血漿、血清、尿、脳脊髄液、滑液、羊水、間質液、卵胞液、腹水、気管支肺胞洗浄液、母乳、痰、リンパ液、胆汁、又は組織ホモジネートである、請求項 31 に記載の方法。

## 【請求項 33】

50

前記対象がヒト対象である、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記対象が、炎症性疾患若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を有すると特定されている、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記対象が、炎症性疾患若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を有すると特定されていない、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記方法が、前記対象が炎症性疾患若しくは状態又は感染症を有し又はその危険性を有するとして診断される前、診断された後、又は診断と同時に行われる、請求項 3 3 に記載の方法。

10

【請求項 3 7】

前記方法が、前記対象の炎症性疾患若しくは状態又は感染症の処置と実質的に同時に行われる、請求項 3 3 又は 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記方法が、前記対象の炎症性疾患若しくは状態又は感染症の処置に先立って行われる、請求項 3 3 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記方法が、前記対象の炎症性疾患若しくは状態又は感染症の処置の後に行われる、請求項 3 3 又は 3 4 に記載の方法。

20

【請求項 4 0】

前記炎症性疾患又は状態が、敗血症、敗血性ショック、無菌敗血症、外傷、傷害、卒中、急性炎症性疾患、SIRS、急性肺傷害、ARDS、肺炎、壊死性腸炎、急性膵炎、腎疾患、急性腎臓傷害、肝臓傷害、急性循環不全、子癇前症、癌、癌転移、腫瘍浸潤、末梢血管疾患、1型又は2型糖尿病、アテローム硬化性心血管系疾患、間欠性跛行、重症虚血肢疾患、心筋梗塞、頸動脈閉塞、臍帯閉塞、低出生体重、早産、手術誘導炎症、腫瘍誘導炎症、多発性硬化症、肺動脈弁閉鎖不全、末梢神経障害、低酸素性虚血、細菌感染症、創傷、やけど、断裂、挫傷、骨折、外科手技、組織虚血、関節リウマチ、髄膜炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患、鼻炎、早期分娩、又は感染性疾患からなる群から選択される、請求項 3 4 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 4 1】

前記感染症が、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 及び髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) を含むナイセリア (*Neisseria*) 種、ブランハメラ・カタラーリス (*Branhamella catarrhalis*) を含むブランハメラ (*Branhamella*) 種、大腸菌 (*Escherichia coli*) を含むエスケリキア (*Escherichia*) 種、エンテロバクター (*Enterobacter*) 種、プロテウス・ミラビリス (*Proteus mirabilis*) を含むプロテウス (*Proteus*) 種、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、鼻疽菌 (*Pseudomonas mallei*) 及び類鼻疽菌 (*Pseudomonas pseudomallei*) を含むシュードモナス (*Pseudomonas*) 種、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) を含むクレブシエラ (*Klebsiella*) 種、サルモネラ (*Salmonella*) 種、赤痢菌 (*Shigella*) 種、セラチア (*Serratia*) 種、アシネトバクター (*Acinetobacter*) 種；インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) 及び軟性下疳菌 (*Haemophilus ducreyi*) を含むヘモフィルス (*Haemophilus*) 種、ブルセラ (*Bruceella*) 種、エルシニア・ペスチス (*Yersinia pestis*) 及びエルシニア・エンテロコリチカ (*Yersinia enterocolitica*) を含むエルシニア (*Yersinia*) 種、野兔病菌 (*Francisella tularensis*) を含むフランシセラ (*Francisella*) 種、パスツレラ・マルトシダ (*Pasteurella*

40

50

multocida)を含むパスツレラ(Pasteurella)種、コレラ菌(Vibrio cholerae)、フラボバクテリウム(Flavobacterium)種、メニンゴセプチカム(meningosepticum)、カンピロバクター・ジエジュニ(Campylobacter jejuni)を含むカンピロバクター(Campylobacter)種、バクテロイデス・フラジリス(Bacteroides fragilis)を含むバクテロイデス(Bacteroides)種(口腔、咽頭の)、フソバクテリウム・ヌクレアタム(Fusobacterium nucleatum)を含むフソバクテリウム(Fusobacterium)種、肉芽腫カリマトバクテリウム(Calymmatobacterium granulomatis)、ストレプトパチルス・モニリホルミス(Streptobacillus moniliformis)を含むストレプトパチルス(Streptobacillus)属、及び在郷軍人病菌(Legionella pneumophila)を含むレジオネラ(Legionella)種等のグラム陰性菌を原因とする、請求項34~39のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項42】

前記対象が、新生児、小児、青少年、又は成人である、請求項1~41のいずれか一項に記載の方法。

【請求項43】

前記方法が、1年毎に1回以上行われる、請求項1~42のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項44】

前記方法が、1カ月毎に1回以上行われる、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

前記方法が、1週間毎に1回以上行われる、請求項44に記載の方法。

【請求項46】

前記方法が、1日毎に1回以上行われる、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記方法が、1時間毎に1回以上行われる、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

前記方法が、少なくとも1回、少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも5回、又は少なくとも10回行われる、請求項1~47のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項49】

前記方法が、更に、IAIP又は治療薬を含む処置を前記対象に投与することを含む、請求項1~48のいずれか一項に記載の方法。

【請求項50】

前記対象が、200 µg/mL以下のIAIP濃度を有する、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

前記対象由来の前記サンプルが、参照サンプルと比較して、IAIP-IAIPリガンド複合体の高いレベルを有する、請求項49に記載の方法。

40

【請求項52】

前記対象が、炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を有する、請求項49~51のいずれか一項に記載の方法。

【請求項53】

前記方法が、IAIP及び治療薬を前記対象に投与することを含む、請求項49~52のいずれか一項に記載の方法。

【請求項54】

前記治療薬が、抗生剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗寄生虫薬、抗炎症剤、抗癌剤、抗凝固剤、免疫調節剤、気管支拡張剤、補体阻害剤、昇圧剤、鎮静剤、又は人工呼吸からなる群から選択される、請求項49~53のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【請求項 5 5】

前記対象が、少なくとも 1 日間病気である、請求項 1 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5 6】

前記対象が、少なくとも 1 週間病気である、請求項 5 5 に記載の方法。

## 【請求項 5 7】

前記対象が、少なくとも 1 か月病気である、請求項 5 6 に記載の方法。

## 【請求項 5 8】

前記対象が、少なくとも 1 年間病気である、請求項 5 7 に記載の方法。

## 【請求項 5 9】

前記方法が：

a) 前記対象の前記健康状態を評価し；

b) 前記対象の前記健康状態を監視し；

c) 炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有し又はその危険性を有するとして前記対象を診断し；

d) 前記対象に投与された処置の有効性を評価し；又は

e) 前記対象における疾病の重症度を評価する

ためのものである、請求項 1 ~ 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 6 0】

前記方法が、更に、前記サンプルに検出される I A I P 及び / 又は I A I P - I A I P リガンド複合体の前記量を、正常な対象由来のサンプル中に見出される I A I P 及び / 又は I A I P - I A I P リガンド複合体の前記量又はカットオフ値と比較することを含む、請求項 5 9 に記載の方法。

## 【請求項 6 1】

前記正常な対象由来の前記サンプル中の I A I P の量よりも、又は前記カットオフ値に対して、低い前記サンプル中の I A I P の量は、前記対象が炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を有することを示す、請求項 6 0 に記載の方法。

## 【請求項 6 2】

前記正常な対象由来の前記サンプル中の I A I P - I A I P リガンド複合体の量よりも、又は前記カットオフ値に対して、高い前記サンプル中の I A I P - I A I P リガンド複合体の量は、前記対象が炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を有することを示す、請求項 6 0 に記載の方法。

## 【請求項 6 3】

前記正常な対象由来の前記サンプル中の I A I P の前記量、又は前記カットオフ値が、 $> 250 \mu\text{g} / \text{mL}$  である、請求項 6 0 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 6 4】

前記正常な対象由来の前記サンプル中の I A I P の前記量が、約  $260 \sim 540 \mu\text{g} / \text{mL}$  である、請求項 6 3 に記載の方法。

## 【請求項 6 5】

前記対象が  $250 \mu\text{g} / \text{mL}$  以下の I A I P 濃度を有するという決定は、前記対象が炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有し又は発症する高い危険性を有し、又は病的状態及び / 若しくは死亡の高い危険性を有すると診断されることを示す、請求項 1 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 6 6】

前記対象が、 $200 \sim 300 \mu\text{g} / \text{mL}$  の I A I P 濃度を有し、前記方法が、少なくとも年に 1 回行われる、請求項 6 0 ~ 6 5 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 6 7】

前記方法が、少なくとも年に 2 回行われる、請求項 6 6 に記載の方法。

## 【請求項 6 8】

前記方法が、少なくとも月に 1 回行われる、請求項 6 6 に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 69】  
前記方法が、少なくとも週に 1 回行われる、請求項 66 に記載の方法。
- 【請求項 70】  
前記方法が、少なくとも 1 日 1 回行われる、請求項 66 に記載の方法。
- 【請求項 71】  
前記方法が、少なくとも 1 時間に 1 回行われる、請求項 66 に記載の方法。
- 【請求項 72】  
前記対象が、炎症性疾病若しくは状態又は感染症を以前に有していた、請求項 1 ~ 71 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 73】 10  
前記方法が、前記処置に先立って、及び前記処置の過程に 1 回以上行われる、請求項 49 ~ 54 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 74】  
前記方法が、前記処置の開始後、及び / 又は前記処置の終局後に行われる、請求項 49 ~ 73 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 75】 20  
前記処置が、前記対象における I A I P の前記濃度が、前記対象における I A I P の以前の測定値と比較して増大している場合、及び / 又は前記対象における I A I P - I A I P リガンド複合体の前記濃度が、前記対象における I A I P - I A I P リガンド複合体の以前の測定値と比較して低下している場合、有効であると決定される、請求項 49 ~ 74 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 76】  
前記処置が、I A I P の前記濃度が、前記対象における I A I P の以前の測定値と比較して、前記対象において低下し又は一定のままである場合、及び / 又は I A I P - I A I P リガンド複合体の前記濃度が、前記対象における I A I P - I A I P リガンド複合体の以前の測定値と比較して、前記対象において増加し又は一定のままである場合、無効であると決定される、請求項 49 ~ 74 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 77】 30  
前記方法が、更に、前記処置を修正又は変更することを含む、請求項 76 に記載の方法。
- 【請求項 78】  
炎症性疾病又は感染症を有し又は発症する危険性を有する対象の処置方法であって、前記対象が、請求項 1 ~ 77 のいずれか一項に記載の方法に従って、処置が必要であると決定されており、前記方法が、前記対象治療的有効量の I A I P 及び / 又は抗生剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗寄生虫薬、抗炎症剤、抗癌剤、抗凝固剤、免疫調節剤、気管支拡張剤、補体阻害剤、昇圧剤、鎮静剤、若しくは人工呼吸からなる群から選択される治療薬を投与することを含む、方法。
- 【請求項 79】 40  
前記炎症性疾病又は状態が、敗血症、敗血性ショック、無菌敗血症、外傷、傷害、卒中、急性炎症性疾病、S I R S、急性肺傷害、A R D S、肺炎、壊死性腸炎、急性膵炎、腎臓病、急性腎臓傷害、肝臓傷害、急性循環不全、手術誘導炎症、腫瘍誘導炎症、多発性硬化症、子癇前症、癌、癌転移、腫瘍浸潤、末梢血管疾病、1 型又は 2 型糖尿病、アテローム硬化性心血管系疾病、間欠性跛行、重症虚血肢疾病、心筋梗塞、頸動脈閉塞、臍帯閉塞、低出生体重、早産、肺動脈弁閉鎖不全、末梢神経障害、低酸素性虚血、細菌感染症、創傷、やけど、断裂、挫傷、骨折、外科手技、組織虚血、関節リウマチ、髄膜炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患、鼻炎、早期分娩、又は感染性疾患からなる群から選択される、請求項 78 に記載の方法。
- 【請求項 80】 50  
前記感染症が、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 及び髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) を含むナイセリア (*Neisseri*

a) 種、ブランハメラ・カタラーリス (*Branhamella catarrhalis*) を含むブランハメラ (*Branhamella*) 種、大腸菌 (*Escherichia coli*) を含むエスケリキア (*Escherichia*) 種、エンテロバクター (*Enterobacter*) 種、プロテウス・ミラビリス (*Proteus mirabilis*) を含むプロテウス (*Proteus*) 種、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、鼻疽菌 (*Pseudomonas mallei*) 及び類鼻疽菌 (*Pseudomonas pseudomallei*) を含むシュードモナス (*Pseudomonas*) 種、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) を含むクレブシエラ (*Klebsiella*) 種、サルモネラ (*Salmonella*) 種、赤痢菌 (*Shigella*) 種、セラチア (*Serratia*) 種、アシネトバクター (*Acinetobacter*) 種; インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) 及び軟性下疳菌 (*Haemophilus ducreyi*) を含むヘモフィルス (*Haemophilus*) 種、ブルセラ (*Bruceella*) 種、エルシニア・ペスチス (*Yersinia pestis*) 及びエルシニア・エンテロコリチカ (*Yersinia enterocolitica*) を含むエルシニア (*Yersinia*) 種、野兔病菌 (*Francisella tularensis*) を含むフランシセラ (*Francisella*) 種、パストレラ・マルトシダ (*Pasteurella multocida*) を含むパストレラ (*Pasteurella*) 種、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 種、メニンゴセプトチカム (*meningosepticum*)、カンピロバクター・ジエジュニ (*Campylobacter jejuni*) を含むカンピロバクター (*Campylobacter*) 種、バクテロイデス・フラジリス (*Bacteroides fragilis*) を含むバクテロイデス (*Bacteroides*) 種 (口腔、咽頭の)、フソバクテリウム・ヌクレアタム (*Fusobacterium nucleatum*) を含むフソバクテリウム (*Fusobacterium*) 種、肉芽腫カリマトバクテリウム (*Calymmatobacterium granulomatis*)、ストレプトパチルス・モニリホルミス (*Streptobacillus moniliformis*) を含むストレプトパチルス (*Streptobacillus*) 属、及び在郷軍人病菌 (*Legionella pneumophila*) を含むレジオネラ (*Legionella*) 種等のグラム陰性菌を原因とする、請求項 78 に記載の方法。

【請求項 81】

サンプル中の I A I P 又は I A I P - I A I P リガンド複合体を定量化するためのキットであって、前記キットは、I A I P 結合剤及び I A I P 検出剤、並びに場合により、以下の 1 つ以上：洗浄緩衝液、ブロッキング剤、標識検出のための基質、及びサンプル中の I A I P 又は I A I P - I A I P リガンド複合体のレベルを定量化するための説明書、を含む、キット。

【請求項 82】

前記結合剤が、支持体上に固定化される、請求項 81 に記載のキット。

【請求項 83】

前記検出剤が標識されている、請求項 81 又は 82 に記載のキット。

【請求項 84】

前記 I A I P 結合剤が、I A I P 特異的抗体又は I A I P リガンドである、請求項 81 ~ 83 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 85】

前記キットが更に I A I P リガンド結合剤を含む、請求項 81 ~ 84 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 86】

前記 I A I P リガンド結合剤が、I A I P リガンドに結合する抗体である、請求項 85 に記載のキット。

【請求項 87】

10

20

30

40

50

前記 I A I P 検出剤が I A I P 特異的抗体又は I A I P リガンドである、請求項 8 1 ~ 8 6 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 8 8】

前記キットが更に I A I P リガンド検出剤を含む、請求項 8 1 ~ 8 7 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 8 9】

前記 I A I P リガンド検出剤が、I A I P リガンドに特異的に結合する抗体である、請求項 8 8 に記載のキット。

【請求項 9 0】

前記 I A I P 特異的抗体がモノクローナル抗体である、請求項 8 4 又は 8 7 に記載のキット。 10

【請求項 9 1】

前記モノクローナル抗体が M A b 6 9 . 2 6 又は M A b 6 9 . 3 1 である、請求項 9 0 に記載のキット。

【請求項 9 2】

前記支持体が、プレート、樹脂、容器、膜、バイオチップ、粒子、ナノ粒子、試験片、又はビーズである、請求項 8 2 ~ 9 1 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 9 3】

前記標識が、酵素、酵素基質、ビオチン、粒子、蛍光染料、発光化合物、又は放射標識である、請求項 8 1 ~ 9 2 のいずれか一項に記載のキット。 20

【請求項 9 4】

前記 I A I P リガンドが、エンドキシリン ( L P S )、ヘパリン、ヒストン、ヒアルロン酸、ラミニン、テネイシン C、アグリカン、ピトロネクチン、フィブロネクチン、フォン・ヴィルブランド因子、ペントラキシン - 3 ( P T X 3 )、T N F - 刺激遺伝子 - 6 ( T S G - 6 )、因子 I X、補体成分、因子 X I I I a、及び組織トランスグルタミナーゼからなる群から選択される、請求項 8 4、8 6、8 7、8 8 及び 8 9 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 9 5】

前記結合剤が、I A I P に結合する I A I P リガンドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記結合剤が、I A I P に特異的に結合する抗体である、請求項 1 に記載の方法。 30

【請求項 9 7】

前記検出剤が I A I P リガンドを含む、請求項 1、9 5 又は 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記検出剤が、前記 I A I P リガンド検出剤に結合する抗体を更に含む、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記検出剤が、I A I P に特異的に結合する抗体である、請求項 1、9 5、又は 9 6 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記検出剤が、I A I P に結合する I A I P リガンドを含む、請求項 8 又は 1 1 に記載の方法。 40

【請求項 1 0 1】

前記検出剤が、前記 I A I P リガンド検出剤に結合する抗体を更に含む、請求項 1 0 0 に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

前記 I A I P - I A I P リガンド複合体の前記 I A I P リガンドが、前記 I A I P リガンド検出剤とは異なる、請求項 1 0 0 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

前記検出剤が、前記 I A I P - I A I P リガンド複合体の前記 I A I P リガンドに結合 50

する抗体である、請求項 8、9 又は 12 に記載の方法。

【請求項 104】

前記検出剤が、前記 I A I P - I A I P リガンド複合体の I A I P に特異的に結合する抗体である、請求項 8 又は 11 に記載の方法。

【請求項 105】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 106】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 97 に記載の方法。

【請求項 107】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 99 に記載の方法。

10

【請求項 108】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 101 に記載の方法。

【請求項 109】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 110】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 111】

前記抗体が M A b 69.26 又は M A b 69.31 である、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 112】

前記抗体が M A b 69.26 又は M A b 69.31 である、請求項 99 に記載の方法。

20

【請求項 113】

前記抗体が M A b 69.26 又は M A b 69.31 である、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 114】

前記 I A I P リガンドが、エンドキシリン ( L P S )、ヘパリン、ヒストン、ヒアルロン酸、ピトロネクチン、フィブロネクチン、ラミニン、テネイシン C、アグリカン、フォン・ヴィルブランド因子、ペントラキシン - 3 ( P T X 3 )、T N F - 刺激遺伝子 - 6 ( T S G - 6 )、因子 I X、補体成分、因子 X I I I a、及び組織トランスグルタミナーゼからなる群から選択される、請求項 95 に記載の方法。

30

【請求項 115】

前記 I A I P リガンドが、エンドキシリン ( L P S )、ヘパリン、ヒストン、ヒアルロン酸、ピトロネクチン、フィブロネクチン、ラミニン、テネイシン C、アグリカン、フォン・ヴィルブランド因子、ペントラキシン - 3 ( P T X 3 )、T N F - 刺激遺伝子 - 6 ( T S G - 6 )、因子 I X、補体成分、因子 X I I I a、及び組織トランスグルタミナーゼからなる群から選択される、請求項 97 に記載の方法。

【請求項 116】

前記 I A I P リガンドが、エンドキシリン ( L P S )、ヘパリン、ヒストン、ヒアルロン酸、ピトロネクチン、フィブロネクチン、ラミニン、テネイシン C、アグリカン、フォン・ヴィルブランド因子、ペントラキシン - 3 ( P T X 3 )、T N F - 刺激遺伝子 - 6 ( T S G - 6 )、因子 I X、補体成分、因子 X I I I a、及び組織トランスグルタミナーゼからなる群から選択される、請求項 100 に記載の方法。

40

【請求項 117】

前記 I A I P リガンドが、エンドキシリン ( L P S )、ヘパリン、ヒストン、ヒアルロン酸、ピトロネクチン、フィブロネクチン、ラミニン、テネイシン C、アグリカン、フォン・ヴィルブランド因子、ペントラキシン - 3 ( P T X 3 )、T N F - 刺激遺伝子 - 6 ( T S G - 6 )、因子 I X、補体成分、因子 X I I I a、及び組織トランスグルタミナーゼからなる群から選択される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 118】

50

前記補体成分が、C 1 q、C 2、C 3、C 4、C 5、C 6、C 8、プロパージン、又は因子 D である、請求項 1 1 4 ~ 1 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

前記検出剤が標識を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

前記標識が、ビオチン、酵素、酵素基質、放射標識、発光化合物、コロイド金、粒子、又は蛍光染料である、請求項 1 1 9 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

前記支持体が、プレート、粒子、ナノ粒子、樹脂、膜、バイオチップ、容器、試験片、又はビーズである、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 2 2】

前記方法が、更に、ステップ a ) と b ) の間に洗浄ステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

前記方法が、更に、ステップ b ) と c ) の間に洗浄ステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記方法が、更に、ステップ a ) 又はステップ b ) に先立ってブロッキングステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

ステップ a ) 及び / 又は b ) の前記接触させるステップが、p H 約 7 . 0 ~ 約 3 . 5 で行われる、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 1 2 6】

前記 p H が約 5 . 0 ~ 約 3 . 5 である、請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記 p H が約 4 . 0 である、請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

前記サンプルが流体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

前記流体が、血液、血漿、血清、尿、脳脊髄液、滑液、羊水、間質液、卵胞液、腹水、気管支肺胞洗浄液、母乳、痰、リンパ液、胆汁、又は組織ホモジネートである、請求項 1 2 8 に記載の方法。

30

【請求項 1 3 0】

前記対象がヒト対象である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

前記対象が、炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を有すると特定されている、請求項 1 3 0 に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

前記対象が、炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を有すると特定されていない、請求項 1 3 0 に記載の方法。

40

【請求項 1 3 3】

前記方法が、前記対象が炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有し又はその危険性を有するとして診断される前、診断された後、又は診断と同時に行われる、請求項 1 3 0 に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

前記方法が、前記対象の炎症性疾病若しくは状態又は感染症の処置と実質的に同時に行われる、請求項 1 3 0 に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

前記方法が、前記対象の炎症性疾病若しくは状態又は感染症の処置に先立って行われる、請求項 1 3 0 に記載の方法。

50

## 【請求項 136】

前記方法が、前記対象の炎症性疾病若しくは状態又は感染症の処置後に行われる、請求項 130 に記載の方法。

## 【請求項 137】

前記炎症性疾病又は状態が、敗血症、敗血性ショック、無菌敗血症、外傷、傷害、卒中、急性炎症性疾病、SIRS、急性肺傷害、ARDS、肺炎、壊死性腸炎、急性膵炎、腎疾病、急性腎臓傷害、肝臓傷害、急性循環不全、子癇前症、癌、癌転移、腫瘍浸潤、末梢血管疾病、1型又は2型糖尿病、アテローム硬化性心血管系疾病、間欠性跛行、重症虚血肢疾病、心筋梗塞、頸動脈閉塞、臍帯閉塞、低出生体重、早産、手術誘導炎症、腫瘍誘導炎症、多発性硬化症、肺動脈弁閉鎖不全、末梢神経障害、低酸素性虚血、細菌感染症、創傷、やけど、断裂、挫傷、骨折、外科手技、組織虚血、関節リウマチ、髄膜炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患、鼻炎、早期分娩、又は感染性疾患からなる群から選択される、請求項 131 に記載の方法。

10

## 【請求項 138】

前記感染症が、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 及び髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) を含むナイセリア (*Neisseria*) 種、ブランハメラ・カタラーリス (*Branhamella catarrhalis*) を含むブランハメラ (*Branhamella*) 種、大腸菌 (*Escherichia coli*) を含むエスケリキア (*Escherichia*) 種、エンテロバクター (*Enterobacter*) 種、プロテウス・ミラビリス (*Proteus mirabilis*) を含むプロテウス (*Proteus*) 種、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、鼻疽菌 (*Pseudomonas mallei*)、及び類鼻疽菌 (*Pseudomonas pseudomallei*) を含むシュードモナス種、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) を含むクレブシエラ (*Klebsiella*) 種、サルモネラ (*Salmonella*) 種、赤痢菌 (*Shigella*) 種、セラチア (*Serratia*) 種、アシネトバクター (*Acinetobacter*) 種；インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) 及び軟性下痢菌 (*Haemophilus ducreyi*) を含むヘモフィルス (*Haemophilus*) 種、ブルセラ (*Bruceella*) 種、エルシニア・ペスチス (*Yersinia pestis*) 及びエルシニア・エンテロコリチカ (*Yersinia enterocolitica*) を含むエルシニア (*Yersinia*) 種、野兔病菌 (*Francisella tularensis*) を含むフランシセラ (*Francisella*) 種、パストレラ・マルトシダ (*Pasteurella multocida*) を含むパストレラ (*Pasteurella*) 種、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 種、メニンゴセプトチカム (*meningosepticum*)、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) を含むカンピロバクター (*Campylobacter*) 種、バクテロイデス・フラジリス (*Bacteroides fragilis*) を含むバクテロイデス (*Bacteroides*) 種 (口腔、咽頭の)、フソバクテリウム・ヌクレアタム (*Fusobacterium nucleatum*) を含むフソバクテリウム (*Fusobacterium*) 種、肉芽腫カリマトバクテリウム (*Calymmatobacterium granulomatis*)、ストレプトバチルス・モニリホルミス (*Streptobacillus moniliformis*) を含むストレプトバチルス (*Streptobacillus*) 属、及び在郷軍人病菌 (*Legionella pneumophila*) を含むレジオネラ (*Legionella*) 種等のグラム陰性菌を原因とする、請求項 131 に記載の方法。

20

30

40

## 【請求項 139】

前記対象が、新生児、小児、青少年、又は成人である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 140】

前記方法が、1年毎に1回以上行われる、請求項 1 に記載の方法。

50

- 【請求項 1 4 1】  
前記方法が、1カ月毎に1回以上行われる、請求項 1 4 0 に記載の方法。
- 【請求項 1 4 2】  
前記方法が、1週間毎に1回以上行われる、請求項 1 4 1 に記載の方法。
- 【請求項 1 4 3】  
前記方法が、1日毎に1回以上行われる、請求項 1 4 2 に記載の方法。
- 【請求項 1 4 4】  
前記方法が、1時間毎に1回以上行われる、請求項 1 4 3 に記載の方法。
- 【請求項 1 4 5】  
前記方法が、少なくとも1回、少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも5回、又は少なくとも10回行われる、請求項 1 に記載の方法。 10
- 【請求項 1 4 6】  
前記方法が、更に、I A I P 又は治療薬を含む処置を前記対象に投与することを含む、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 1 4 7】  
前記対象が、200 μg / mL 以下の I A I P 濃度を有する、請求項 1 4 6 に記載の方法。
- 【請求項 1 4 8】  
前記対象由来の前記サンプルが、参照サンプルと比較して、I A I P - I A I P リガンド複合体の高いレベルを有する、請求項 1 4 6 に記載の方法。 20
- 【請求項 1 4 9】  
前記対象が、炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を有する、請求項 1 4 6 に記載の方法。
- 【請求項 1 5 0】  
前記方法が、I A I P 及び治療薬を前記対象に投与することを含む、請求項 1 4 6 に記載の方法。
- 【請求項 1 5 1】  
前記治療薬が、抗生剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗寄生虫薬、抗炎症剤、抗癌剤、抗凝固剤、免疫調節剤、気管支拡張剤、補体阻害剤、昇圧剤、鎮静剤、又は人工呼吸からなる群から選択される、請求項 1 4 6 又は 1 5 0 に記載の方法。 30
- 【請求項 1 5 2】  
前記対象が、少なくとも1日間病気である、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 1 5 3】  
前記対象が、少なくとも1週間病気である、請求項 1 5 2 に記載の方法。
- 【請求項 1 5 4】  
前記対象が、少なくとも1か月間病気である、請求項 1 5 3 に記載の方法。
- 【請求項 1 5 5】  
前記対象が、少なくとも1年間病気である、請求項 1 5 4 に記載の方法。
- 【請求項 1 5 6】  
前記方法が： 40  
c) 前記対象の前記健康状態を評価し；  
d) 前記対象の前記健康状態を監視し；  
c) 炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有し又はその危険性を有するとして前記対象を診断し；  
d) 前記対象に投与された処置の有効性を評価し；又は  
e) 前記対象における疾病の重症度を評価する  
ためのものである、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 1 5 7】  
前記方法が、更に、前記サンプル中に検出される I A I P 及び / 又は I A I P - I A I P リガンド複合体の前記量を、正常な対象由来のサンプル中に見出される I A I P 及び / 50

又は I A I P - I A I P リガンド複合体の前記量又はカットオフ値と比較することを含む、請求項 1 5 6 に記載の方法。

【請求項 1 5 8】

前記正常な対象由来の前記サンプル中の I A I P の量よりも、又は前記カットオフ値に対して、低い前記サンプル中の I A I P の量は、前記対象が炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を有することを示す、請求項 1 5 7 に記載の方法。

【請求項 1 5 9】

前記正常な対象由来の前記サンプル中の I A I P - I A I P リガンド複合体の量よりも、又は前記カットオフ値に対して、高い前記サンプル中の I A I P - I A I P リガンド複合体の量は、前記対象が炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を有することを示す、請求項 1 5 7 に記載の方法。

10

【請求項 1 6 0】

前記正常な対象由来の前記サンプル中の I A I P の前記量、又は前記カットオフ値が、 $> 250 \mu\text{g} / \text{mL}$  である、請求項 1 5 7 に記載の方法。

【請求項 1 6 1】

前記正常な対象由来の前記サンプル中の I A I P の前記量が、約  $260 \sim 540 \mu\text{g} / \text{mL}$  である、請求項 1 6 0 に記載の方法。

【請求項 1 6 2】

前記対象が  $250 \mu\text{g} / \text{mL}$  以下の I A I P 濃度を有するという決定は、前記対象が炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有し又は発症する高い危険性を有し、又は病的状態及び / 若しくは死亡の高い危険性を有すると診断されることを示す、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 1 6 3】

前記対象が  $200 \sim 300 \mu\text{g} / \text{mL}$  の I A I P 濃度を有し、前記方法が少なくとも年に 1 回行われる、請求項 1 5 7 に記載の方法。

【請求項 1 6 4】

前記方法が少なくとも年に 2 回行われる、請求項 1 6 3 に記載の方法。

【請求項 1 6 5】

前記方法が少なくとも月に 1 回行われる、請求項 1 6 3 に記載の方法。

【請求項 1 6 6】

前記方法が少なくとも週に 1 回行われる、請求項 1 6 3 に記載の方法。

30

【請求項 1 6 7】

前記方法が少なくとも 1 日 1 回行われる、請求項 1 6 3 に記載の方法。

【請求項 1 6 8】

前記方法が少なくとも 1 時間に 1 回行われる、請求項 1 6 3 に記載の方法。

【請求項 1 6 9】

前記対象が、以前に炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有した、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7 0】

前記方法が、前記処置に先立って、及び前記処置の過程に 1 回以上行われる、請求項 1 4 6 に記載の方法。

40

【請求項 1 7 1】

前記方法が、前記処置の開始後、及び / 又は前記処置の終局後に行われる、請求項 1 4 6 に記載の方法。

【請求項 1 7 2】

前記処置が、前記対象における I A I P の前記濃度が、前記対象における I A I P の以前の測定値と比較して増大している場合、及び / 又は前記対象における I A I P - I A I P リガンド複合体の前記濃度が、前記対象における I A I P - I A I P リガンド複合体の以前の測定値と比較して低下している場合、有効であると決定される、請求項 1 4 6 に記載の方法。

50

## 【請求項 173】

前記処置が、I A I Pの前記濃度が、前記対象におけるI A I Pの以前の測定値と比較して、前記対象において低下し又は一定のままである場合、及び/又はI A I P - I A I Pリガンド複合体の前記濃度が、前記対象におけるI A I P - I A I Pリガンド複合体の以前の測定値と比較して、前記対象において増加し又は一定のままである場合、無効であると決定される、請求項 146に記載の方法。

## 【請求項 174】

前記方法が、前記処置を修正又は変更することを更に含む、請求項 173に記載の方法。

## 【請求項 175】

炎症性疾患又は感染症を有し又は発症する危険性を有する対象の処置方法であって、前記対象が、請求項 1の方法による処置が必要であると決定されており、前記方法が、I A I P及び/又は抗生剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗寄生虫薬、抗炎症剤、抗癌剤、抗凝固剤、免疫調節剤、気管支拡張剤、補体阻害剤、昇圧剤、鎮静剤、若しくは人工呼吸からなる群から選択される治療的有効量の治療薬を前記対象に投与することを含む、方法。

## 【請求項 176】

前記炎症性疾患又は状態が、敗血症、敗血性ショック、無菌敗血症、外傷、傷害、卒中、急性炎症性疾患、S I R S、急性肺傷害、A R D S、肺炎、壊死性腸炎、急性膵炎、腎臓疾患、急性腎臓傷害、肝臓傷害、急性循環不全、手術誘導炎症、腫瘍誘導炎症、多発性硬化症、子癇前症、癌、癌転移、腫瘍浸潤、末梢血管疾患、1型又は2型糖尿病、アテローム硬化性心血管系疾患、間欠性跛行、重症虚血肢疾患、心筋梗塞、頸動脈閉塞、臍帯閉塞、低出生体重、早産、肺動脈弁閉鎖不全、末梢神経障害、低酸素性虚血、細菌感染症、創傷、やけど、断裂、挫傷、骨折、外科手技、組織虚血、関節リウマチ、髄膜炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患、鼻炎、早期分娩、又は感染性疾患からなる群から選択される、請求項 175に記載の方法。

## 【請求項 177】

前記感染症が、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 及び髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) を含むナイセリア (*Neisseria*) 種、ブランハメラ・カタラーリス (*Branhamella catarrhalis*) を含むブランハメラ (*Branhamella*) 種、大腸菌 (*Escherichia coli*) を含むエスケリキア (*Escherichia*) 種、エンテロバクター (*Enterobacter*) 種、プロテウス・ミラビリス (*Proteus mirabilis*) を含むプロテウス (*Proteus*) 種、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、鼻疽菌 (*Pseudomonas mallei*) 及び類鼻疽菌 (*Pseudomonas pseudomallei*) を含むシュードモナス (*Pseudomonas*) 種、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) を含むクレブシエラ (*Klebsiella*) 種、サルモネラ (*Salmonella*) 種、赤痢菌 (*Shigella*) 種、セラチア (*Serratia*) 種、アシネトバクター (*Acinetobacter*) 種; インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) 及び軟性下疳菌 (*Haemophilus ducreyi*) を含むヘモフィルス (*Haemophilus*) 種、ブルセラ (*Bruceella*) 種、エルシニア・ペスチス (*Yersinia pestis*) 及びエルシニア・エンテロコリチカ (*Yersinia enterocolitica*) を含むエルシニア (*Yersinia*) 種、野兔病菌 (*Francisella tularensis*) を含むフランシセラ (*Francisella*) 種、パスツレラ・マルトシダ (*Pasteurella multocida*) を含むパスツレラ (*Pasteurella*) 種、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 種、メニンゴセプチカム (*meningosepticum*)、カンピロバクター・ジエジュニ (*Campylobacter jejuni*) を含むカンピロバクター (*Campylobacter*) 種、バクテロイデス・フラジリス (*Bacteroides*

10

20

30

40

50

*fragilis*)を含むバクテロイデス(*Bacteroides*)種(口腔、咽頭の)、フソバクテリウム・ヌクレアタム(*Fusobacterium nucleatum*)を含むフソバクテリウム(*Fusobacterium*)種、肉芽腫カリマトバクテリウム(*Calymmatobacterium granulomatis*)、ストレプトバチルス・モニリホルミス(*Streptobacillus moniliformis*)を含むストレプトバチルス(*Streptobacillus*)属、及び在郷軍人病菌(*Legionella pneumophila*)を含むレジオネラ(*Legionella*)種等のグラム陰性菌を原因とする、請求項175に記載の方法。

【請求項178】

前記検出剤が標識されている、請求項81に記載のキット。

10

【請求項179】

前記IAIP結合剤が、IAIP特異的抗体又はIAIPリガンドである、請求項81に記載のキット。

【請求項180】

前記キットが、更にIAIPリガンド結合剤を含む、請求項81に記載のキット。

【請求項181】

前記IAIPリガンド結合剤が、IAIPリガンドに結合する抗体である、請求項180に記載のキット。

【請求項182】

前記IAIP検出剤が、IAIP特異的抗体又はIAIPリガンドである、請求項81に記載のキット。

20

【請求項183】

前記キットが、更にIAIPリガンド検出剤を含む、請求項81に記載のキット。

【請求項184】

前記IAIPリガンド検出剤が、IAIPリガンドに特異的に結合する抗体である、請求項183に記載のキット。

【請求項185】

前記IAIP特異的抗体がモノクローナル抗体である、請求項179又は182に記載のキット。

【請求項186】

前記モノクローナル抗体が、MAb 69.26又はMAb 69.31である、請求項185に記載のキット。

30

【請求項187】

前記支持体が、プレート、樹脂、容器、膜、バイオチップ、粒子、ナノ粒子、試験片、又はビーズである、請求項82に記載のキット。

【請求項188】

前記標識が、酵素、酵素基質、ビオチン、粒子、蛍光染料、発光化合物、又は放射標識である、請求項81に記載のキット。

【請求項189】

前記IAIPリガンドが、エンドキシリン(LPS)、ヘパリン、ヒストン、ヒアルロン酸、ラミニン、テネイシンC、アグリカン、ビトロネクチン、フィブロネクチン、フォン・ヴィルブランド因子、ペントラキシン-3(PTX3)、TNF-刺激遺伝子-6(TSG-6)、因子IX、補体成分、因子XI、及び組織トランスグルタミナーゼからなる群から選択される、請求項179~184のいずれか一項に記載のキット。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

IAIP(インター 阻害剤タンパク質)は、全ての哺乳動物の血中を高濃度で循環する、天然に存在する免疫調節性血漿タンパク質のファミリーである。IAIPは、主に肝臓で産生され、血液中に放出され、サブユニット(ピクニン)は尿中に排泄される。IA

50

I A I P は、炎症の調節に重要な役割を果たす。これらは、感染、外傷及び傷害に起因する重篤な炎症に対して広範な保護効果を有し、重要なことに、I A I P の保護効果は、原因微生物因子又はトリガーから独立している。このファミリーのメンバーは、グリコサミノグリカンによって共有結合した重鎖及び軽鎖ポリペプチドのサブユニットから構成されている。I A I P はインビボでは、2つの重鎖（H 1 及び H 2 ）と1つの軽鎖（L ）から構成される250 k D a の分子であるインター 阻害剤（I I ）と、1つの重鎖（H 3 ）と1つの軽鎖（L ）から構成される125 k D a の分子であるプレ 阻害剤（P I ）として見出され得る。

#### 【背景技術】

##### 【0002】

身体が、傷害又は感染の間に誘導されるもの等の炎症シグナルを発生すると、I A I P は組織に輸送され、炎症部位に直接到達する。I A I P の重鎖は、炎症カスケードの一部であるタンパク質に結合することによって抗炎症応答を増強する。又、重鎖が切断されると、それに結合したG A G（2つのクニツドメインのために「ピクニン」と名付けられた）を有する軽鎖が放出され、軽鎖のセリンプロテアーゼ阻害活性が活性化される。ピクニンは、トリプシン、エラスターゼ、プラスミン、カテプシンG及びフリン等のセリンプロテアーゼの活性を阻害する。I A I P は複数の機序を介して抗炎症作用を発揮する。これらは、補体及び細胞外ヒストン（損傷信号）等の炎症を増幅するタンパク質と結合し、それにより炎症過程を減弱させることが示されている。重鎖を介して、I A I P は細胞外マトリクス（E C M）タンパク質に結合でき、インビトロ及びインビボモデルの両方で傷害後の肺上皮修復を促進することが示されている。I A I P は又、T N F - 及びI L - 6等の炎症性サイトカインを下方調節することが複数のインビボモデルにおいて示されている。ピクニン欠損（そのため、I A I P が不足している）マウスは、細胞接着の炎症性マーカーであるV C A M - 1及びI C A M - 1を減少させたことが示されている。

##### 【0003】

健常人では、血中の循環I A I P の量は比較的高い（400 ~ 800 m g / L の範囲）。しかしながら、I A I P レベルは新生児及び成人患者における全身性炎症 / 敗血症の間に急速に低下し（B a e k Y W、e t a l . J P e d i a t r . 2 0 0 3 ; 1 4 3 : 1 1 ~ 1 5 ; L i m Y P e t a l . J I n f e c t D i s . 2 0 0 3 ; 1 8 8 : 9 1 9 - 9 2 6 及びO p a l S M、e t a l . C r i t C a r e M e d . 2 0 0 7 ; 3 5 : 3 8 7 - 3 9 2 ）、I A I P レベルの低下は疾患進行と強く相関することが示されている。疾患がより進行し、重篤な段階に進むにつれて、I A I P レベルは急激に低下し、I A I P が、臨床医が疾患の進行を監視し、重症肺炎、敗血症及び関連する臓器損傷、N E C、創傷治癒、やけど、癌、脳卒中、アルツハイマー病、てんかん等のような重篤な炎症性疾患等の疾病のための情報に基づいた治療決定を行う際に、予後及びセラノスティックスのマーカーとして臨床的有用性を有することを示唆する。

##### 【0004】

標準化競合I A I P イムノアッセイを用いて、細菌及びウイルス感染後の全身性炎症を有する患者からの血液サンプル中のI A I P が測定されている。競合I A I P イムノアッセイは、軽鎖のみを検出するI A I P の測定値を提供し、従って、インタクトI A I P 及び切断ピクニンの両方がこのアッセイにおいて検出される。競合アッセイは、その抗炎症性及び組織修復特性にとって非常に重要であるI A I P の他の重要な部分；即ち重鎖とグリコサミノグリカンを検出しない。このように、競合的I A I P イムノアッセイは、患者サンプルにおける活性I A I P の評価において制限を有する。I A I P が生体の保護的な自然免疫防御の重要な構成要素であり、予後バイオマーカーとしての利用可能性を考えると、I A I P を定量的に測定するための改良された方法が必要である。理想的なアッセイは、完全な分子を捕捉するために軽鎖及び重鎖サブユニットの両方を測定するであろう。

#### 【発明の概要】

##### 【0005】

本発明は、I A I P（例えば、インタクトI A I P、I A I P の重鎖、又はI A I P の

10

20

30

40

50

グリコサミノグリカン (GAG) に結合し及び I A I P を検出する薬剤による直接検出を介して、対象由来のサンプル中の I A I P を定量化する方法を提供する。定量化の方法は、対象を評価、診断、処置若しくは監視するために、又は対象における疾患の重症度若しくは治療有効性を評価するために用いることができる。本発明は又、本明細書に記載する方法に従って I A I P を定量化するために使用することができるキットを特徴とする。

【0006】

第1の態様において、サンプルを結合剤と接触させて I A I P 結合剤複合体を生成することであって、結合剤は支持体に結合される、生成することと； b) I A I P 結合剤複合体を検出剤と接触させることと； c) I A I P 結合剤複合体に結合した検出剤の量を検出して、サンプル中の I A I P を定量化することによる、対象由来のサンプル中のインター阻害剤タンパク質 (I A I P) を定量化する方法を特徴とする。

10

【0007】

いくつかの実施形態において、I A I P はインタクト I A I P である。

【0008】

いくつかの実施形態において、結合剤は、I A I P に結合する I A I P リガンドである。いくつかの態様において、結合剤は、I A I P に特異的に結合する抗体である。

【0009】

いくつかの実施形態において、検出剤は、I A I P リガンドであるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態において、検出剤は、I A I P リガンド検出剤 (例えば、I A I P リガンド) に結合する抗体を更に含む。いくつかの実施形態において、検出剤は、I A I P に特異的に結合する抗体である。例えば、特定の実施形態では、結合剤は、I A I P に特異的に結合する抗体 (例えば、M A b 69.26 又は M A b 69.31) であり、検出剤は、I A I P に結合する I A I P リガンド (例えば、ヘパリン、ヒアルロン酸、エンドキシシン (L P S)、又はヒストン) であるか、又はそれを含む。別の実施形態では、結合剤は、I A I P に結合する I A I P リガンド (例えば、ヘパリン、ヒアルロン酸、L P S、又はヒストン) であり、検出剤は、I A I P に特異的に結合する抗体 (例えば、M A b 69.26 又は M A b 69.31) である。

20

【0010】

いくつかの実施形態において、I A I P は、I A I P - I A I P リガンド複合体中に存在する。

30

【0011】

いくつかの実施形態において、結合剤は、I A I P に結合する I A I P リガンドである。いくつかの実施形態において、I A I P - I A I P リガンド複合体の I A I P リガンドは、結合剤とは異なる。いくつかの実施形態において、結合剤は、I A I P - I A I P リガンド複合体の I A I P リガンドに結合する抗体である。いくつかの実施形態において、結合剤は、I A I P - I A I P リガンド複合体の I A I P に特異的に結合する抗体である。

【0012】

いくつかの実施形態において、検出剤は、I A I P に結合する I A I P リガンドを含む。いくつかの実施形態において、検出剤は、I A I P リガンド検出剤に結合する抗体を更に含む。いくつかの実施形態において、I A I P - I A I P リガンド複合体の I A I P リガンドは、I A I P リガンド検出剤とは異なる。いくつかの実施形態において、検出剤は、I A I P - I A I P リガンド複合体の I A I P リガンドに結合する抗体である。いくつかの実施形態において、検出剤は、I A I P - I A I P リガンド複合体の I A I P に特異的に結合する抗体である。

40

【0013】

いくつかの実施形態において、抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は M A b 69.26 又は M A b 69.31 である。

【0014】

いくつかの実施形態において、I A I P リガンドは、エンドキシシン (L P S)、ヘパ

50

リン、ヒストン、ヒアルロン酸、ピトロネクチン、フィブロネクチン、ラミニン、テネイシンC、アグリカン、フォン・ヴィルブランド因子、ペントラキシン-3 (PTX3)、TNF-刺激遺伝子-6 (TSG-6)、因子IX、補体成分、因子XIIIa、及び組織トランスグルタミナーゼからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、補体成分は、C1q、C2、C3、C4、C5、C6、C8、プロパージン、又は因子Dである。

【0015】

いくつかの実施形態において、検出剤は、標識を含む。いくつかの実施形態において、標識は、ビオチン、酵素、酵素基質、放射標識、発光化合物、コロイド金、粒子、又は蛍光染料である。

10

【0016】

いくつかの実施形態において、支持体は、プレート、粒子、ナノ粒子、樹脂、膜、バイオチップ、容器、試験片、又はビーズである。

【0017】

いくつかの実施形態において、方法は更に、ステップa)とb)の間に洗浄ステップを含む。

【0018】

いくつかの実施形態において、方法は更に、ステップb)とc)の間に洗浄ステップを含む。

20

【0019】

いくつかの実施形態において、方法は更に、ステップa)又はステップb)に先立ってブロッキングステップを含む。

【0020】

いくつかの実施形態において、ステップa)及び/又はb)における接触は、pH約7.0~約3.5で行われる。いくつかの実施形態において、pHは約5.0~約3.5である。いくつかの実施形態において、pHは約4.0である。

【0021】

いくつかの実施形態において、サンプルは流体である。いくつかの実施形態において、流体は血液、血漿、血清、尿、脳脊髄液、滑液、羊水、間質液、卵胞液、腹水、気管支肺胞洗浄液、母乳、痰、リンパ液、胆汁、又は組織ホモジネートである。

30

【0022】

いくつかの実施形態において、対象はヒト対象である。いくつかの実施形態において、対象は、炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を有すると特定されている。いくつかの実施形態において、対象は、炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を有すると特定されていない。いくつかの実施形態において、方法は、対象が炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有し又はその危険性を有するとして診断される前、診断された後、又は診断と同時に行われる。いくつかの実施形態において、方法は、対象の炎症性疾病若しくは状態又は感染症の処置と実質的に同時に行われる。いくつかの実施形態において、方法は、対象の炎症性疾病若しくは状態又は感染症の処置に先立って行われる。いくつかの実施形態において、方法は、対象の炎症性疾病若しくは状態又は感染症の処置の後に行われる。

40

【0023】

いくつかの実施形態において、炎症性疾病又は状態は、敗血症、敗血性ショック、無菌敗血症、外傷、傷害、卒中、急性炎症性疾病、SIRS、急性肺傷害、ARDS、肺炎、壊死性腸炎、急性膵炎、腎疾病、急性腎臓傷害、肝臓傷害、急性循環不全、子癇前症、癌、癌転移、腫瘍浸潤、末梢血管疾病、1型又は2型糖尿病、アテローム硬化性心血管系疾病、間欠性跛行、重症虚血肢疾病、心筋梗塞、頸動脈閉塞、臍帯閉塞、低出生体重、早産、手術誘導炎症、腫瘍誘導炎症、多発性硬化症、肺動脈弁閉鎖不全、末梢神経障害、低酸素性虚血、細菌感染症、創傷、やけど、断裂、挫傷、骨折、外科手技、組織虚血、関節リウマチ、髄膜炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患、鼻炎、早期分娩、又は感染性疾患か

50

らなる群から選択される。

【0024】

いくつかの実施形態において、感染症は、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 及び髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) を含むナイセリア (*Neisseria*) 種、ブランハメラ・カタラーリス (*Branhamella catarrhalis*) を含むブランハメラ (*Branhamella*) 種、大腸菌 (*Escherichia coli*) を含むエスケリキア (*Escherichia*) 種、エンテロバクター (*Enterobacter*) 種、プロテウス・ミラビリス (*Proteus mirabilis*) を含むプロテウス (*Proteus*) 種、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、鼻疽菌 (*Pseudomonas mallei*) 及び類鼻疽菌 (*Pseudomonas pseudomallei*) を含むシュードモナス (*Pseudomonas*) 種、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) を含むクレブシエラ (*Klebsiella*) 種、サルモネラ (*Salmonella*) 種、赤痢菌 (*Shigella*) 種、セラチア (*Serratia*) 種、アシネトバクター (*Acinetobacter*) 種；インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) 及び軟性下疳菌 (*Haemophilus ducreyi*) を含むヘモフィルス (*Haemophilus*) 種、ブルセラ (*Brucella*) 種、エルシニア・ペスチス (*Yersinia pestis*) 及びエルシニア・エンテロコリチカ (*Yersinia enterocolitica*) を含むエルシニア (*Yersinia*) 種、野兔病菌 (*Francisella tularensis*) を含むフランシセラ (*Francisella*) 種、パストツレラ・マルトシダ (*Pasteurella multocida*) を含むパストツレラ (*Pasteurella*) 種、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 種、メニンゴセプチカム (*meningosepticum*)、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) を含むカンピロバクター (*Campylobacter*) 種、バクテロイデス・フラジリス (*Bacteroides fragilis*) を含むバクテロイデス (*Bacteroides*) 種 (口腔、咽頭の)、フソバクテリウム・ヌクレアタム (*Fusobacterium nucleatum*)、肉芽腫カリマトバクテリウム (*Calymmatobacterium granulomatis*) を含むフソバクテリウム (*Fusobacterium*) 種、ストレプトバチルス・モニリホルミス (*Streptobacillus moniliformis*) を含むストレプトバチルス (*Streptobacillus*) 属、及び在郷軍人病菌 (*Legionella pneumophila*) を含むレジオネラ (*Legionella*) 種等のグラム陰性菌を原因とする。

10

20

30

【0025】

いくつかの実施形態において、対象は、新生児、小児、青少年、又は成人である。

【0026】

いくつかの実施形態において、方法は、1年毎に1回以上行われる。いくつかの実施形態において、方法は、1カ月毎に1回以上行われる。いくつかの実施形態において、方法は、1週間毎に1回以上行われる。いくつかの実施形態において、方法は、1日毎に1回以上行われる。いくつかの実施形態において、方法は、1時間毎に1回以上行われる。

40

【0027】

いくつかの実施形態において、方法は、少なくとも1回、少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも5回、又は少なくとも10回行われる。

【0028】

いくつかの実施形態において、方法は更に、IAIP又は治療薬を含む処置を対象に投与することを含む。いくつかの実施形態において、対象は、 $200\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下のIAIP濃度を有する。いくつかの実施形態において、対象由来のサンプルは、参照サンプルと比較して、IAIP-IAIPリガンド複合体の高いレベルを有する。いくつかの実施形態において、対象は、炎症性疾患若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を

50

有する。

【0029】

いくつかの実施形態において、方法は、IAIP及び治療薬を対象に投与することを含む。

【0030】

いくつかの実施形態において、治療薬は、抗生剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗寄生虫薬、抗炎症剤、抗癌剤、抗凝固剤、免疫調節剤、気管支拡張剤、補体阻害剤、昇圧剤、鎮静剤、又は人工呼吸からなる群から選択される。

【0031】

いくつかの実施形態において、対象は、少なくとも1日間病気である。いくつかの実施形態において、対象は、少なくとも1週間病気である。いくつかの実施形態において、対象は、少なくとも1か月間病気である。いくつかの実施形態において、対象は、少なくとも1年間病気である。

10

【0032】

いくつかの実施形態において、方法は：a)対象の健康状態を評価し；b)対象の健康状態を監視し；c)炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有し又はその危険性を有するとして対象を診断し；d)対象に投与された処置の有効性を評価し；又はe)対象における疾病の重症度を評価するためのものである。

【0033】

いくつかの実施形態において、方法は更に、サンプル中に検出されるIAIP及び/又はIAIP-IAIPリガンド複合体の量を、正常な対象由来のサンプル中に見出されるIAIP及び/又はIAIP-IAIPリガンド複合体の量又はカットオフ値と比較することを含む。いくつかの実施形態において、正常な対象由来のサンプル中のIAIPの量よりも、又はカットオフ値に対して、低いサンプル中のIAIPの量は、対象が炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を有することを示す。いくつかの実施形態において、正常な対象由来のサンプル中のIAIP-IAIPリガンド複合体の量よりも、又はカットオフ値に対して、高いサンプル中のIAIP-IAIPリガンド複合体の量は、対象が炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を有することを示す。いくつかの実施形態において、正常な対象由来のサンプル中のIAIPの量、又はカットオフ値は、 $> 250 \mu\text{g}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態において、正常な対象由来のサンプル中のIAIPの量は、約 $260 \sim 540 \mu\text{g}/\text{mL}$ である。

20

30

【0034】

いくつかの実施形態において、対象が $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下のIAIP濃度を有するという決定は、対象が炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有し又は発症する高い危険性を有し、又は病的状態及び/若しくは死亡の高い危険性を有すると診断されることを示す。

【0035】

いくつかの実施形態において、対象は、 $200 \sim 300 \mu\text{g}/\text{mL}$ のIAIP濃度を有する。別の実施形態では、方法は、少なくとも年に1回、少なくとも年に2回、少なくとも月に1回、少なくとも週に1回、少なくとも1日1回、又は少なくとも1時間に1回行われる。

40

【0036】

いくつかの実施形態において、対象は、炎症性疾病若しくは状態又は感染症を以前に有していた。

【0037】

いくつかの実施形態において、方法は、処置に先立って、及び/又は処置の過程に1回以上行われる。いくつかの実施形態において、方法は、処置の開始後、及び/又は処置の終局後に行われる。いくつかの実施形態において、処置は、対象におけるIAIPの濃度が、対象におけるIAIPの以前の測定値と比較して増大している場合、及び/又は対象におけるIAIP-IAIPリガンド複合体の濃度が、対象におけるIAIP-IAIPリガンド複合体の以前の測定値と比較して低下している場合、有効であると決定される

50

。いくつかの実施形態において、処置は、IAIPの濃度が、対象におけるIAIPの以前の測定値と比較して、対象において低下し又は一定のままである場合、及び/又はIAIP-IAIPリガンド複合体の濃度が、対象におけるIAIP-IAIPリガンド複合体の以前の測定値と比較して、対象において増加し又は一定のままである場合、無効であると決定される。いくつかの実施形態において、方法は更に、処置を修正又は変更することを含む。

【0038】

第2の態様において、治療的有効量のIAIP及び/又は抗生剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗寄生虫薬、抗炎症剤、抗癌剤、抗凝固剤、免疫調節剤、気管支拡張剤、補体阻害剤、昇圧剤、鎮静剤、若しくは人工呼吸からなる群から選択される治療薬を対象に投与することによる、炎症性疾病又は感染症を有し又は発症する危険性を有する対象（例えば、新生児、小児、青少年、又は成人等のヒト）の処置方法を特徴とし、ここで対象は、第1の態様の方法に従って、処置が必要であると決定されている。

10

【0039】

いくつかの実施形態において、炎症性疾病又は状態は、敗血症、敗血性ショック、無菌敗血症、外傷、傷害、卒中、急性炎症性疾病、SIRS、急性肺傷害、ARDS、肺炎、壊死性腸炎、急性膵炎、腎疾病、急性腎臓傷害、肝臓傷害、急性循環不全、手術誘導炎症、腫瘍誘導炎症、多発性硬化症、子癩前症、癌、癌転移、腫瘍浸潤、末梢血管疾病、1型又は2型糖尿病、アテローム硬化性心血管系疾病、間欠性跛行、重症虚血肢疾病、心筋梗塞、頸動脈閉塞、臍帯閉塞、低出生体重、早産、肺動脈弁閉鎖不全、末梢神経障害、低酸素性虚血、細菌感染症、創傷、やけど、断裂、挫傷、骨折、外科手技、組織虚血、関節リウマチ、髄膜炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患、鼻炎、早期分娩、又は感染性疾患からなる群から選択される。

20

【0040】

いくつかの実施形態において、感染症は、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 及び髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) を含むナイセリア (*Neisseria*) 種、ブランハメラ・カタラーリス (*Branhamella catarrhalis*) を含むブランハメラ (*Branhamella*) 種、大腸菌 (*Escherichia coli*) を含むエスケリキア (*Escherichia*) 種、エンテロバクター (*Enterobacter*) 種、プロテウス・ミラビリス (*Proteus mirabilis*) を含むプロテウス (*Proteus*) 種、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、鼻疽菌 (*Pseudomonas mallei*) 及び類鼻疽菌 (*Pseudomonas pseudomallei*) を含むシュードモナス (*Pseudomonas*) 種、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) を含むクレブシエラ (*Klebsiella*) 種、サルモネラ (*Salmonella*) 種、赤痢菌 (*Shigella*) 種、セラチア (*Serratia*) 種、アシネトバクター (*Acinetobacter*) 種；インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) 及び軟性下疳菌 (*Haemophilus ducreyi*) を含むヘモフィルス (*Haemophilus*) 種、ブルセラ (*Brucella*) 種、エルシニア・ペストリス (*Yersinia pestis*) 及びエルシニア・エンテロコリチカ (*Yersinia enterocolitica*) を含むエルシニア (*Yersinia*) 種、野兔病菌 (*Francisella tularensis*) を含むフランシセラ (*Francisella*) 種、パスツレラ・マルトシダ (*Pasteurella multocida*) を含むパスツレラ (*Pasteurella*) 種、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 種、メニンゴセプトチカム (*meningosepticum*)、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) を含むカンピロバクター (*Campylobacter*) 種、バクテロイデス・フラジリス (*Bacteroides fragilis*) を含むバクテロイデス (*Bacteroides*) 種 (口腔、咽頭の)、フソバクテリウム・ヌクレアタム (*Fusobacteri*

30

40

50

um nucleatum)を含むフソバクテリウム(*Fusobacterium*)種、肉芽腫カリマトバクテリウム(*Calymmatobacterium granulomatis*)、ストレプトバチルス・モニリホルミス(*Streptobacillus moniliformis*)を含むストレプトバチルス(*Streptobacillus*)属、及び在郷軍人病菌(*Legionella pneumophila*)を含むレジオネラ(*Legionella*)種等のグラム陰性菌を原因とする。

【0041】

第3の態様において、サンプル中のIAIP又はIAIP-IAIPリガンド複合体を定量化するためのキットを特徴とし、ここでキットは、IAIP結合剤及びIAIP検出剤、並びに場合により、以下の1つ以上を含む：洗浄緩衝液、ブロッキング剤、標識検出のための基質、及びサンプル中のIAIP又はIAIP-IAIPリガンド複合体のレベルを定量化するための説明書。キットの構成要素の1つ以上は、チューブ若しくはバイアル等の容器内に提供され、及び/又は使用の準備が整った形態にあり得る(例えば、キットの支持体(例えば、プレート又は試験片)への適用。

10

【0042】

いくつかの実施形態において、結合剤は、支持体に固定化されている。

【0043】

いくつかの実施形態において、検出剤は、標識されている。

【0044】

いくつかの実施形態において、IAIP結合剤は、IAIP特異的抗体又はIAIPリガンドである。

20

【0045】

いくつかの実施形態において、キットは更に、IAIPリガンド結合剤を含む。いくつかの実施形態において、IAIPリガンド結合剤は、IAIPリガンドに結合する抗体である。

【0046】

いくつかの実施形態において、IAIP検出剤は、IAIP特異的抗体又はIAIPリガンドである。

【0047】

いくつかの実施形態において、キットは更に、IAIPリガンド検出剤を含む。いくつかの実施形態において、IAIPリガンド検出剤は、IAIPリガンドに特異的に結合する抗体である。

30

【0048】

いくつかの実施形態において、IAIP特異的抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体はMAb 69.26又はMAb 69.31である。

【0049】

いくつかの実施形態において、支持体は、プレート、樹脂、容器、膜、バイオチップ、粒子、ナノ粒子、試験片、又はビーズである。

【0050】

いくつかの実施形態において、標識は、酵素、酵素基質、ビオチン、粒子、蛍光染料、発光化合物、又は放射標識である。

40

【0051】

いくつかの実施形態において、IAIPリガンドは、エンドキシリン(LPS)、ヘパリン、ヒストン、ヒアルロン酸、ラミニン、テネイシンC、アグリカン、ビトロネクチン、フィブロネクチン、フォン・ヴィルブランド因子、ペントラキシン-3(PTX3)、TNF-刺激遺伝子-6(TSG-6)、因子IX、補体成分、因子XIIIa、及び組織トランスグルタミナーゼからなる群から選択される。

【0052】

定義

50

本明細書で使用される用語「約」は、記載される値の10%以上又は以下である値を指す。例えば、用語「約5 nM」は、4.5 nM ~ 5.5 nMの範囲を示す。

【0053】

本明細書で使用される「投与」は、任意の有効な経路によって、対象に治療薬（例えば、IAIP）を提供又は与えることを指す。例示的な投与経路は、下記にて本明細書に記載される。

【0054】

本明細書で使用される用語「抗体」(Ab)は、特定の抗原に特異的に結合する、又は特定の抗原と免疫学的に反応性である免疫グロブリン分子を指し、少なくとも重鎖の可変ドメインを含み、通常、免疫グロブリンの少なくとも重鎖及び軽鎖の可変ドメインを含む。抗体及び抗原結合断片、変異体、又はそれらの誘導体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、霊長類化抗体、又はキメラ抗体、ヘテロコンジュゲート抗体（例えば、二、三及び四特異的抗体、ダイアボディ、トリアボディ、及びテトラボディ）、単ドメイン抗体(s d Ab)、エピトープ結合断片、例えば、Fab、Fab'及びF(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fvs、単鎖Fvs(scFv)、rlgG、単鎖抗体、ジスルフィド結合Fvs(sdFv)、V<sub>L</sub>又はV<sub>H</sub>ドメインのいずれかを含む断片、Fab発現ライブラリーによって産生される断片、及び抗イデオタイプ(抗-Id)抗体が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の抗体分子は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、及びIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2）又はサブクラスであり得る。更に、特に示さない限り、用語「モノクローナル抗体」(mAb)は、インタクト分子、及び、標的タンパク質に特異的に結合できる抗体断片（例えば、Fab及びF(ab')<sub>2</sub>断片等）の両方を含むことが意図される。Fab及びF(ab')<sub>2</sub>断片はインタクト抗体のFc断片を欠き、動物の循環からより迅速に除去され、インタクト抗体よりも非特異的組織結合が少ない可能性がある。

【0055】

本明細書で使用される用語「抗原結合断片」は、標的抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ以上の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、全長抗体の断片によって行うことができる。抗体断片は、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、SMIP、ダイアボディ、トリアボディ、アフィボディ、ナノボディ、アプタマー、又はドメイン抗体であり得る。抗体の用語「抗原結合断片」に包含される結合断片の例としては：(i) Fab断片、V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>、C<sub>L</sub>、及びC<sub>H</sub>1ドメインからなる一価断片；(ii) F(ab')<sub>2</sub>断片、ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片；(iii) V<sub>H</sub>及びC<sub>H</sub>1ドメインからなるFd断片；(iv) 抗体の単一アームのV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>ドメインからなるFv断片、(v) V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインを含むdAb；(vi) V<sub>H</sub>ドメインからなるdAb断片(Ward et al., Nature 341:544-546, 1989)；(vii) V<sub>H</sub>又はV<sub>L</sub>ドメインからなるdAb；(viii) 単離された相補性決定領域(CDR)；並びに(ix) 場合により合成リンカーによって連結され得る2つ以上の単離されたCDRの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。更に、Fv断片の2つのドメイン、V<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>は、別々の遺伝子によってコードされているが、それらは、組換え法を用いて、V<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>領域が対合して一価分子を形成する単一のタンパク質鎖として作製されることを可能にするリンカーによって連結され得る(単鎖Fv(scFv)として既知；例えば、Bird et al., Science 242:423-426, 1988、及びHouston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988参照)。これらの抗体断片は、当業者に既知の従来技術を用いて得ることができ、断片は、インタクト抗体と同じ方法で有用性についてスクリーニングすることができる。抗原結合断片は、組換えDNA技術、インタクト免疫グロブリンの酵素的若しくは化学的切断によって、又は、いくつかの実施形態では、当該技術分野で既知の化学的ペプチド合成手順によって作製することができる。

10

20

30

40

50

## 【0056】

本明細書で使用される用語「インター 阻害剤タンパク質」又は「IAIP」は、構造的に関連した免疫調節性タンパク質のファミリーにおける大きい多成分糖タンパク質を指す。IAIPは、好中球エラスターゼ、プラスミン、トリプシン、キモトリプシン、グランザイムK、前タンパク質転換酵素、フリン、カテプシンG、及びアクロシンを含む一連のプロテアーゼの阻害において重要であることが示されている。IAIPは、補体、細胞外ヒストン、及び凝固因子への結合及び不活化等のセリンプロテアーゼ阻害活性に加えて、TNF- $\alpha$ 及びIL-6等の炎症誘発性サイトカインの下方調節、VCAM及びICAM等の接着因子の下方調節、並びにNF $\kappa$ Bの下方調節等、広範な抗炎症機構を発揮する。IAIPは又、重鎖がマトリックスタンパク質に移されて細胞の移動及び増殖を促進する組織の保護及び修復の促進にも重要である。ヒト血漿中で、IAIPは比較的高濃度(400~800 $\mu$ g/L)で検出される。他の阻害剤分子とは異なり、この阻害剤のファミリーは、一般に、コンドロイチン硫酸鎖により共有結合したポリペプチド鎖の組み合わせ(軽鎖及び重鎖)を含む。IAIPの重鎖(H1、H2、及びH3)は、ヒアルロン酸(HA)結合タンパク質とも称される。ヒト血漿中に見出されるIAIPの主な形態は、2つの重鎖(H1及びH2)及び1つの軽鎖(L)を含むインター 阻害剤(II)と、1つの重鎖(H3)及び1つの軽鎖(L)を含むプレ 阻害剤(PI)である。別のIAIPは、血漿及び組織セリンプロテアーゼを広く阻害することが既知の、グリコサミノグリカンに結合した軽鎖(2つのクニツドメインを有するビクニン(バイクニッツ(bi-Kunitz)阻害剤)とも称される)である。別のIAIPは、ビクニンに結合することなく血中を循環する重鎖関連分子H4である。更なる別のIAIPは、重鎖関連分子H5である。血漿画分中に存在するII及びPIは、約60kDa~約280kDaの見かけの分子量を有する。

10

20

## 【0057】

本明細書で使用される用語「IAIPリガンド」は、インビボ又はインビトロでIAIPに結合する分子又はその断片(例えば、エンドキシン(LPS)、ヘパリン、ヒストン、ヒアルロン酸、マトリクス細胞タンパク質(例えば、ビトロネクチン、フィブロネクチン、テネイシンC、ラミニン、アグリカン)、フォン・ヴィルブランド因子、ペントラキシン-3(PTX3)、TNF-刺激遺伝子-6(TSG-6)、凝固因子(例えば、因子IX及び因子XIIIa)、補体成分、Ca<sup>2+</sup>等の二価カチオン、及び組織トランスグルタミナーゼ)を指す。IAIPリガンドは、ドメイン構造に基づいて、IAIPに結合することが予想される分子(例えば、IAIP重鎖のフォン・ヴィルブランド因子Aドメインに結合するであろうRGDドメインを有するタンパク質)も含む。本明細書に記載される方法で使用されるIAIPリガンドは、IAIPの重鎖、IAIP複合体、又はIAIPのGAGに結合するリガンド(例えば、ビクニンのみには結合しないリガンド)を含む。

30

## 【0058】

本明細書で使用される用語「IAIP特異的抗体」又は「IAIPに特異的に結合する抗体」は、IAIPに結合可能であり、かついずれの他のタンパク質にも特異的に結合しない、免疫グロブリン分子の少なくとも一部分、例えば重鎖若しくは軽鎖の少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)若しくはそのリガンド結合部分、重鎖若しくは軽鎖可変領域、重鎖若しくは軽鎖定常領域、フレームワーク領域、又はそれらの任意の一部分を含む任意のタンパク質又はペプチド含有分子を指す。IAIPに特異的に結合する抗体は、IAIPに結合し、背景シグナル又はノイズの少なくとも2倍、より典型的には、背景の10~100倍のシグナルを提供するであろう。

40

## 【0059】

本明細書で使用される用語「モノクローナル抗体」は、任意の真核生物、原核生物、又はファージクローンを含む単一のクローンに由来する抗体を指し、それが産生される方法ではない。

## 【0060】

50

本明細書で使用される「医薬組成物」又は「医薬製剤」は、疾病の緩和、処置又は予防において薬理学的活性又は他の直接効果を有する組成物若しくは製剤、及び/又はその完成された剤形若しくは製剤である。組成物は、例えば、ヒト使用が指示されている（例えば、F・D・A及び/又はE・M・Aにより公布されたもの等の医薬又は生物学的ガイドラインに従って）。

**【0061】**

本明細書で使用される用語「薬学的に許容され得る」は、過剰な毒性、刺激作用、アレルギー応答、及び他の問題のある合併症を伴わない、理想的な利益/危険性の比に相当する、対象、例えば哺乳動物（例えば、ヒト）の組織と接触されるのに好適な化合物、材料、組成物及び/又は剤形を指す。

10

**【0062】**

本明細書で使用される表現「発症する可能性を低減する」は、本明細書に記載される特定の疾病、症候群若しくは状態（例えば、炎症性疾患又は感染症等の本明細書に記載する状態）が疑われる、若しくはさもなければその危険性を有する、又は現在の疾病、症候群若しくは状態の程度若しくは重症度が増大する危険性を有する患者（例えば、ヒト）、例えば、重症市中感染肺炎（sCAP）に進行する危険性を有する市中感染肺炎（CAP）を有する患者の予防的処置を指す。

**【0063】**

本明細書で使用される用語「参照」は、試験サンプル中のパラメータとの比較目的で使用されるサンプル又は標準のパラメータ（例えば、タンパク質レベル、濃度、核酸発現レベル、及び遺伝子コピー数）を指す。例えば、参照サンプルは、健常人（例えば、炎症性疾患又は感染症を有さない個人）から得ることができる。参照レベルは、1つ以上の参照サンプルから決定した分析物（例えば、タンパク質（例えば、IAIP）、核酸、炭水化物等）の発現又は濃度のレベル（又はその平均）であり得る。例えば、参照は、複数の個人（例えば、健常人、又は炎症性疾患若しくは感染症を有さない個人）間の分析物（例えば、IAIP）の平均レベル（例えば、平均レベル又は中央レベル）であり得る。他の場合、参照レベルは、例えば、別様に決定された、例えば実験的アッセイにより決定された分析物のレベル又は濃度に基づく所定の閾値レベルであり得る。

20

**【0064】**

本明細書で使用される用語「サンプル」は、対象（例えば、ヒト等の哺乳動物）から単離された標本（例えば、血液、血液成分（例えば、血清又は血漿）、尿、唾液、羊水、肺洗浄液（lung lavage）、脳脊髄液、組織（例えば、組織生検又は組織ホモジネート）、涙液、滑液、及び細胞）を指す。

30

**【0065】**

本明細書で使用される表現「特異的に結合する」は、タンパク質及び他の生物学的分子の異質集団における分析物（例えば、IAIP等のタンパク質）の存在の決定要因である結合反応を指す。分析物は、例えば、抗体又はその抗原結合断片によって認識される抗原であり得る。測定すべき分析物と結合剤（例えば、抗体若しくは抗原結合断片又はリガンド）との間の特異的結合は、100 nM未満の $K_D$ を示す。例えば、抗原（例えば、IAIP）に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片は、100 nMまで（例えば、1 pM ~ 100 nM）の $K_D$ で抗原に結合する。特定の抗原又はそのエピトープ（例えば、IAIP）に対する特異的結合を示さない抗体又はその抗原結合断片は、特定の抗原又はそのエピトープに対して100 nMを超える（例えば、500 nM、1  $\mu$ M、100  $\mu$ M、500  $\mu$ M、又は1 mMを超える） $K_D$ を示す。多様なイムノアッセイフォーマットを使用して、特定のタンパク質又は炭水化物と特異的な免疫反応性を有する抗体を選択することができる。例えば、固相ELISAイムノアッセイは、タンパク質又は炭水化物と特異的な免疫反応性を有する抗体を選択するのに日常的に使用されている。特異的な免疫反応性の決定に使用できるイムノアッセイフォーマット及び条件の説明に関しては、Harlow & Lane、Antibodies、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press、New York（1988

40

50

)及びHarlow & Lane、Using Antibodies、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press、New York (1999)を参照されたい。

【0066】

本明細書で使用される用語「敗血症」は、感染症に対する全身応答（本明細書で「感染性敗血症」と称する）又は急性組織傷害及び自然免疫活性化に関連した非感染性プロセス（本明細書で「無菌炎症」又は「無菌敗血症」と交換可能に称される）を指し、これは組織損傷、臓器不全、及び死をもたらし得る。感染性敗血症は、細菌、ウイルス、真菌、又は寄生虫（例えば、原生動物寄生虫）等の他の微生物を原因とする感染症によりもたらされ得る。無菌敗血症は、出血性ショック、多発外傷、膵炎、移植片拒絶、自己免疫性疾病、無機化合物、結晶、化学物質、又は虚血/再灌流の後に起こり得、既知の感染症の存在に関連するものではない。

10

【0067】

本明細書で使用される用語「対象」は、ヒト、又は、霊長類、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ネコ若しくはイヌ等の非ヒト哺乳動物を含むがこれらに限定されない哺乳動物を指す。対象は、患者であり得る。

【0068】

本明細書で使用される用語「処置する」は、疾病及び/又はそれに関連する症状を軽減し又は回復させることを指す。疾患又は状態の処置は、疾患又はそれに関連する症状が完全に排除される必要はないことが認識されるであろう。

20

【図面の簡単な説明】

【0069】

【図1】図1は、循環（例えば、血中）IAIP（IAI及びPAI）及び例えば尿中に排泄された遊離軽鎖（LC、ピクニン）の構造を概略的に示す。IAIPの重鎖及び軽鎖は、グリコサミノグリカン（GAG）によって一意に結合している。

【図2A】図2Aは、競合IAIP ELISAアッセイを概略的に示す。このアッセイでは、精製IAIPがマルチウェルプレート等の支持体に固定化され、次いでIAIPに指向される生物学的サンプル及び標識された抗体（例えば、MAb 69.26）が精製IAIPに加えられる。

【図2B】図2Bは、競合IAIP ELISAアッセイにより生成されたデータの標準曲線を示すグラフである。このアッセイは、サンプル中のIAIPと、固定化された精製IAIPとの間の競合抗体結合に基づいたIAIPの間接的測定を提供する。より低いシグナルは、サンプル中のより高い量のIAIPを示す。

30

【図3A】図3Aは、標識されたIAIPリガンド（例えば、ビオチン化ヘパリン又はLPS）を使用する「サンドイッチ型」ELISAと、前記ELISAを用いて生成された例示的な標準曲線を概略的に示す。このアッセイのバージョンでは、IAIPに特異的な抗体（例えば、MAb 69.26）が、マルチウェルプレート等の支持体に固定化され、次いで生物学的サンプルが、固定化された抗体を含む支持体に添加される。IAIPがサンプル中に存在する場合、IAIPは抗体に結合した後、標識IAIPリガンドの添加により検出されるであろう。

40

【図3B】図3Bは、各々、ヘパリン-IAIP及びエンドキシン（LPS）-IAIPサンドイッチ型ELISAに関する標準曲線を示すグラフである。このアッセイは、IAIP濃度の直接測定を提供し、シグナルの増大はサンプル中のIAIPのより高い濃度を示す。

【図3C】図3Cは、各々、ヘパリン-IAIP及びエンドキシン（LPS）-IAIPサンドイッチ型ELISAに関する標準曲線を示すグラフである。このアッセイは、IAIP濃度の直接測定を提供し、シグナルの増大はサンプル中のIAIPのより高い濃度を示す。

【図4】図4は、図2Aに示した競合ELISAを用いて得られたIAIP濃度の測定値を示すグラフである。IAIPは、入院中の連続日に重症市中感染肺炎（sCAP）を有

50

する患者由来の血漿サンプル中で測定され、正常な対照対象における I A I P レベルと比較した。競合 E L I S A は、s C A P を有する患者において  $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、健康な対照において  $330 \mu\text{g}/\text{mL}$  の平均 I A I P 濃度を提供し、0、1、及び3日目に、s C A P を有する対象と健康な対照との I A I P レベルの間に有意差が見出された。

【図5】図5は、図3Aに示した「サンドイッチ型」リガンド - I A I P E L I S A を用いて得られた I A I P 濃度の測定値を示すグラフである。図5に示す結果は、ヘパリンを I A I P リガンドとして使用して生成された。図4の競合 E L I S A を用いて評価されたものと同じサンプルを、このアッセイを用いて測定した。ヘパリン - I A I P E L I S A は、s C A P を有する患者において  $125 \sim 150 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、健康な対照において  $422 \mu\text{g}/\text{mL}$  の平均 I A I P 濃度を提供し、全時点で競合 E L I S A で観察された差よりも統計的に有意な、s C A P を有する対象と健康な対照との I A I P レベルの間の差が見出された。

10

【図6】図6は、図3Aに示した「サンドイッチ型」リガンド - I A I P E L I S A を用いて得られた I A I P 濃度の測定値を示すグラフである。図6に示す結果は、L P S を I A I P リガンドとして使用して生成された。図4の競合 E L I S A 及び図5のヘパリン - I A I P E L I S A を用いて評価されたものと同じサンプルを、このアッセイを用いて測定した。L P S - I A I P E L I S A は、s C A P を有する患者において  $118 \sim 145 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、健康な対照において  $338 \mu\text{g}/\text{mL}$  の平均 I A I P 濃度を提供し、全時点で競合 E L I S A で観察された差よりも統計的に有意な、s C A P を有する対象と健康な対照との I A I P レベルの間の差が見出された。L P S - I A I P E L I S A は、感度の増大、及び s C A P を有する対象と健康な対照との I A I P レベルの間のより測定可能な差の観点から、ヘパリン - I A I P E L I S A と同等に行われた。

20

【図7】図7は、I A I P に対するヘパリン及び I A I P 特異的抗体 ( M A b 69.26 ) の結合を示す一連のプロットである。中央のプロットに示すように、ビオチン化ヘパリンは精製 I A I P (  $250 \text{kDa}$  I I 及び  $125 \text{kDa}$  P I ) に結合したが、I A I P 軽鎖、ピクニン、又は陰性対照ヒト血清アルブミンに結合しなかった。対照的に、M A b 69.26 は、精製 I A I P 及びピクニンの両方に結合した。これらのデータは、ヘパリンが I A I P の重鎖に結合し、このことは、ヘパリン - I A I P E L I S A において、循環するインタクト I A I P のより正確な測定値をもたらし得ることを示唆する。

30

【図8A】図8A~8Cは、図2Aに示した競合 E L I S A 及び図3Aに示した「サンドイッチ型」リガンド - I A I P E L I S A を用いて得られた I A I P 濃度の測定値を示す一連のグラフである。I A I P は、重篤な肺炎、重篤な敗血症を有する患者、正常な対照対象由来の血漿サンプル中で測定した。下記に示す各グラフは、I A I P 濃度の平均  $\pm$  S E M 及び試験した患者サンプルの数 ( 括弧内 ) である。図8Aに示すように、競合 E L I S A は、重篤な肺炎を有する患者において  $246 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、重篤な敗血症を有する患者において  $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、及び健康な対照において  $330 \mu\text{g}/\text{mL}$  の平均 I A I P 濃度を提供し、重篤な肺炎を有する対象と健康な対照との I A I P レベルの間に有意差を見出したが、重篤な敗血症を有する対象と健康な対照との間には見出さなかった。

【図8B】図8A~8Cは、図2Aに示した競合 E L I S A 及び図3Aに示した「サンドイッチ型」リガンド - I A I P E L I S A を用いて得られた I A I P 濃度の測定値を示す一連のグラフである。I A I P は、重篤な肺炎、重篤な敗血症を有する患者、正常な対照対象由来の血漿サンプル中で測定した。下記に示す各グラフは、I A I P 濃度の平均  $\pm$  S E M 及び試験した患者サンプルの数 ( 括弧内 ) である。図8Bに示すように、L P S - I A I P E L I S A は、重篤な肺炎を有する患者において  $141 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、重篤な敗血症を有する患者において  $150 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、及び健康な対照において  $338 \mu\text{g}/\text{mL}$  の平均 I A I P 濃度を提供し、重篤な肺炎又は重篤な敗血症を有する対象と健康な対照との I A I P レベルの間の有意差を見出した。

40

【図8C】図8A~8Cは、図2Aに示した競合 E L I S A 及び図3Aに示した「サンドイッチ型」リガンド - I A I P E L I S A を用いて得られた I A I P 濃度の測定値を示

50

す一連のグラフである。I A I P は、重篤な肺炎、重篤な敗血症を有する患者、正常な対照対象由来の血漿サンプル中で測定した。下記に示す各グラフは、I A I P 濃度の平均  $\pm$  S E M 及び試験した患者サンプルの数（括弧内）である。図 8 C に示すように、ヘパリン - I A I P E L I S A は、重篤な肺炎を有する患者において  $145 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、重篤な敗血症を有する患者において  $193 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、及び健康な対照において  $422 \mu\text{g}/\text{mL}$  の平均 I A I P 濃度を提供し、重篤な肺炎又は重篤な敗血症を有する対象と健康な対照との I A I P レベルの間の有意差を見出した。L P S - I A I P E L I S A は、感度の増大を有する点でヘパリン - I A I P E L I S A と同等に行われ、競合 E L I S A と比較してより統計的に有意な結果を提供した。

【図 9】図 9 は、固定化された血漿由来 I A I P、ウシ血清アルブミン ( B S A )、及び I A I P 特異的抗体 M A b 69.26 の I g G に対するビオチン化 L P S の結合を示すヒストグラムである。L P S は I A I P に対する相当の結合を示し、M A b 69.26 には殆ど～全く結合せず、陰性対照として機能した。注目すべきことに、L P S は I A I P 軽鎖、ピクニンに対する結合を示さなかった。これは、I A I P の重鎖が L P S に対する結合を促進し得ることを示す。

【図 10】図 10 は、L P S、B S A、I A I P 特異的抗体 M A b 69.26 の I g G、及び無脂肪粉乳に対するビオチン化 I A I P の結合を示すヒストグラムである。予想通り、I A I P は M A b 69.26 及び L P S に結合し、B S A 及び無脂肪粉乳には最小限の結合を示した。これらのデータは、図 9 の結果を確認する。

【図 11】図 11 は、L P S、B S A、及び I A I P 特異的抗体 M A b 69.26 の I g G に対するビオチン化 I A I P の結合に対する pH の効果を示すヒストグラムである。これらのデータは、I A I P が pH 5 で最も強く L P S に結合し、p H 6 及び p H 7 では結合が低下し、p H 8 以上又は p H 4 以下では殆ど又は全く結合しないことを示す。対照的に、I A I P は p H 5 ~ p H 9 で M A b 69.26 の I g G に結合したが、p H 4 以下では結合しなかった。以前の実験におけるように、I A I P は B S A に結合しなかった。

【図 12】図 12 は、L P S、B S A、及び I A I P 特異的抗体 M A b 69.26 の I g G に対するビオチン化 I A I P の結合に対する塩 ( N a C l ) 濃度の効果を示すヒストグラムである。これらのデータは、L P S 及び M A b 69.26 の両方に対する I A I P の結合が塩による影響を受けなかったことを示し、強力かつ特異的な結合を示す。試験したいずれの塩濃度でも B S A に対する結合は観察されなかった。

【図 13】図 13 は、L P S、B S A、及び I A I P 特異的抗体 M A b 69.26 の I g G に対するビオチン化 I A I P の結合に対する非イオン性洗剤 N P - 40 の効果を示すヒストグラムである。L P S に対する I A I P の結合は 0.05% N P - 40 の添加により向上し、1% N P - 40 の存在下で尚観察され、強力な結合相互作用が示された。試験したいずれの N P - 40 濃度でも B S A に対する結合は観察されなかった。

【図 14】図 14 は、L P S、B S A、及び I A I P 特異的抗体 M A b 69.26 の I g G に対するビオチン化 I A I P の結合に対する非イオン性洗剤 T w e e n - 20 の効果を示すヒストグラムである。L P S に対する I A I P の結合は、0.05% T w e e n - 20 の添加により向上し、1% T w e e n - 20 の存在下で尚観察され、強力な結合相互作用が示された。試験したいずれの T w e e n - 20 濃度でも B S A に対する結合は観察されなかった。

【図 15 A - 15 B】図 15 A ~ 15 B は、初期症状における N E C ( n = 14 ) 及び S I P ( n = 13 ) を有する乳児と、性別、体重及び妊娠期間一致健康対照 ( n = 26 ) との血液 I A I P レベル ( 図 15 A ) 及び C R P ( 図 15 B ) を示すヒストグラムである。I A I P レベルの低下は、証明された N E C を有する乳児 ( 平均  $\pm$  S D :  $139 \pm 21 \mu\text{g}/\text{mL}$  ) に見出された一方、健康な対照 (  $276 \pm 110 \mu\text{g}/\text{mL}$  ) 又は S I P を有する乳児 (  $319 \pm 72 \mu\text{g}/\text{mL}$  ) におけるレベルは、有意により高かった ( p < 0.05 及び p < 0.005 )。対照的に、S I P を有する乳児と対照における I A I P の間に統計的有意差はなかった ( p > 0.4 )。C R P レベルが試験された際、S I P、N E

10

20

30

40

50

C及び対照群の間で有意差は見出されなかった ( $p > 0.05$ )。

【図16A】図16A～16Bは、NEC乳児におけるIAIP及びCRPのROC曲線を示すグラフである。IAIPレベルの予測値は、感度100%、特異性88.2%、PPV 41%及びNPV 100%であり(図16A)、感度100%、特異性64.7%、PPV 18%及びNPV 98%のCRP(図16B)と比較して優れている。

【図16B】図16A～16Bは、NEC乳児におけるIAIP及びCRPのROC曲線を示すグラフである。IAIPレベルの予測値は、感度100%、特異性88.2%、PPV 41%及びNPV 100%であり(図16A)、感度100%、特異性64.7%、PPV 18%及びNPV 98%のCRP(図16B)と比較して優れている。

【図17】図17は、NEC ( $n = 8$ )及びSIP ( $n = 9$ )を有する乳児における血漿IAIPレベルの長期的研究の結果を示すグラフである。疾病症状の発症の前後に血液を連続的に採取した。IAIPレベルの有意差は、疾患発症前にSIPとNECの両方の乳児群で見出されなかったが ( $p$  値  $> 0.6$ )、NECの乳児のIAIPレベルは、発症後10日までSIPの乳児のレベル ( $p < 0.04$ )と比較して有意に低かった。

【図18】図18は、側方流動イムノアッセイに基づくIAIP迅速試験の概略図である。

【図19】図19は、ESEQuantリーダーを用いた迅速IAIP試験の標準曲線を示すグラフである。各点の値を合計13の独立解析の平均+SDとしてプロットした。迅速試験標準曲線は、 $17.5 \sim 1100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲のIAIPレベルの血漿サンプルに適している。

【図20A】図20A～20Cは、ESEQuantリーダー、Detektリーダー、iCalQリーダーを用いるIAIP迅速試験によって得られた結果と、確立された競合ELISAフォーマットによって得られた結果との間の相関を示す一連のグラフである。

【図20B】図20A～20Cは、ESEQuantリーダー、Detektリーダー、iCalQリーダーを用いるIAIP迅速試験によって得られた結果と、確立された競合ELISAフォーマットによって得られた結果との間の相関を示す一連のグラフである。

【図20C】図20A～20Cは、ESEQuantリーダー、Detektリーダー、iCalQリーダーを用いるIAIP迅速試験によって得られた結果と、確立された競合ELISAフォーマットによって得られた結果との間の相関を示す一連のグラフである。

【図21A】図21A～21Bは、ヒアルロン酸を96ウェルプレート上に固定化してIAIPを捕捉し、ビオチン結合MAb 69.26 (ヒトIAIPに対するモノクローナル抗体)を用いてIAIPを検出する「サンドイッチ型」ELISAを用いたIAIPの定量化を示す一連のグラフである。このアッセイは、ウェル当たり50ng、100ng又は200ngのヒアルロン酸を用いて、ヒト血漿(図21A)及び精製IAIP(図21B)の両方の系列希釈におけるIAIPを定量化するために使用することができる。

【図21B】図21A～21Bは、ヒアルロン酸を96ウェルプレート上に固定化してIAIPを捕捉し、ビオチン結合MAb 69.26 (ヒトIAIPに対するモノクローナル抗体)を用いてIAIPを検出する「サンドイッチ型」ELISAを用いたIAIPの定量化を示す一連のグラフである。このアッセイは、ウェル当たり50ng、100ng又は200ngのヒアルロン酸を用いて、ヒト血漿(図21A)及び精製IAIP(図21B)の両方の系列希釈におけるIAIPを定量化するために使用することができる。

【発明を実施するための形態】

【0070】

サンプル中のIAIPの量を測定するために使用できる試薬(例えば、サンプル中のIAIPに直接結合する試薬、例えばIAIPリガンド、又はIAIPに結合したIAIPリガンドに結合する試薬)を使用して、サンプル(例えば、血液サンプル等の対象由来のサンプル)中のIAIP濃度を測定する方法を特徴とする。試薬は、検出可能な標識を用いて測定することができる。方法は、炎症性疾患若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を有する対象を特定するため、対象の健康状態又は対象における疾患重症度を決定するため、及び治療薬(例えば、IAIP、又は炎症性疾患若しくは状態又は感染症

10

20

30

40

50

を治療するための薬剤)を投与された対象における状態(例えば、炎症性疾患若しくは状態又は感染症)の処置を監視するために使用され得る。

【0071】

I A I Pの定量化のためのアッセイ

対象から収集したサンプル中のI A I Pの定量化方法を提供する。I A I Pを検出する従来の方法は、サンプル中のI A I P濃度の間接的測定を提供する抗体ベースの競合E L I S Aに依存していた。この方法は、インタクトI A I P複合体(例えば、1つ以上の重鎖(H 1 - H 5)及び軽鎖、ビクニンを含むI A I P)及びビクニン単独の両方を検出する。対照的に、本明細書に記載される方法は、I A I P重鎖、インタクトI A I P複合体の重鎖及び軽鎖、又はI A I P複合体のG A Gに結合するが、ビクニン単独には結合しないことによって、サンプル中のI A I Pを直接検出する試薬(例えば、I A I Pリガンド)を使用する。

10

【0072】

理論に束縛されることを望まないが、本明細書に記載されるI A I Pリガンドベースのアッセイは、I A I P重鎖又はインタクトI A I P複合体の検出により、競合E L I S Aよりも高い感度及び頑強性を示す。本方法は、切断又は分解されたI A I P軽鎖を検出する抗体ベースのアッセイと比較してサンプル中の機能的I A I Pの量の改善された読み出しを提供する。

【0073】

本明細書に記載される方法は、例えば、抗体等のI A I P特異的薬剤を使用した、例えば、基質(例えば、固体支持体、例えば、プレート、樹脂、粒子、容器、膜、又はビーズ)上に補足されたI A I Pを検出するためのI A I Pリガンドの使用、続くI A I P特異的抗体を用いた検出のための、I A I Pを補足するI A I Pリガンドの使用、及び続く第2の、異なるI A I Pリガンドを用いた検出のための、I A I Pを補足するI A I Pリガンドの使用を含む。

20

【0074】

サンプル中のインタクトI A I Pの検出に使用できる第1の方法は、支持体に付着され、サンプル中のI A I Pの補足に使用されるI A I P結合剤(例えば、I A I P特異的抗体又はI A I Pリガンド)を含む。次いで、I A I P結合剤と複合体を形成しているI A I Pに結合するI A I P検出剤(例えば、I A I Pリガンド又はI A I P特異的抗体)が

30

【0075】

サンプル中のI A I Pの量の検出に使用できる第2の方法は、インビボで形成され、サンプル中に存在するI A I P - I A I Pリガンド複合体の検出を含む。この方法も又、支持体に付着した結合剤の使用から開始する。結合剤は、I A I P又はI A I Pリガンドのいずれかに結合し得る。次いで、検出剤が添加され、検出剤はI A I P - I A I Pリガンド複合体の他の成分に結合する(例えば、結合剤がI A I Pに指向される場合、検出剤はI A I Pリガンドに指向され、逆に、結合剤がI A I Pリガンドに指向される場合、検出剤はI A I Pに指向される)。次いで、例えば、検出剤に直接又は間接的に不着した標識

40

【0076】

方法及び方法ステップに使用される試薬は、下記に詳細に説明される。

【0077】

I A I Pリガンド

本明細書に記載される方法で使用されるI A I Pリガンドは、1つ以上のI A I P重鎖、I A I P重鎖及び軽鎖、ビクニン(例えば、インタクトI A I P)、又はI A I PのG A G(例えば、インタクトI A I PのG A G)に結合するリガンドを含む。インタクトI A I Pは、少なくとも1つのI A I P重鎖(H 1、H 2、H 3、H 4、及び/又はH 5)及びI A I P軽鎖(ビクニン)を含む複合体である。例えば、エンドキシシン(リボ多糖

50

、LPS)、ヘパリン、ヒストン、ヒアルロン酸、ビトロネクチン、フィブロネクチン、テネシシンC、ラミニン、アグリカン、フォン・ヴィルブランド因子、ペントラキシン-3 (PTX3)、TNF-刺激遺伝子-6 (TSG-6)、凝固タンパク質(例えば、因子IX及び因子XIIIa)、補体タンパク質(例えば、C1q、C2、C3、C4、C5、C6、C8、プロパージン、及び因子D)、二価カチオン(例えば、 $Ca^{2+}$ )、及び組織トランスグルタミナーゼを含む、IAIP又はインタクトIAIPの重鎖に結合する任意のリガンドを、本明細書に記載される方法に使用することができる。IAIPリガンドは、当該技術分野で既知の標準的な技術に従って標識され得る(例えば、1つ以上の、下記に詳細する検出可能な標識を使用して)。

#### 【0078】

##### IAIP抗体

IAIPに特異的に結合する抗体は、本明細書に記載される方法における結合剤又は検出剤として使用することができる。IAIPに特異的に結合する抗体は、IAIP以外のいずれのタンパク質にも特異的に結合しない抗体又はその抗原結合断片である(例えば、IAIP特異的抗体と非-IAIPタンパク質との相互作用は、背景に類似したシグナルを生じる)。IAIPに特異的に結合する抗体は、IAIPの重鎖、IAIPの軽鎖、又は両方、又はIAIPのGAGに結合することができる。抗体は、IAIPの重鎖又は重鎖及び軽鎖を含むインタクトIAIPに結合することが好ましい。抗体は、ヒトIAIP、又は他の哺乳動物(例えば、非-ヒト霊長類、雌牛、豚、羊、山羊、猫、犬、ラット、マウス、兎、モルモット、又はIAIPを発現する任意の他の非-ヒト哺乳動物)由来のIAIPに対して生じ得る。IAIPに特異的に結合する抗体は、ヒトIAIPのみに結合し得、又はヒト及び他の哺乳動物由来のIAIPに結合することが可能であり得る。抗体は、IAIPを用いて抗体を生成するのに一般に使用される動物(例えば、兎、モルモット、ラット、マウス、羊、ロバ、山羊、ハムスター、及び鶏)の免疫化により産生され得る。IAIP特異的抗体は、ポリクローナル(例えば、PAb R16、PAb R20、PAb R21)、モノクローナル(例えば、MAb 69.26又はMAb 69.31)、キメラ、又は組換えであり得る。

#### 【0079】

##### 標識

本明細書に記載される方法におけるIAIPの濃度を検出するための標識は、IAIPリガンド、IAIP特異的抗体、又は本明細書に記載される他の試薬に付着し又はコンジュゲートされ得る。IAIPリガンド、IAIPリガンド特異的抗体、及び/又はIAIP特異的抗体の検出に好適な標識としては、ビオチン、酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ(AP)、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ及びカタラーゼ)、酵素基質、放射標識(例えば、放射性同位元素)、発光化合物、粒子(例えば、コロイド金(例えば、金ナノ粒子)、磁粒子、又はラテックス粒子)及び蛍光染料が挙げられる。次いで、標識は、直接評価され得(例えば、蛍光染料のイメージング、放射能の検出、又は粒子の検出を介して)、酵素-コンジュゲート化アビジン又はストレプトアビジン(例えば、ビオチン検出のためにAP又はHRPにコンジュゲートされたアビジン又はストレプトアビジン)の使用を介して、及び/又は基質の使用を介して、そして、例えば、分光光度計、蛍光光度計、ルミノメーター、又は液体シンチレーションカウンターを含む既知の方法及び装置によって可視化され得る。基質は、発色性(例えば、AP検出のためのPNPP;又はHRP検出のためのABTS、OPD、若しくはTMB)、化学発光性、又は蛍光性であり得る。基質は、放射能の検出のための液体シンチレーターも含む。当該技術分野で既知の標準的な検出方法を用いて、本明細書に記載される標識を検出することができる。

#### 【0080】

##### サンプル

本明細書に記載される方法は、対象(例えば、ヒト対象)由来のサンプルを使用して行うことができる。好適なサンプルは、流体サンプルを含む。例えば、IAIPは、対象(

10

20

30

40

50

例えば、炎症性疾患若しくは敗血症等の状態を有する対象、又は炎症性疾患若しくは敗血症等の状態を発症する危険性を有する対象)由来の血液又は血漿のサンプル中で測定され得る。本明細書に記載される方法は、尿、脳脊髄液、滑液、羊水、間質液、卵胞液、腹水、気管支肺胞洗浄液、母乳、痰、リンパ液、及び胆汁等の他の体液のサンプルを使用して行うこともできる。対象由来の組織サンプル(例えば、生検)を適切な緩衝液中でホモジナイズして、これらの方法を用いた I A I P の定量化のための「流体」を形成することができる。

#### 【0081】

アッセイに使用するサンプルの容積は、行うアッセイ(例えば、E L I S A、側方流動イムノアッセイ、又は他のアッセイ)及び支持体(例えば、プレート、膜、試験片、又は他の支持体)のタイプに応じて変動するであろう。使用するサンプルの容積は、約  $1 \mu\text{L}$  ~ 約  $500 \mu\text{L}$  (例えば、側方流動イムノアッセイ等のアッセイの場合、約  $1 \mu\text{L}$  ~ 約  $150 \mu\text{L}$ 、例えば、 $1 \mu\text{L}$  ~ 約  $30 \mu\text{L}$ 、又は E L I S A 等のアッセイの場合、約  $50 \mu\text{L}$  ~ 約  $200 \mu\text{L}$ ) であり得る。サンプルは、アッセイで使用する前に、結合剤又は検出剤に対する結合を妨害しないであろう緩衝液(例えば、水、P B S、又はアッセイの方法に使用される緩衝液)で希釈され得、1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5、1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 100 以上に希釈され得る。

#### 【0082】

##### インタクト I A I P の検出方法

第1の I A I P 定量化アッセイは、I A I P を含むサンプルを I A I P 結合剤(例えば、I A I P に特異的に結合する抗体又は I A I P リガンド)と接触させて、I A I P - 結合剤複合体を形成することを含む。I A I P 結合剤は、支持体(例えば、固体支持体)に付着され得る。好適な支持体としては、プレート(例えば、マルチウェルプレート)、粒子(例えば、磁気粒子、ナノ粒子、磁気ナノ粒子)、バイオチップ、樹脂、膜(例えば、ニトロセルロース膜、P V D F 膜)、容器(例えば、チューブ)、試験片(例えば、セルロース、ガラス繊維、ニトロセルロース)、及びビーズ(例えば、タンパク質 A 又はタンパク質 G ビーズ、磁気ビーズ、ガラスビーズ、プラスチックビーズ)が挙げられる。支持体は、好ましくは、1 回以上洗浄されて(例えば、T B S、T B S - T、P B S、又は P B S - T 等の緩衝液を使用して)、I A I P 結合剤と結合しない材料を除去することが可能である。

#### 【0083】

次いで、I A I P - 結合剤複合体を I A I P 検出剤(例えば、I A I P リガンド又は I A I P に特異的に結合する抗体)と接触させる。I A I P 検出剤は、標識(例えば、上述した標識の1つ以上)とコンジュゲートされ得、次いでこれは既知の検出方法を用いて検出され得る。あるいは、I A I P 検出剤は、標識を使用することなく直接検出されてもよい。I A I P 検出剤の添加後、追加の洗浄ステップ(例えば、1つ以上の)を行って非結合検出剤を除去してもよい。

#### 【0084】

次いで、I A I P は、コンジュゲート化標識又は付着検出剤(例えば、酵素活性又は蛍光)からのシグナルに基づいて、当該技術分野で既知の標準技術を用いて測定され得る。酵素が標識として使用される場合、基質が添加されてシグナル(例えば、色変化)を生成し得、シグナルの検出に好適な装置、例えば分光光度計により読み取られ得る。シグナル(例えば、吸光度又は蛍光)を、既知の I A I P 濃度を有する標準に対してプロットして標準曲線を確認し得、又は既知の参照濃度と比較し得る。サンプル中の未知の濃度を、確立された標準曲線又は参照濃度値に基づいて計算及び決定し得る。

#### 【0085】

サンプルを I A I P 結合剤に添加する前に、ブロッキングステップを行って非特異的結合を防止又は低減してもよい。本明細書に記載される方法で使用されるブロッキング剤としては、中でも例えば、乳、B S A、カゼイン、ゼラチン(例えば、魚ゼラチン)、及び血清(例えば、山羊血清、ロバ血清、馬血清、ウシ胎児血清)が挙げられる。

## 【0086】

方法ステップは、pH 7.0 ~ 3.5 (例えば、pH 5.0 ~ pH 3.5、例えば、pH 4.0)で行うことができる。例えば、結合ステップ及び検出ステップのいずれか又は両方は、pH 7.0 ~ 3.5 (例えば、pH 5.0 ~ pH 3.5、例えば、pH 4.0)で行うことができる。IAIP結合剤は、pH 7.0 ~ 3.5 (例えば、pH 5.0 ~ pH 3.5、例えば、pH 4.0)の緩衝液中で調製することができ、及び/又はIAIP検出剤(例えば、IAIPリガンド)は、pH 7.0 ~ 3.5 (例えば、pH 5.0 ~ pH 3.5、例えば、pH 4.0)の緩衝液中で調製することができる。IAIPの検出を改善するために、低いpH緩衝液(例えば、pH 5.0以下、例えば、pH 4.0)を使用することができる。

10

## 【0087】

又、アッセイ中にIAIPを安定化するために、二価カチオン(例えば、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>等)を、IAIP結合剤と接触させる前若しくは間にサンプルに添加し、及び/又は、結合剤-IAIP複合体と接触させる前若しくは間に、検出剤を含む緩衝液に添加してもよい。二価カチオンは、1 μM ~ 1 M (例えば、100 μM ~ 100 mM、1 mM ~ 10 mM)の濃度で提供され得る。

## 【0088】

## a) IAIP特異的抗体結合剤及びIAIPリガンド検出剤

本明細書に記載される方法の一例では、IAIP結合剤は、IAIPに特異的に結合する抗体(例えば、MAb 69.26又はMAb 69.31)であり、検出剤は、標識されたIAIPリガンド(例えば、ヘパリン、ヒアルロン酸、又はLPS)である。あるいは、リガンドは標識されず、IAIPリガンドに特異的な標識抗体を使用して検出されてもよく、又は非標識リガンドはIAIPリガンドに特異的な非標識抗体を使用して検出されてもよく、これは次いで標識2次抗体(例えば、IAIPリガンドに特異的であるがIAIP抗体には結合しない抗体に結合する標識2次抗体、例えば、IAIP抗体及びIAIPリガンド抗体は、異なる宿主種から産生される)を使用して検出される。リガンドが非標識であり、標識リガンド特異的抗体、又はリガンド特異的抗体及び標識2次抗体の使用により検出される場合、各抗体とのインキュベーションの前及び/又は後に、追加の洗浄ステップが行われ得る。

20

## 【0089】

## b) IAIPリガンド結合剤及びIAIP特異的抗体検出剤

本明細書に記載される方法の別の例では、IAIP結合剤は、IAIPリガンド(例えば、ヘパリン、ヒアルロン酸、又はLPS)であり、検出剤は、IAIPに特異的な抗体(例えば、MAb 69.26又はMAb 69.31)である。この例では、IAIPに特異的な抗体は、標識に直接コンジュゲートされてもよく、又は抗体は、IAIP特異的抗体に結合する標識2次抗体を使用して検出されてもよい。標識2次抗体が使用される場合、2次抗体とのインキュベーション後に洗浄ステップが行われて、IAIP測定に先立って非特異的シグナルを最小限にし得る。

30

## 【0090】

## c) IAIPリガンド結合剤及びIAIPリガンド検出剤

本明細書に記載される方法の第3の例では、結合剤はIAIPリガンド(例えば、ヒアルロン酸)であり、検出剤は、IAIPの異なる領域に結合する標識されたIAIPリガンド(例えば、ヘパリン、ヒアルロン酸、又はLPS)である。この方法は、IAIPの同じ領域に結合しない任意の2つのIAIPリガンドを用いて行われ得る(例えば、2つのIAIPリガンドIAIPに対する結合に関して競合しない、又は、当該2つのIAIPリガンドに関して、IAIPリガンドのうちの1つの結合が、IAIPに対する第2のIAIPリガンドの結合を立体的に妨害しない)。IAIP検出剤として作用するリガンドは、非標識であってもよく、検出剤として作用するIAIPリガンドに特異的な標識抗体を使用して検出され、又は当該リガンドは、検出剤として作用するIAIPリガンドに特異的な非標識抗体に結合する標識2次抗体によって検出されてもよい。検出剤として作

40

50

用する I A I P リガンドの検出に標識抗体が使用される場合、各抗体とのインキュベーションの前及び / 又は後に、追加の洗浄ステップを行い得る。

【 0 0 9 1 】

d) I A I P 特異的抗体結合剤及び I A I P 特異的抗体検出剤

本明細書に記載される方法の第 4 の例では、結合剤は I A I P 特異的抗体であり、検出剤は標識 I A I P 特異的抗体である。この例では、I A I P 特異的抗体の少なくとも 1 つは、インタクト I A I P 又は少なくとも 1 つの重鎖を含む I A I P のいずれかに結合することが可能である (例えば、抗体は、少なくとも 1 つの I A I P 重鎖が存在しない限りピクニンに結合せず、例えば、抗体は、ピクニンを欠く切断又は分解した I A I P に結合しない)。又、アッセイで使用される 2 つの I A I P 特異的抗体は、I A I P の異なるエピトープに結合する (例えば、抗体は、I A I P の結合に関して競合しない)。2 つの I A I P 特異的抗体が異なる宿主種を使用して産生された場合、検出剤として使用される I A I P 特異的抗体は、非標識であり得、標識 2 次抗体を使用して検出される。標識 2 次抗体が使用される場合、標識 2 次抗体のインキュベーションの前及び / 又は後に、追加の洗浄ステップを行い得る。

10

【 0 0 9 2 】

e) 迅速側方流動イムノアッセイ ( L F I A ) を用いる I A I P の定量化

第 5 の例で、本明細書に記載される方法は、側方流動イムノアッセイベースの試験を用いて行うことができる。この例では、少量のサンプル (例えば、1 ~ 30  $\mu$  L、例えば、15  $\mu$  L) を試験片 (例えば、セルロース、ガラス繊維、又はニトロセルロース) に非希釈形態又は希釈形態で (例えば、例えば、緩衝液 (例えば、P B S) 又は水で 1 : 2、1 : 5、1 : 10、1 : 20、1 : 100 以上希釈する) 適用し得、次いで緩衝液を加えて、試験片を通してサンプルを押し出す。試験片は、サンプル中の I A I P に結合する I A I P 結合剤 (例えば、I A I P 特異的抗体又は I A I P リガンド) を含む。I A I P は I A I P 検出剤 (例えば、標識 I A I P 特異的抗体又は標識 I A I P リガンド) を使用して検出することができ、当該 I A I P 検出剤は、サンプルの添加の前、後、又は同時に、試験片に添加され得る。試験片は、I A I P 検出剤に付着した標識の定量化のための適切なリーダー (例えば、中でも携帯型卓フローリーダー、ハンドル付きの P D A ベースのリーダー、又はスマートフォン / タブレットベースのリーダー) を使用して読み出され得る。結合剤と検出剤との組み合わせは、本明細書に概略するパラメータに基づいて選択され得る。このアッセイは、迅速に (例えば、15 分以下、例えば 15、10、又は 7 分間以下で) 行われ、少量のサンプルの定量的かつ迅速な測定を提供することができる。

20

30

【 0 0 9 3 】

天然に存在する I A I P - I A I P リガンド複合体の検出

天然に存在する I A I P - I A I P リガンド複合体 (例えば、対象 (例えば、ヒト対象) 内でインビボで形成され、対象由来のサンプル中に存在する I A I P - I A I P リガンド複合体) を検出する方法も提供する。この方法は、サンプル (例えば、血漿、血清、血液、肺胞洗浄液、脳脊髄液、痰、尿又は他の体液等の流体サンプル) を結合剤、例えば、支持体 (例えば、固体支持体) に付着された結合剤と接触させることを含む。結合剤は、I A I P 結合剤 (例えば、I A I P に特異的に結合する抗体、例えば、M A b 69.26 又は M A b 69.31、又は I A I P リガンド) であってもよく、又は結合剤は、関心対象の I A I P に特異的に結合する抗体リガンド (例えば、インビボで I A I P - I A I P リガンド複合体を形成したことが疑われる I A I P リガンド) であってもよい。好適な支持体としては、プレート (例えば、マルチウェルプレート)、粒子 (例えば、磁気粒子、ナノ粒子、磁気ナノ粒子)、バイオチップ、樹脂、容器 (例えば、チューブ)、膜 (例えば、ニトロセルロース膜、P V D F 膜)、試験片 (例えば、セルロース、ガラス繊維、又はニトロセルロース) 及びビーズ (例えば、タンパク質 A 又はタンパク質 G ビーズ、磁気ビーズ、ガラスビーズ、プラスチックビーズ) が挙げられる。支持体は、好ましくは、1 回以上洗浄されて (例えば、T B S、T B S - T、P B S、又は P B S - T 等の緩衝液を使用して)、結合剤に結合しない材料を除去することが可能である。

40

50

## 【0094】

アッセイで使用される結合剤が I A I P 結合剤（例えば、I A I P に特異的に結合する抗体、例えば、M A b 69.26 又は M A b 69.31、又は I A I P リガンド）の場合、I A I P - I A I P リガンド複合体は、関心対象の I A I P リガンドに対して指向される抗体である検出剤を使用して、抗体を I A I P 複合体 - 結合剤複合体と接触させることにより検出され得る。アッセイで使用される結合剤が、関心対象の I A I P に特異的に結合する抗体リガンドの場合、I A I P - I A I P リガンド複合体は、I A I P に特異的に結合する検出剤（例えば、I A I P に特異的に結合する抗体、例えば、M A b 69.26 又は M A b 69.31、又は異なる I A I P リガンド）を使用して、検出剤を I A I P 複合体 - 結合剤複合体と接触させることにより検出され得る。

10

## 【0095】

洗浄ステップ（例えば、1回以上の）は、検出剤とのインキュベーション後に行うことができる。又、サンプルを I A I P 又は I A I P リガンド結合剤に添加する前に、ブロッキングステップを行って非特異的結合を防止又は低減してもよい。本明細書に記載される方法で使用されるブロッキング剤としては、中でも、例えば、乳、B S A、カゼイン、ゼラチン（例えば、魚ゼラチン）、及び血清（例えば、山羊血清、ロバ血清、馬血清、ウシ胎児血清）が挙げられる。

## 【0096】

検出剤が抗体（例えば、I A I P 特異的抗体又は I A I P リガンド特異的抗体）の場合、検出剤は標識（例えば、上述した標識）に直接コンジュゲートされてもよく、又は検出剤は、アッセイで使用される任意の他の抗体に結合しない標識 2 次抗体（例えば、抗体の場合、結合剤）を添加することにより可視化されてもよい。

20

## 【0097】

検出剤が、リガンド（例えば、I A I P リガンド、例えばアッセイにて検出されるものとは異なる I A I P リガンド等）の場合、検出剤は標識（例えば、上述した標識）に直接コンジュゲートされてもよく、又は標識されたリガンド特異的抗体を使用して検出され、この標識リガンド特異的抗体は、次いで検出される。あるいは、検出剤は、非標識リガンド特異的抗体と、アッセイに使用される任意の他の抗体に結合しない標識 2 次抗体（例えば、抗体の場合、結合剤）とを使用して検出され得る。検出剤が非標識であり、追加の試薬（例えば、標識 1 次又は 2 次抗体）が使用される場合、追加の試薬とのインキュベーション後に 1 回以上の洗浄ステップを行って、非特異的シグナルを最小限にし得る。標識は、上述したものと同一基質及びイメージング方法を使用した、I A I P - I A I P リガンド複合体の濃度の測定に使用され得る。サンプルからのシグナルを、既知の濃度の I A I P - I A I P リガンド複合体を有するサンプルで測定されたシグナルと比較し得る（例えば、標準曲線を確立するために）。サンプルにおける未知の濃度は、確立された標準曲線に基づいて、又は既知の参照濃度値に基づいて計算することができる。

30

## 【0098】

I A I P - I A I P リガンド複合体中の I A I P リガンドのアイデンティティが未知の場合、I A I P に特異的に結合する抗体（例えば、インタクト I A I P 及び / 又は I A I P 重鎖に結合する抗体）を結合剤として使用方法を行うことができる。次いで、異なる I A I P リガンドに特異的な標識 2 次抗体を添加し、標識 2 次抗体とのインキュベーション後に洗浄し、標識からのシグナルを検出して I A I P - I A I P リガンド複合体中の I A I P リガンドのアイデンティティを決定することにより、検出ステップを行うことができる。標識抗体は、I A I P リガンドの特定に関して個々に添加及び評価されてもよく、又は、異なる標識が各抗体に付着若しくはコンジュゲートされる場合（例えば、異なる蛍光染料）、同時に添加されてもよい。一旦 I A I P リガンドが特定されたら、サンプル中の I A I P - I A I P リガンド複合体の量を本明細書に記載される通りに定量化することができる。

40

## 【0099】

アッセイで補足された I A I P の定量化

50

IAIP又はIAIP-IAIPリガンド複合体は、標準曲線の形成に使用される既知の量のIAIP又はIAIP-IAIPリガンド複合体を含むサンプルと共に、関心対象のサンプルを使用して本明細書に記載される検出方法を行うことにより定量化することができる。対象由来のサンプルは、サンプル中のIAIP又はIAIP-IAIPリガンド複合体の濃度が測定できるように、既知の量のIAIP又はIAIP-IAIPリガンド複合体と同時に測定されてもよい。対象由来のサンプル中の濃度を、対照集団、例えば健康な対照において同じアッセイを用いて測定したIAIP又はIAIP-IAIPリガンド複合体の平均濃度と比較して、サンプル中のIAIPの濃度が正常範囲内、又は疾病対照に含まれるか否かを決定し、サンプル中のIAIPの濃度が疾病状態の範囲内に含まれるか否かを決定することができる。

10

## 【0100】

対象由来のサンプル中のIAIP又はIAIP-IAIPリガンド複合体の濃度は又、試験サンプル及び対照サンプルの両方におけるIAIP又はIAIP-IAIPリガンド複合体を、本明細書に記載される方法を用いて同時に測定することにより、健康な対照におけるIAIP又はIAIP-IAIPリガンド複合体の濃度と比較することができる。対照サンプルは、同じ原材料に由来するものを含む（例えば、試験サンプル及び対照サンプルの両方は、同じ体液又は同じ組織タイプに由来する）。同じ原材料に由来することに加えて、試験サンプル及び対照サンプルは、同じ年齢及び/又は同じ性別の対象から収集して、対象間の可能な変動を最小限にすることもできる。IAIP濃度が対象と健康な対照との間で直接比較される場合、健康な対照と比較した対象におけるIAIP濃度の25%位以上の低下は、対象が炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を有することを示すであろう。

20

## 【0101】

あるいは、対象由来のサンプル中のIAIP又はIAIP-IAIPリガンド複合体の濃度は、既知の状態（例えば、健康な状態又は疾病状態）下のIAIP又はIAIP-IAIPリガンド複合体の濃度に関する所定のカットオフ値と比較してもよい。カットオフ値は、正常な対象又は疾病対象の集団から決定した、IAIP又はIAIP-IAIPリガンド複合体の平均濃度であり得る。

## 【0102】

本明細書に記載される方法を用いて、健康な対照対象は、血漿中に $400 \pm 140 \mu\text{g}/\text{mL}$  IAIPを有することが見出されているが、より高い濃度も健康な対象で観察されている。重篤な炎症性疾病を有する対象は、約 $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 未満のIAIPの平均濃度を有することが見出されている。約 $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ のIAIP濃度を使用して、疾病又は状態（例えば、炎症性疾病若しくは状態又は感染症）を有し又は発症する危険性を有するとして対象を分類することができる。次いでこの分類を用いて対象に処置又は更なる診断試験を推奨することができる。中～低いIAIPレベル（例えば、 $300 \sim 200 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）を有する対象は、IAIPレベルが一定であるか又は変化しているか（例えば、増大又は低下している）を決定する経時的な反復試験（例えば、週に1回、月に2回、月に1回、2カ月に1回、年に3回、又は2年に1回）から利益を受けることができ、それは、これらのレベルが、炎症性疾病若しくは状態又は感染症を発症する危険性、炎症

30

40

## 【0103】

IAIP及びIAIP-IAIPリガンド複合体検出アッセイを用いた疾病状態又は疾病の危険性の決定方法

本明細書に記載されるIAIP及びIAIP-IAIPリガンド複合体検出方法は、多様な対象、例えば疾病又は状態（例えば、炎症性疾病若しくは状態又は感染症（例えば、細菌感染症））を有する、又は有することが疑われる対象のIAIP及び/又はIAIP-IAIPリガンド複合体の測定に使用することができる。例えば、対象における疾病若しくは状態の存在、又は対象が疾病若しくは状態を発症している若しくは発症しうる危険

50

性の診断、又は疾病若しくは状態の発症若しくは分析に関する対象のモニタリングのために、そのような対象における I A I P 及び I A I P - I A I P リガンド複合体のレベルを、上記のアッセイのいずれかを用いて評価することができる。

#### 【0104】

例えば、アッセイ方法を用いて診断又は監視できる炎症性疾患又は状態としては、例えば、急性炎症性疾患、敗血症、敗血性ショック、全身炎症性応答症候群 (SIRS)、外傷及び/又は傷害 (例えば、創傷、やけど、断裂、挫傷、骨折、外科手技)、卒中 (例えば、虚血性卒中、出血性卒中)、急性肺傷害、急性呼吸促迫症候群 (ARDS)、肺炎 (例えば、重篤な肺炎、重症又は非重症：市中感染肺炎、院内感染肺炎、ナーシングホーム感染肺炎)、壊死性腸炎、急性膵炎、腎疾患 (例えば、急性腎臓傷害、肝臓傷害、急性循環不全)、子癇前症、癌、癌転移、腫瘍浸潤、末梢血管疾患、1型又は2型糖尿病、アテローム硬化性心血管系疾患、間欠性跛行、重症虚血肢疾患、心筋梗塞、頸動脈閉塞、臍帯閉塞、低出生体重、早産、手術誘導炎症、膿瘍関連の炎症、肺動脈弁閉鎖不全、末梢神経障害、低酸素性虚血 (例えば、新生児低酸素性虚血性脳傷害又は低酸素性虚血性脳症)、組織虚血 (例えば、骨格筋、平滑筋、心筋、脳、皮膚間葉組織、結合組織、胃腸組織、又は骨の虚血)、関節リウマチ、髄膜炎、多発性硬化症、炎症性腸疾患 (例えば、クローン病)、慢性閉塞性肺疾患、鼻炎、早期分娩、又は感染性疾患 (例えば、インフルエンザ又はウイルス感染、例えば、デング熱又はウエストナイル熱) が挙げられる。

10

#### 【0105】

例えば、アッセイ方法を用いて診断又は監視できる感染症としては、例えば、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 及び髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) を含むナイセリア (*Neisseria*) 種、ブランハメラ・カタラーリス (*Branhamella catarrhalis*) を含むブランハメラ (*Branhamella*) 種、大腸菌 (*Escherichia coli*) を含む大腸菌類種、エンテロバクター (*Enterobacter*) 種、プロテウス・ミラビリス (*Proteus mirabilis*) を含むプロテウス (*Proteus*) 種、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、鼻疽菌 (*Pseudomonas mallei*)、及び類鼻疽菌 (*Pseudomonas pseudomallei*) を含むシュードモナス種、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) を含むクレブシエラ (*Klebsiella*) 種、サルモネラ (*Salmonella*) 種、赤痢菌 (*Shigella*) 種、セラチア (*Serratia*) 種、アシネトバクター (*Acinetobacter*) 種；インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) 及び軟性下疳菌 (*Haemophilus ducreyi*) を含むヘモフィルス (*Haemophilus*) 種、ブルセラ (*Bruceella*) 種、エルシニア・ペスチス (*Yersinia pestis*) 及びエルシニア・エンテロコリチカ (*Yersinia enterocolitica*) を含むエルシニア (*Yersinia*) 種、野兔病菌 (*Francisella tularensis*) を含むフランシセラ (*Francisella*) 種、パストレラ・マルトシダ (*Pasteurella multocida*) を含むパストレラ (*Pasteurella*) 種、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 種、メニンゴセプトチカム (*meningosepticum*)、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) を含むカンピロバクター (*Campylobacter*) 種、バクテロイデス・フラジリス (*Bacteroides fragilis*) を含むバクテロイデス (*Bacteroides*) 種 (口腔、咽頭の)、フソバクテリウム・ヌクレアタム (*Fusobacterium nucleatum*)、を含むフソバクテリウム (*Fusobacterium*) 種、肉芽腫カリマトバクテリウム (*Calymmatobacterium granulomatis*)、ストレプトパチルス・モニリホルミス (*Streptobacillus moniliformis*) を含むストレプトパチルス (*Streptobacillus*) 属、及び在郷軍人病菌 (*Legionella pneumophila*) を含むレジオネラ (*Le*

20

30

40

50

gionella) 種等のグラム陰性菌による感染症が挙げられる。

【0106】

本明細書に記載されるアッセイは、炎症性疾患若しくは状態又は感染症を発症する危険性を有する対象におけるIAIPレベルの測定に使用することができる。危険性因子としては、免疫抑制、免疫不全（例えば、免疫無防備状態の対象）、高齢、やけど（例えば、熱傷）、外傷、手術、異物、癌、早産（例えば、未熟に生まれた新生児）、肥満症、及びメタボリック症候群が挙げられる。

【0107】

本明細書に記載される方法は、日常的な診断の一部として、又は健康の一般的評価として行うことができる。

【0108】

疾病状態又は疾病の危険性の診断

本明細書に記載されるアッセイは、従来の診断方法と共に用いて、対象が炎症性疾患若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を有するか否かを決定することができる。アッセイを用いて得られたIAIP測定値は、対象がIAIP又は抗炎症薬若しくは抗感染療法を用いた処置の候補、又はIAIPの投与に対する応答が予測される候補であるか否かを決定するのに使用することができる（例えば、低いIAIPレベルを有する患者は、IAIPを用いて処置することができ、及び/又はIAIPを用いた処置に都合よく応答し得る）。IAIPの測定に続いて、適当と思われる場合（例えば、IAIPレベルが低い、例えば、健康な対象の正常なIAIPレベルと見なされるものより少なくとも25%低い、又はIAIPレベルが200 µg/mL未満である場合）、対象へのIAIP、抗炎症薬又は抗感染療法の投与を行ってもよい。

【0109】

対象由来のサンプル中のIAIP及び/又はIAIP-IAIPリガンド複合体の測定は、対象が炎症性疾患若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を有するか否かの決定に使用することができる。方法は、上述した方法の1つを用いてIAIP及び/又はIAIP-IAIPリガンド複合体のレベルを測定し、そのレベルを対照値（例えば、健康な患者由来の参照サンプル、又は明らかに健康な患者の集団の測定値から得た平均値）と比較することを含む。健康な対照と比較して低い対象におけるIAIPのレベル（例えば、対照と比較して25%、30%、40%、50%以上低い対象におけるレベル）又は約250 µg/mL以下のIAIP濃度は、対象が炎症性疾患若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を有することを示す。健康な対照と比較して高い対象におけるIAIP-IAIPリガンド複合体のレベル（例えば、対照と比較して5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%以上高いレベル）は、対象が炎症性疾患又は感染症を有し又は発症する危険性を有することを示す。

【0110】

天然に存在するIAIP-IAIPリガンド複合体中のIAIPに結合したリガンドの特定は又、対象が有し又は発症する危険性を有する炎症性疾患又は感染症のタイプの洞察を提供し得る。例えば、対象由来のサンプル中の高いIAIP-LPS複合体のレベルの検出は、対象が感染症（例えば、細菌感染症）を有し又は発症する危険性を有することを示し得、対象由来のサンプル中の高いIAIP-ヒストン複合体のレベルの検出は、対象が急性全身炎症性疾患（例えば、敗血症又は卒中）を有し又は発症する危険性を有することを示し得る。そのような測定値を使用して、特定の炎症性疾患又は感染症を有する対象を診断し、又は治療法若しくは処置過程を推奨することができる。

【0111】

疾病の重症度

本明細書に記載される方法は又、疾病の重症度の評価に使用することができる。本明細書に記載されるアッセイを用いて測定して、約200 µg/mLよりも低いIAIP濃度を有する対象は、重篤な炎症若しくは感染症を有し若しくは発症する高い危険性を有し、又はより高い病的状態及び/若しくは死亡の危険性を有するとして分類することができる

10

20

30

40

50

。あるいは、本明細書に記載されるアッセイを用いて高い I A I P - I A I P リガンド複合体レベルを有する対象（例えば健康な対照又は既知の参照濃度値よりも 10%、20%、30%、40%、50% 以上高い I A I P - I A I P リガンド複合体、例えば I A I P - L P S 複合体のレベルを有する対象）は、重篤な炎症若しくは感染症を有し若しくは発症する高い危険性を有し、又はより高い病的状態及び/若しくは死亡の危険性を有するとして分類することができる。一旦重症度が評価されたら、対応する処置過程を推奨することができる。重篤な炎症を示す I A I P 濃度を有する対象は、I A I P 濃度が炎症性疾病又は状態を有し又は発症する中等度の又は低い危険性を示す対象よりも、より高頻度又はより積極的な処置に関して選択され得る。本明細書に記載されるアッセイを用いてインタクト I A I P を測定することができ、従ってそれらを使用して、重篤な状態を検出し、適切な治療的応答の必要性を評価することができる。

10

#### 【0112】

##### モニタリング

炎症性疾病若しくは状態若しくは感染症を以前に有し、又はそれを発症する危険性を有する対象（例えば、遺伝的素因を有する対象、疾病又は感染症を有する他に暴露されている対象、又は上述した危険性因子のいずれかを有する対象）は、本明細書に記載される方法を用いて監視することができる。監視は又、特に対象が炎症又は感染症の明らかな症状を示さない場合、中～低い I A I P レベル（例えば、300～200 µg/mL）を有する対象、及び/又は I A I P - I A I P リガンド複合体の僅かに高いレベルを有する対象（例えば、健康な対照又は既知の参照濃度値と比較して 1%、5%、又は 10% 高い I A I P - L P S 複合体等の I A I P - I A I P リガンド複合体のレベルを有する対象）に関する好適なアプローチであり得る。I A I P 及び/又は I A I P - I A I P リガンド複合体の測定値は、規則的な間隔（例えば、年に 1 回、年に 2 回、3 カ月に 1 回、1 カ月に 1 回、2 カ月に 1 回、又は週に 1 回）で行って、I A I P 及び/又は I A I P - I A I P リガンド複合体レベルが一定であるか又は変化しているかを決定することができる。I A I P レベルの増大、及び/又は I A I P - I A I P リガンド複合体のレベルの低下は、改善を示し、監視及び/又は処置の停止に繋がり得る。I A I P レベルの低下、及び/又は I A I P - I A I P リガンド複合体のレベルの増大は、回復中の対象における再発、又は炎症性疾病若しくは感染症の発症若しくは悪化を示し得、診断試験（例えば、より高頻度の）及び処置の開始又は増加又は変化に繋がり得る。

20

30

#### 【0113】

##### 処置の有効性

本明細書に記載される方法は、炎症性疾病若しくは状態又は感染症を処置されている対象（例えば、抗生物質、抗炎症剤、抗感染性薬剤、又は I A I P を用いて）における処置の有効性の評価にも使用することができる。I A I P レベルは、処置の開始に先立って又は後に測定してもよく、次いで処置中に継続して測定してもよい（例えば、1 日 1 回、週に 1 回、2 週間に 1 回、月に 1 回、2 カ月に 1 回、3 カ月に 1 回、又は年に 2 回）。処置過程中的 I A I P レベルの増大（例えば、以前の測定値に対して 1%、5%、10%、20%、30% 以上の増大）は、改善を示し、処置の有効性を示すが、一定の I A I P レベル又は I A I P の低下（例えば、変化を示さない又は以前の測定値に対して 1%、5%、10%、20%、30% 以上の低下を示す 1 つ以上の測定値）は、改善の欠如を示し、処置過程が修正又は変更される必要があることを示唆する（例えば、用量若しくは頻度又は両方の増大、異なる治療法への変更、又は追加の治療薬を含むという修正）。

40

#### 【0114】

I A I P の測定の代わりに又はそれに加えて、I A I P - I A I P リガンド複合体（例えば、I A I P - L P S）の検出は、炎症性疾病又は感染症の処置又は危険性の低下のための治療法による処置の有効性の評価に用いることができる。方法は、治療法を受けている対象におけるバイオマーカーとして、I A I P - I A I P リガンド複合体のレベルを測定することを含み、当該レベルは、処置の開始に先立って又は後に、次いで処置中に継続して測定されてもよい（例えば、1 日 1 回、週に 1 回、2 週間に 1 回、月に 1 回、2 カ月

50

に1回、3カ月に1回、又は年に2回)。IAIP-IAIPリガンド複合体のレベルは、対照値のレベル(例えば、健康な患者からの参照サンプル、又は対照対象(例えば、健康な患者)の集団の測定値から得た平均値)と、又は対象から取得した以前の測定値と比較してもよい。IAIP-IAIPリガンド複合体のレベルの「正常なレベル」に向かう低下又は処置中の後の時点での低下(例えば、以前の測定値に対して1%、5%、10%、20%、30%以上の低下)は、治療法が有効であることを示すであろう。IAIP-IAIPリガンド複合体のレベルの増大(例えば、以前の測定値又は「正常なレベル」に対して1%、5%、10%、20%、30%以上の増大)は、処置が無効であり、修正を必要とすることを示すであろう(例えば、より高い用量、より頻繁な投与、若しくは両方、又は異なる治療法又は併用療法)。

10

#### 【0115】

##### 処置の方法

本発明は又、本明細書に記載される診断方法に従って必要性を有すると決定された対象(例えば、ヒト)(例えば、参照と比較して又は以前の測定値と比較して、IAIP-IAIPリガンド複合体の低いレベル及び/又は高いIAIPレベルを有する対象)における、炎症性疾患若しくは状態又は感染症(例えば、重篤な感染症)を処置、予防、又はその発症の危険性を低減する方法を特徴とする。対象は、疾患若しくは状態及び/又はIAIPに適切な標準治療で処置することができる。対象は、新生児、小児、青少年、又は成人であってもよい。

20

#### 【0116】

必要とする対象へのIAIP又は他の治療薬の投与に先立って、IAIP濃度を対象由来のサンプル中で本明細書に記載される方法に従って測定し得る。IAIPレベルの測定の代替として又はそれに加えて、方法は、IAIPの投与に先立ってIAIP-IAIPリガンド複合体を検出することを含み得る。例えば、方法は、細菌感染症(例えば、グラム陰性菌感染症)を有し又はそれが疑われる対象においてIAIP-LPS複合体を検出し、及び/又は対象由来のサンプル中のIAIP濃度を測定し、IAIPを対象に投与する(例えば、健康な対照又は参照値と比較して増大したIAIP-LPS複合体のレベル(例えば、健康な対照のレベルの1%、5%、10%、20%、30%以上高いIAIP-LPS複合体のレベルを有する対象にIAIPを投与する)、又は全身炎症若しくはショック症候群の危険性を有する対象(例えば、健康な対照よりも少なくとも25%低いIAIPレベルを有する対象)にIAIPを投与することを含み得る。

30

#### 【0117】

IAIP又はIAIPを含む組成物は、それを必要とする対象(例えば、1つ以上の本明細書に記載される方法を用いることによって決定された)に投与され得る。IAIPで処置され得る対象は、感染症(例えば、グラム陰性菌感染症)を有する対象、又は感染症を発症する高い危険性を有する対象(例えば、免疫抑制、免疫不全(例えば、免疫無防備状態である対象)、高齢、やけど(例えば、熱傷)、外傷、手術、異物、癌、最近の出生(recent birth)(例えば、新生児)、早産(例えば、未熟に生まれた新生児)、肥満症、及びメタボリック症候群を含む1つ以上の危険因子を有する対象)を含む。感染症は、感染しているグラム陰性菌からのリポ多糖(LPS)分子の放出により引き起こされるエンドキシンを原因とし得る。グラム陰性菌による重篤な感染症は、重篤な全身炎症、敗血症、ショック症候群、及び死をもたらし得る。本明細書に示すように、IAIPはLPSに結合し、従って、IAIPの投与は、グラム陰性菌で感染した対象を処置して、LPS誘導による細胞傷害性を低減又は予防するのに用いることができる。

40

#### 【0118】

IAIPを用いた処置に好適な感染症は、淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)及び髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)を含むナイセリア(*Neisseria*)種、ブランハメラ・カタラーリス(*Branhamella catarrhalis*)を含むブランハメラ(*Branhamella*)種、大腸菌(*Escherichia coli*)を含む大腸菌類種、エンテロバクター(*Ent*

50

erobacter)種、プロテウス・ミラビリス(*Proteus mirabilis*)を含むプロテウス(*Proteus*)種、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、鼻疽菌(*Pseudomonas mallei*)、及び類鼻疽菌(*Pseudomonas pseudomallei*)を含むシュードモナス種、肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)を含むクレブシエラ(*Klebsiella*)種、サルモネラ(*Salmonella*)種、赤痢菌(*Shigella*)種、セラチア(*Serratia*)種、アシネトバクター(*Acinetobacter*)種；インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)及び軟性下痢菌(*Haemophilus ducreyi*)を含むヘモフィルス(*Haemophilus*)種、ブルセラ(*Bruceella*)種、エルシニア・ペスチス(*Yersinia pestis*)及びエルシニア・エンテロコリチカ(*Yersinia enterocolitica*)を含むエルシニア(*Yersinia*)種、野兔病菌(*Francisella tularensis*)を含むフランシセラ(*Francisella*)種、パストレラ・マルトシダ(*Pasteurella multocida*)を含むパストレラ(*Pasteurella*)種 including、コレラ菌(*Vibrio cholerae*)、フラボバクテリウム(*Flavobacterium*)種、メニゴセプチカム(*meningosepticum*)、カンピロバクター・ジェジュニ(*Campylobacter jejuni*)を含むカンピロバクター(*Campylobacter*)種、バクテロイデス・フラジリス(*Bacteroides fragilis*)を含むバクテロイデス(*Bacteroides*)種(口腔、咽頭の)、フソバクテリウム・ヌクレアタム(*Fusobacterium nucleatum*)、を含むフソバクテリウム(*Fusobacterium*)種、肉芽腫カリマトバクテリウム(*Calymmatobacterium granulomatis*)、ストレプトバチルス・モニリホルミス(*Streptobacillus moniliformis*)を含むストレプトバチルス(*Streptobacillus*)属、及び在郷軍人病菌(*Legionella pneumophila*)を含むレジオネラ(*Legionella*)種等のグラム陰性菌による感染症を含む。

#### 【0119】

(例えば、1つ以上の本明細書に記載される方法を用いることにより)処置の必要性を有すると決定され、又はそのような決定後にIAIPで処置できると決定された対象は、急性炎症性疾病、敗血症、敗血性ショック、無菌敗血症、全身炎症性応答症候群(SIRS)、外傷/傷害(例えば、創傷、やけど、断裂、挫傷、骨折、外科手技)、卒中(例えば、虚血性卒中、出血性卒中)、急性肺傷害、急性呼吸促迫症候群(ARDS)、肺炎(例えば、重篤な肺炎、重症又は非重症：市中感染肺炎、院内感染肺炎、ナーシングホーム感染肺炎)、壊死性腸炎、急性膵炎、急性腎臓傷害を含む腎疾病、肝臓傷害、急性循環不全、子癇前症、癌、癌転移、腫瘍浸潤、末梢血管疾病、1型又は2型糖尿病、アテローム硬化性心血管系疾病、間欠性跛行、重症虚血肢疾病、心筋梗塞、頸動脈閉塞、臍帯閉塞、低出生体重、早産、手術誘導炎症、膿瘍関連の炎症、肺動脈弁閉鎖不全、末梢神経障害、低酸素性虚血(例えば、新生児低酸素性虚血性脳傷害又は低酸素性虚血性脳症)、組織虚血(例えば、骨格筋、平滑筋、心筋、脳、皮膚間葉組織、結合組織、胃腸組織、又は骨の虚血)、関節リウマチ、髄膜炎、多発性硬化症、炎症性腸疾患(例えば、クローン病)、慢性閉塞性肺疾患、鼻炎、早期分娩、又は感染性疾患(例えば、インフルエンザ又はウイルス感染、例えば、デング熱又はウエストナイル熱)等の炎症性疾患又は状態を有し又は発症する危険性を有する対象；低いIAIPレベル(例えば、250、225、200、175、150 µg/mL以下のIAIPレベル)を有する対象、及び疾病関連のIAIP-IAIPリガンド複合体(例えば、IAIP-LPS又はIAIP-ヒストン)の増大したレベルを有する対象も含む。

#### 【0120】

投与

IAIP(例えば、I I及び/又はP I)、又はそのようなタンパク質及び薬学的

に許容され得る賦形剤、希釈剤、又は担体を含む組成物は、本明細書に記載される診断方法に従って必要性を有すると決定された、炎症性疾患若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を有する対象（例えば、参照と比較して又は以前の測定値と比較して、I A I P - I A I P リガンド複合体の低いレベル及び／又は高いI A I P レベルを有する対象）（例えば、ヒト）に、例えば、非経口的に、吸入噴霧により、局所的に、鼻腔内に、頬側に、舌下に、鼻腔内に、経口投与より、吸入、坐薬、直腸内に、経腔により、又は注射によるものを含む、任意の好適な経路により投与され得る。注射による投与は、例えば、静脈内、腹腔内、皮下、真皮内、皮内、筋内、関節内、動脈内、滑液嚢内、胸骨内、くも膜下腔内、病巣内、硝子体内、及び頭蓋内注射を含む。患者が入院している場合、好ましい投与方法は、静脈内注射によるものである。

10

## 【0121】

I A I P（例えば、I I 及び／又はP I）又はそのようなタンパク質を含む組成物は、1、2、3、4、5、6、8、12、又は24時間毎に1回以上；1、2、3、4、5、又は6日毎に1回以上；又は1、2、3、又は4週間毎に1回以上、対象に投与され得る。他の場合、I A I P（例えば、I I 及び／又はP I）又はそのようなタンパク質を含む組成物は、連続注入として投与される。

## 【0122】

本発明の組成物で使用されるI A I P（例えば、I I 及び／又はP I）は、例えば、当該技術分野で既知の方法によりヒト血漿及び血液から得ることができる（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第9,139,641号参照）。

20

## 【0123】

詳細には、I A I Pは、80%～100%（例えば、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、又は約100%）の純度で天然源（例えば、血液）から得られ、本発明の組成物の調製に使用することができる（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,932,365号参照）。本発明の組成物で使用されるI A I Pは又、精製中、低pH条件（例えば、pH約4.0以下、例えば、約pH3.6以下の洗浄緩衝液）に暴露され得る（米国特許第9,139,641号に記載されているように）。

## 【0124】

組成物は、任意の好適なI A I P、例えば、I I、P I、重鎖、軽鎖、又はそれらの任意の組み合わせを含み得る。例えば、組成物は、I I、P I、及び／又はビクニンを含み得る。いくつかの場合、組成物はI I及びP Iを含み得る。重鎖はH1、H2、H3、H4、又はH5であり得る。軽鎖はビクニンであり得る。

30

## 【0125】

組成物中のI A I P（例えば、I I 及び／又はP I）の比率又は濃度は、投与量、化学的特性（例えば、疎水性）、及び投与経路を含む多数の因子に応じて変動し得る。I A I P（例えば、I I 及び／又はP I）は、生理学的比率で組成物中に存在し得る。生理学的比率は、例えば、健康な人若しくは動物に見出される比率、及び／又はヒト血漿中に自然に現れるI I 及びP Iの比であり得る。生理学的比率は、典型的には約60%～約80% I I 及び約20%～約40% P Iである。

40

## 【0126】

I A I P（例えば、I I 及び／又はP I）又はその組成物は、例えば、約1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、7.5、又は10時間を超える半減期を有し得る。I A I P（例えば、I I 及び／又はP I）又はその組成物は、約5時間を超える半減期、又は好ましくは約10時間を超える半減期を有し得る。例えば、対象に経時的に投与するのに必要な用量が低下するため、より長い半減期が好ましい。

## 【0127】

## 投与量

本明細書に記載される診断方法に従って必要性を有すると決定された、炎症性疾患若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を有する対象（例えば、参照と比較して又

50

は以前の測定値と比較して、I A I P - I A I P リガンド複合体の低いレベル及び/又は高いI A I P レベルを有する対象)に対する投与のための薬学的に許容され得る本発明の組成物は、I A I P (例えば、I I 及び/又はP I )を当該技術分野で既知の投与量で含む(例えば、その各々の全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7, 932, 365号、国際特許出願公開第2009154695号、及び米国特許出願公開第2009/0190194号参照)。例えば、本発明の組成物は、約1mg/kg~50mg/kgの範囲の投与量、好ましくは10mg/kg~30mg/kgの投与量で投与され得る。用量は、1、2、3、4、5、6、8、12若しくは24時間毎、1、2、3、4、5若しくは6日毎、又は1、2、3若しくは4週間毎に1回以上、又は必要に応じて投与され得る。上記に挙げた用量よりも低い又は高い用量が有利であり得る。任意の特定の対象に対する特定の投与量及び処置レジメンは、使用する特定の組成物の活性、年齢、体重、全身の健康状態、性別、食事、投与時間、排泄率、薬物の組み合わせ、疾病の重症度及び過程(例えば、患者の状態及び/又は症状)、疾病に対する対象の素質、及び医療従事者(例えば、医師)の処置の判断を含む様々な因子に依存するであろう。I A I P は、担体材料と組み合わせられて単一の剤形を生成し得る。

10

#### 【0128】

症状の改善に基づいて又は本明細書に記載されるようなI A I P 及び/又はI A I P - I A I P リガンド複合体の測定値により評価して、患者の状態の改善後、必要に応じて、I A I P 組成物又は併用療法の維持用量を投与し得る。続いて、投与量又は投与頻度、又は両方を、症状の低下の関数として、改善した状態が保持されるレベルに低下させ得る。症状が所望のレベルに軽減され、又はI A I P が増大し、及び/又はI A I P - I A I P リガンド複合体が所望のレベルに低下した際、処置を終了し得る。しかしながら、対象は疾病症状の任意の再発、又はI A I P レベルの低下に基づいて、長期間の断続的な処置を必要とし得る。状態の改善は又、患者由来の生物学的サンプル(例えば、血液(例えば、全血、血漿又は血清)、気管支肺胞洗浄液(B A L F)、痰、尿、脳脊髄液(C S F)、又は組織ホモジネート(例えば、肝臓生検のホモジネート)中のI I p のレベルに基づいて判断し得る。生物学的サンプル中のI I p 及び/又はI A I P - I A I P 複合体のレベルは、本明細書に記載されるアッセイの1つ以上を用いて決定することができる。

20

#### 【0129】

##### 製剤

本発明は、本明細書に記載される診断方法に従って必要性を有すると決定された、炎症性疾患若しくは状態又は感染症を有し又は発症する危険性を有する対象(例えば、本明細書に記載される方法を用いて測定して、低いI A I P レベル、及び/又は高いI A I P - I A I P リガンド複合体、例えばI A I P - L P S 複合体レベルを有すると見出された対象)に対するI A I P の投与方法を提供する。方法は、I A I P (例えば、I I 及び/又はP I)、I A I P (例えば、I I 及び/又はP I)及び薬学的に許容され得る賦形剤、担体若しくは希釈剤を含む組成物、又は、本明細書に記載されるような、2次処置と組み合わせたそのような組成物の投与を含む。組成物は、固体又は液体として処方され得る。組成物は、本明細書に記載されるものを含む任意の好適な手段による投与のために処方され得る。

30

40

#### 【0130】

投与のためのI A I P の注射用形態が特に好ましい。I A I P 及びそれを含む組成物は、静脈内、腹腔内、皮下、皮内、筋内、関節内、動脈内、滑液嚢内、胸骨内、くも膜下腔内、皮内、硝子体内、病巣内及び頭蓋内注射又は注入技術のために処方され得る。医薬組成物は、例えば、無菌注射用水性又は油性懸濁液としての無菌注射用製剤の形態であり得る。この懸濁液は、好適な分散剤又は湿潤剤(例えば、T W E E N (登録商標)80等)及び懸濁剤を使用して、当該技術分野で既知の技術に従って処方され得る。無菌注射用製剤は又、無毒の非経口的に許容され得る希釈剤又は溶媒中の無菌注射用溶液又は懸濁液であってもよい。

#### 【0131】

50

組成物は又、カプセル剤、錠剤、丸剤、乳剤及び水性懸濁剤、分散剤及び液剤を含むがこれらに限定されない、任意の経口的に許容され得る剤形で、経口投与用に処方されてもよい。錠剤等の固体組成物を調製するために、IAIPは医薬賦形剤と共に混合されて、均質混合物を含む固体プレ製剤組成物を形成し得る。次いで、この固体プレ製剤は、例えば、1mg/kg～約50mg/kgのIAIP（例えば、I I及び/又はP I）を含む、上述したタイプの単位剤形に更に分割され得る。固体プレ製剤は、約10mg/kg～30mg/kgのIAIP（例えば、I I及び/又はP I）を含み得る。本発明の錠剤又は丸剤は、被覆され、又は別様に配合されて、長期作用の利点を提供する剤形を提供することができる。

#### 【0132】

組成物が経口投与用、又は注射による投与用に組み込まれ得る液体形態は、水溶液、好適には風味付けされたシロップ剤、水性又は油性懸濁液、及び、綿実油、ゴマ油、ヤシ油、又はピーナツ油等の食用油を有する風味付けされた乳剤、並びにエリキシル剤及び同様の医薬ビヒクルを含む。

#### 【0133】

吸入又は通気用の組成物は、薬学的に許容され得る水性又は有機溶媒中の溶液及び懸濁液、又はそれらの混合物、並びに粉末を含む。液体又は固体組成物は、本明細書に記載される及び/又は当該技術分野で既知のように、好適な薬学的に許容され得る賦形剤を含み得る。組成物は、局部又は全身効果のために経口又は経鼻呼吸経路により投与され得る。組成物は、不活性ガスの使用により噴霧されてもよい。

#### 【0134】

組成物の局所投与は、所望の処置が局所適用によって容易に接近可能な範囲又は器官を含む場合に有用である。皮膚への局所適用のために、組成物は、担体中に懸濁又は溶解した活性成分を含む好適な軟膏を用いて処方される必要がある。あるいは、医薬組成物は、担体中に懸濁又は溶解した活性成分を含む好適なローション又はクリームと、好適な乳化剤を用いて処方され得る。

#### 【0135】

医薬組成物は又、直腸投与用の坐薬の形態で投与されてもよい。この組成物は、本発明の組成物を、室温で固体であるが、直腸温度で液体であり、従って直腸内で融解して活性成分を放出する好適な非刺激性賦形剤と共に混合することにより調製され得る。局所経皮パッチも本発明に含まれる。

#### 【0136】

対象に投与される組成物は、上述した医薬組成物の1つ以上の形態にあり得る。これらの組成物は、従来の滅菌技術により滅菌され得、又は無菌濾過され得る。水性溶液は、そのまま使用用に包装され、又は凍結乾燥されてもよく、凍結乾燥製剤は、投与に先立って無菌水性担体と組み合わせられる。

#### 【0137】

他の送達システムは、時間放出、遅延放出又は徐放送達システムを含み得る。そのようなシステムは、本発明の組成物の反復投与を避けることができ、対象及び医師に対する利便性を増大させる。多数のタイプの放出送達システムが入手可能であり、当業者に既知である。それらは、(米国特許第3,773,919号;欧州特許第58,481号、欧州特許第133,988号、Sidman, K. R. et al., Biopolymer 22:547-556、及びLanger, R. et al., J. Biomed. Mater. Res. 15:267-277; Langer, R. Chem. Tech. 12:98-105)に記載されているもの等のポリマーベースのシステムを含む。徐放組成物の他の例としては、成形物品、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態の半透過性ポリマーマトリクスが挙げられる。送達システムは:脂質;ヒドロゲル放出システム;サイラスティックシステム;ペプチドベースのシステム;ワックスコーティング;従来の結合剤及び賦形剤を使用した圧縮錠剤;部分的に融合したインプラント等の非ポリマーシステムも含む。そのような製剤の調製方法は、当業者に明らかであろう(例えば、米国

10

20

30

40

50

特許第4,452,775号、米国特許第4,667,014号、米国特許第4,748,034号及び米国特許第5,239,660号、米国特許第3,832,253号、及び米国特許第3,854,480号参照)。

【0138】

医薬品の処方方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、Niazi、Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations (Second Edition)、CRC Press 2009は、液体、無菌、圧縮、半圧縮及びOTC形態の製剤開発を記載している。経皮及び粘膜送達、リンパ系送達、ナノ粒子、制御放出システム、セラノスティクス、タンパク質及びペプチド薬物、及び生物製剤送達は、Wang et al., Drug Delivery: Principles and Application (Second Edition)、Wiley 2016に記載され；ペプチド及びタンパク質薬物の製剤及び送達は、例えば、Banga、Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems (Third Edition)、CRC Press 2015に記載されている。

【0139】

併用療法

本発明の方法は、第2の処置(例えば、スタンドアロン療法として、又はIAIP(例えば、I1及び/又はPI)若しくはその組成物に加えて)を、炎症性疾患又は状態(例えば、敗血症、敗血性ショック、無菌敗血症、SIRS、外傷/傷害(例えば、創傷、やけど、断裂、挫傷、骨折、外科手技)、卒中(例えば、虚血性卒中、出血性卒中)、急性肺傷害、ARDS、肺炎(例えば、重篤な肺炎、重症又は非重症：市中感染肺炎、院内感染肺炎、ナーシングホーム感染肺炎)、壊死性腸炎、急性膵炎、急性腎臓傷害を含む腎臓病、肝臓傷害、急性循環不全、子癇前症、癌、癌転移、腫瘍浸潤、末梢血管疾病、1型又は2型糖尿病、アテローム硬化性心血管系疾病、間欠性跛行、重症虚血肢疾病、心筋梗塞、頸動脈閉塞、臍帯閉塞、低出生体重、早産、手術誘導炎症、膿瘍関連の炎症、肺動脈弁閉鎖不全、末梢神経障害、低酸素性虚血、組織虚血、関節リウマチ、髄膜炎、多発性硬化症、炎症性腸疾患(例えば、クローン病)、慢性閉塞性肺疾患、鼻炎、早期分娩、又は感染性疾患)又は感染症(例えば、細菌感染症)の処置のために投与又は共投与することも含む。例えば、第2の処置は、対象が細菌感染症有し又は発症する危険性を有する場合に抗生剤、対象がウイルス感染症(例えば、デング熱又はウエストナイル熱)を有し又は発症する危険性を有する場合に抗ウイルス剤、対象が真菌感染症を有し又は発症する危険性を有する場合に抗真菌剤、対象が寄生虫感染症を有し又は発症する危険性を有する場合に抗寄生虫薬、対象が本明細書に記載される炎症性疾患又は状態を有し又は発症する危険性を有する場合に抗炎症剤、対象が癌又は癌転移を有し又は発症する危険性を有する場合に抗癌剤、対象が卒中又は心筋梗塞を有し又は発症する危険性を有する場合に抗凝血剤、対象が癌又は自己免疫性疾患若しくは状態(例えば、炎症性腸疾患又は関節リウマチ)を有する場合に免疫調節剤、及び対象が急性肺傷害、ARDS、又は肺炎を有し又は発症する危険性を有する場合に気管支拡張剤、補体阻害剤、昇圧剤、鎮静剤、又は人工呼吸を投与することを含み得る。

【0140】

方法がIAIP(例えば、I1及び/又はPI)、又はIAIP(例えば、I1及び/又はPI)及び薬学的に許容され得る賦形剤、希釈剤又は担体を含む組成物と、1つ以上の第2の処置薬剤との組み合わせを投与することを含む場合、各薬剤は、単剤療法レジメンで通常投与される投与量の約1~100%、より好ましくは約5~95%の投与量レベルで存在する。第2の処置の薬剤は、多用量レジメンの一部として、IAIP(例えば、I1及び/又はPI)又はその組成物とは別個に投与されてもよい。IAIP及び第2の処置の薬剤は、同時に、又は任意の順序で連続して投与されてもよい。あるいは、第2の処置の薬剤は、例えば、単一の組成物中でIAIP(例えば、I1及び/

又はP I)と共に混合された単一の剤形の一部であってもよい。

【0141】

IAIP (例えば、I 1及び/又はP I)と組み合わせて投与され得る薬剤としては、ジデオキシヌクレオシド、例えばジドブジン(AZT)、2', 3'-ジデオキシイノシン(ddI)及び2', 3'-ジデオキシシチジン(ddC)、ラミブジン(3TC)、スタブジン(d4T)、及びTRIZIVIR(アバカビル+ジドブジン+ラミブジン);非ヌクレオシド、例えば、エファビレンツ(DMP-266, DuPont Pharmaceuticals/Bristol Myers Squibb)、ネビラピン(Boehringer Ingelheim)、及びデラビリジン(delaviridine)(Pharmacia-Upjohn);Ro 3-3335及びRo 24-7429等のTAT拮抗薬;プロテアーゼ阻害剤、例えば、フューリン阻害剤、インジナビル(Merck)、リトナビル(Abbott)、サキナビル(Hoffmann-LaRoche)、ネルフィナビル(Agouron Pharmaceuticals)、141 W94(Glaxo-Wellcome)、アタザナビル(Bristol Myers Squibb)、アンブレナビル(GlaxoSmithKline)、ホスアンブレナビル(GlaxoSmithKline)、チプラナビル(Boehringer Ingelheim)、KALETRA(ロピナビル+リトナビル、Abbott)、及び9-(2-ヒドロキシエトキシメチル)グアニン(アシクロビル)等の他の薬剤;インターフェロン、例えば、 $\alpha$ -インターフェロン、インターロイキンII、及びホスホノギ酸(Foscarnet);又は侵入阻害剤、例えば、T20(エンフビルチド、Roche/Trimeris)又はUK-427, 857(Pfizer)、レバミソール又はサイモシン、シスプラチン、カルボプラチン、ドセタキセル、パクリタキセル、フルオロウラシル、カペシタピン、ゲムシタピン、イリノテカン、トポテカン、エトポシド、マイトマイシン、ゲフィチニブ、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ドキシロピシン、シクロホスファミド、セレコキシブ、ロフェコキシブ、バルデコキシブ、イブuproフェン、ナプロキセン、ケトプロフェン、デキサメタゾン、プレドニゾン、プレドニロン、ヒドロコルチゾン、アセトアミノフェン、ミソニダゾール、アミホスチン、タムスロシン、フェナゾピリジン、オندانセトロン、グラニセトロン、アロセトロン、パロノセトロン、プロメタジン、プロクロルペラジン、トリメトベンズアミド、アプレピタント、アトロピンを伴うジフェノキシラート、及び/又はロペラミド;並びに抗凝血剤、例えば、抗トロンピンIII及び活性化タンパク質Cが挙げられる。

【0142】

IAIP (例えば、I 1及び/又はP I)と組み合わせて投与され得る追加の例示的な薬剤としては、下記に説明するそれらの組成物が挙げられる。

【0143】

抗生剤

対象が細菌感染症(例えば、壊死性腸炎又はグラム陰性菌感染症)を有し又は発症する危険性を有する場合、第2の処置は、細菌感染症の処置に使用される抗生剤を含み得る。抗生剤の非限定的な例としては、アモキシシリン、ペニシリン、ドキシサイクリン、クラリスロマイシン、ベンジルペニシリン、アジスロマイシン、ダブトマイシン、リネゾリド、レボフロキサシン、モキシフロキサシン、ガチフロキサシン、ゲンタマイシン、マクロライド、セファロsporin、アジスロマイシン、シプロフロキサシン、セフロキシム、アモキシリン-クラブラン酸カリウム、エリスロマイシン、スルファメトキサゾール-トリメトプリム、ドキシサイクリン-水和物、セフェピム、アンピシリン、セフポドキシム、セフトリアキソン、セファゾリン、エリスロマイシンエチルコハク酸塩、メロペネム、ペラシリン-タゾバクタム、アミカシン、エリスロマイシンステアリン酸塩、右旋糖中のセフェピム、ドキシサイクリンhydrate、アンピシリン-スルバクタム、セフトジジム、ゲミフロキサシン、ゲンタマイシン硫酸塩、エリスロマイシンラクトビオン酸塩、イミペナム-シラスタチン(cilastatin)、セフォキシチン、セフジトレンピボキシル、エルタペネム、ドキシサイクリン-ベンゾイル過酸化物、アンピシリン-スル

バクタム、メロペネム、セフロキシム、セフォテタン、ピペラシリン - タゾバクタム、広範囲のフルオロキノロン（例えば、マイコプラズマ・ニューモニア（*Mycoplasma pneumoniae*）又はクラミドフィラ・ニューモニア（*Chlamydia pneumoniae*）等の異型細菌を原因とする肺炎の処置に使用され得る）、及び当該技術分野で既知のその他が挙げられる。

#### 【0144】

##### 抗ウイルス剤

対象がウイルス感染（例えば、デング熱又はウエストナイル熱）を有し又は発症する危険性を有する場合、第2の処置は、ウイルス感染の処置に使用される抗ウイルス剤を含み得る。抗ウイルス剤の非限定的な例としては、ザナミビル、オセルタミビル、ペラミビル、リバビリン、アシクロビル、ガンシクロビル、ホスカルネット、シドホビル、及び当該技術分野で既知のその他が挙げられる。

10

#### 【0145】

##### 抗真菌剤

対象が真菌感染症を有し又は発症する危険性を有する場合、第2の処置は、真菌感染症の処置に使用される抗真菌剤を含み得る。抗真菌剤の非限定的な例としては、アンホテリシン、カスポファンギン、ポリコナゾール、イトラコナゾール、ボサコナゾール、フルコナゾール、フルシトシン、及び当該技術分野で既知のその他が挙げられる。

#### 【0146】

##### 抗寄生虫薬

対象が寄生虫感染症を有し又は発症する危険性を有する場合、第2の処置は、寄生虫感染症（例えば、寄生虫原生動物感染症の処置に使用される抗寄生虫薬を含み得る。抗寄生虫薬の非限定的な例としては、ニタゾキサニド、メラルソプロール、エフロルニチン、メトロニダゾール、チニダゾール、ミルテホシン、メベンダゾール、ピランテルパモ酸塩、チアベンダゾール、ジエチルカルバマジン、イベルメクチン、アルベンダゾール、プラジカンテル、リファンピン、及び当該技術分野で既知のその他が挙げられる。

20

#### 【0147】

##### 抗炎症剤

対象が本明細書に記載される炎症性疾患又は状態を有し又は発症する危険性を有する場合、第2の処置は、炎症の処置又は軽減に使用される抗炎症剤を含み得る。抗炎症剤の非限定的な例としては、コルチコステロイド、スタチン、ステロイド、非ステロイド性抗炎症薬、グルココルチコイド、及び当該技術分野で既知のその他が挙げられる。

30

#### 【0148】

##### 気管支拡張剤

対象が急性肺傷害、ARDS、又は肺炎を有し又は発症する危険性を有する場合、第2の処置は、気管支筋肉を弛緩させて気道を拡大し、肺に空気を通すのに使用される気管支拡張剤を含み得る。気管支拡張剤の非限定的な例としては、2作動薬、キサンチン、イプラトロピウム、オキシトロピウム、ムスカリン性受容体拮抗薬、イプラトロピウム、オキシトロピウム、テオフィリン、テオブロミン、カフェイン、サルブタモール、イソプロテレノール、アルブテロール、レバルブテロール（*levalbuterol*）、ビルブテロール、メタプロテレノール、テルブタリン、サルメテロール、ホルモテロール、及び当該技術分野で既知のその他が挙げられる。

40

#### 【0149】

##### 昇圧剤

対象が急性肺傷害、ARDS、肺炎、又は外傷/傷害（例えば、創傷、やけど、又は外科手技）を有し又は発症する危険性を有する場合、第2の処置は、血管収縮を引き起こし及び/又は血圧を増大させる昇圧剤を含み得る。昇圧剤の非限定的な例としては、エピネフリン、イソプロテレノール、フェニレフリン、ノルエピネフリン、ドブタミン、エフェドリン、ドロキシドパ、及び当該技術分野で既知のその他が挙げられる。

#### 【0150】

50

## 鎮静剤

第2の処置は、鎮静剤を含み得る。鎮静剤の非限定的な例としては、プロポフォール、ディプリバン、モルヒネ、フェンタニル、ミダゾラム、ロラゼパム、プレシード ( p r e c e d e )、インフモルフ ( i n f u m o r p h )、デクスメドミジン、アルフェンタニル、及び当該技術分野で既知のその他が挙げられる。

## 【0151】

## 補体阻害剤

対象が急性肺傷害、ARDS、又は肺炎を有し又は発症する危険性を有する場合、第2の処置は、補体活性化の阻害剤を含み得る。組成物は、C1、C2、C3 (例えば、C3a及びC3b)、C4 (例えば、C4b)、C5 (例えば、C5a及びC5b)、C6、C7、C8、C9、膜攻撃複合体、B因子、D因子、MASP-1、及びMASP-2、又はそれらの断片等の1つ以上の補体成分の活性化を阻害し得る。補体阻害剤は、C1-INH及びRhucin/rhC11NH等のプロテアーゼ阻害剤、sCR1/TP10、CAB-2/MLN-2222等の可溶性補体制御因子、エクリズマブ/SOLIRIS (登録商標)、ペキサリズムナ ( P e x e l i z u m n a )、オフアツムマブ等の治療的抗体、コンスタチン等の補体成分阻害剤、PMX-53及びrhMBL等の受容体拮抗薬を含み得る。

10

## 【0152】

## キット

本発明は又、患者 (例えば、新生児、小児、青少年又は成人等のヒト患者) 由来のサンプル (例えば、流体サンプル) 中のIAIPの測定で使用されるキットを特徴とする。キットは、以下の1つ以上を含み得る：支持体 (例えば、プレート (例えば、マルチウェルプレート))、粒子 (例えば、磁気ビーズ、例えば、ナノ粒子、磁気ナノ粒子)、バイオチップ、樹脂、容器 (例えば、チューブ)、膜 (例えば、ニトロセルロース膜、PVDF膜)、試験片 (例えば、セルロース、ガラス繊維、又はニトロセルロース) 又は固定化されたIAIP結合剤 (例えば、IAIP特異的抗体又はIAIPリガンド) を含むビーズ (例えば、タンパク質A又はタンパク質Gビーズ、磁気ビーズ、ガラスビーズ、プラスチックビーズ)、標識されたIAIP検出剤 (例えば、IAIPリガンド又はIAIP特異的抗体)、洗浄緩衝液、ブロッキング剤、標識検出のための基質、希釈薬剤、及び検出アッセイを行うための説明書。結合剤及び検出剤は、容器内に提供されてもよく、又は結合剤は支持体に予め付着されて提供されてもよい (例えば、結合剤はプレート又は試験片に既に付着されている)。

20

30

## 【0153】

本発明は又、患者由来のサンプル (例えば、流体サンプル) 中のIAIP-IAIPリガンドの測定で使用されるキットを特徴とする。キットは、以下の1つ以上を含み得る：支持体 (例えば、プレート (例えば、マルチウェルプレート))、粒子 (例えば、磁気粒子、例えば、ナノ粒子、磁気ナノ粒子)、バイオチップ、樹脂、容器 (例えば、チューブ)、膜 (例えば、ニトロセルロース膜、PVDF膜)、試験片 (例えば、セルロース、ガラス繊維、又はニトロセルロース) 又は固定化された結合剤 (例えば、IAIP特異的抗体、異なるIAIPリガンド、又はIAIPに特異的に結合する抗体リガンド) を含むビーズ (例えば、タンパク質A又はタンパク質Gビーズ、磁気ビーズ、ガラスビーズ、プラスチックビーズ)、標識された検出剤 (例えば、異なるIAIPリガンド、IAIP特異的抗体、又はIAIPに特異的に結合する抗体リガンド)、洗浄緩衝液、ブロッキング剤、標識検出のための基質、膨張剤、及び検出アッセイを行うための説明書。結合剤及び検出剤は容器内に提供されてもよく、又は結合剤は支持体に予め付着されていてもよい (例えば、結合剤は、プレート又は試験片に既に付着されていてもよい)。

40

## 【実施例】

## 【0154】

以下の実施例は、本発明のいくつかの実施形態を更に説明するために提供され、本発明の範囲を限定することを意図するものではない；それらの例示的な性質、当業者に既知の

50

他の手順、方法論、又は技術を代替的に使用できることが理解されるであろう。

【0155】

実施例1：ヘパリン - I A I Pアッセイ

ビオチン化ヘパリンの調製

ヘパリン（ヘパリンナトリウム注射 USP、Sagent Pharmaceutical  
als、Cat # NDC 25021-400-30）をビオチンヒドラジド試薬（Ap  
Ex BIO、Cat # A87007）を使用して製造業者の説明書に従ってビオチンとコ  
ンジュゲートした。手短には、1000 IUヘパリン溶液を、以前に pH 4.7 の 0.1  
M MES 緩衝液中の DMSO に溶解した 0.25 mg 架橋剤試薬 EDC（1 -（3 - ジ  
メチルアミノプロピル） - 3 - 3 エチルカルボジイミド塩酸塩、Alfa Aesar  
Cat # A10807）及び 0.5 mM ビオチンヒドラジドと混合し、室温で 3 時間穏や  
かに混合した。非コンジュゲート化ビオチン及び緩衝液交換を、5 kDa カットオフフィル  
ター膜（Millipore）を有する Amicon Ultra 遠心フィルター装置  
上で限外濾過により行った。d - H<sub>2</sub>O 中での希釈後、ビオチン化ヘパリンはアッセイで  
使用される準備が整った。

10

【0156】

「サンドイッチ型」ヘパリン - I A I P ELISA

ヒト I A I P の軽鎖に対する精製マウスモノクローナル抗体（MAb 69.26）を  
、96 ウェルマイクロプレート（Immulon 600、Greiner BioOne）上に 200 ng / ウェルで 32  
で 2 時間固定化した。5% 無脂肪粉乳で 1 時間ブ  
ッキングし、TBS - T（TBS + 0.05% Tween 20）で洗浄した後、未知  
のサンプル及び既知の I A I P 標準を TBS + 0.1% Tween 20 中で希釈し、  
マイクロプレートに加えた（最終容積 50  $\mu$ L / ウェル）。サンプル及び段階希釈 I A I  
P 標準溶液を 32 で 1 時間インキュベートした。マイクロプレートを TBS - T で数回  
洗浄した後、ビオチン化ヘパリンを 20 mM 酢酸 + 25 mM NaCl、pH 4.0（1  
: 2500）を含む緩衝液中で希釈し、ウェル当たり 50  $\mu$ L を加えた。ビオチン化ヘパ  
リンを 32 で 30 分間インキュベートし、次いでマイクロプレートを TBS - T を使用  
して少なくとも 3 回洗浄した。最終的に、1 : 5000（50  $\mu$ L / ウェル）に希釈した  
HRP - コンジュゲート化ストレプトアビジン（Pierce）をマイクロプレートに加  
えた。洗浄後、50  $\mu$ L の基質 TMB を加え（Neogen Enhanced K - B  
lue TMB 基質）、50  $\mu$ L 1M HCl を加えることにより反応を停止し、分光  
光度計（Molecular Devices）で 450 nm 波長で色変化を読み取った  
。4 点ロジスティック回帰（SoftMax Pro ソフトウェア、Molecular  
Devices）を用いて標準曲線を生成し、図 3 B に示すように、最大 I A I P 濃度  
2.0  $\mu$ g / mL から連続 2 倍希釈で 0.03125  $\mu$ g / mL までの 7 点曲線をプロッ  
トした。未知のサンプルの I A I P 濃度を、生成した標準曲線に基づいて計算した。

20

30

【0157】

実施例2：LPS - I A I Pアッセイ

ビオチン化エンドキシリン / LPS（リポ多糖）の調製：

大腸菌（Escherichia coli）055 : B5（Sigma Catal  
og # L2280）由来のリポ多糖（LPS / エンドキシリン）を、ビオチンヒドラ  
ジド試薬（ApEx BIO、Cat # A87007）を使用して、製造業者の説明書に従  
って、又ヘパリンで使用したプロトコルと同様に、ビオチンで標識した。10 mg の LP  
S を 0.1 M MES 緩衝液中で再構成し、2.5 mM ビオチン - ヒドラジド及び 2.5  
mg EDC（1 -（3 - ジメチルアミノプロピル） - 3 - 3 エチルカルボジイミド塩酸  
塩、Alfa Aesar Cat # A10807）を室温で 3 時間穏やかに混合した。  
非コンジュゲート化 LPS の除去及び緩衝液交換を、5 kDa カットオフフィルター膜（  
Millipore）を有する Amicon Ultra 遠心フィルター上での限外濾過  
により行った。d - H<sub>2</sub>O 中で希釈した後、ビオチン化 LPS は、アッセイで使用される  
準備が整った。

40

50

## 【0158】

## 「サンドイッチ型」L P S - I A I P E L I S A

上述したヘパリン - I A I P プロトコルと同様に、ヒト I A I P の軽鎖に対する精製マウスモノクローナル抗体 ( M A b 69.26 ) を、96 ウェルマイクロプレート ( I m m u l o n 600、G r e i n e r B i o O n e ) 上に 50 n g / ウェルで 32 で 2 時間固定化した。5% 無脂肪粉乳で 1 時間ブロッキングし、T B S - T ( T B S + 0.05% T w e e n 20 ) で洗浄した後、未知のサンプル及び既知の I A I P 標準を T B S + 0.1% T w e e n 20 中で希釈し、マイクロプレートに加えた ( 最終容積 50  $\mu$  L / ウェル ) 。サンプル及び段階希釈 I A I P 標準溶液を 32 で 1 時間インキュベートした。マイクロプレートを T B S - T で数回洗浄した後、ビオチン化 L P S を 20 m M 酢酸 + 25 m M N a C l、p H 4.0 ( 1 : 32, 000 ) を含む緩衝液中で希釈し、ウェル当たり 50  $\mu$  L を加えた。ビオチン化 L P S を 32 で 30 分間インキュベートし、次いでマイクロプレートを T B S - T を使用して少なくとも 3 回洗浄した。最終的に、1 : 10, 000 ( 50  $\mu$  L / ウェル ) に希釈した H R P - コンジュゲート化ストレプトアビジン ( P i e r c e ) をマイクロプレートに加えた。洗浄後、50  $\mu$  L の基質 T M B を加え ( N e o g e n E n h a n c e d K - B l u e T M B 基質 )、50  $\mu$  L 1 M H C l を加えることにより反応を停止し、分光光度計 ( M o l e c u l a r D e v i c e s ) で 450 n M 波長で色変化を読み取った。4 点ロジスティック回帰 ( S o f t M a x P r o ソフトウェア、M o l e c u l a r D e v i c e s ) を用いて標識曲線を生成し、図 3 C に示すように、最大 I A I P 濃度 2.0  $\mu$  g / m L から連続 2 倍希釈で 0.03125  $\mu$  g / m L までの 7 点曲線をプロットした。

10

20

## 【0159】

## 実施例 3 : 重症市中感染肺炎 ( s C A P ) と診断された患者由来の血液サンプルの分析

R h o d e I s l a n d H o s p i t a l の集中治療室に入院している s C A P の確定診断を有する患者から連続血液サンプルを収集した。16 人の患者を本研究に登録し、0 ( I C U 入室時 )、1、3 及び 7 日目に血漿を収集した。確立された競合 E L I S A ( 図 2 A ) 及び両サンドイッチ型 E L I S A を用いて、ビオチン化ヘパリン又はビオチン化 L P S を検出分子として使用して、I A I P のレベルを決定した ( 図 3 A ) 。17 ~ 71 歳の 95 人の健康な対照からの血液サンプル ( 健康な血液ドナーから得られ、R h o d e I s l a n d B l o o d C e n t e r から購入された ) を、健康対照における I A I P レベルと s C A P 患者で測定したレベルとの比較のために、この研究に含めた。結果を図 4、5 及び 6 に示す。

30

## 【0160】

結果は、入院時及び疾患進行中 ( 7 日目まで ) に、I A I P レベルが健康な対照と比較して s C A P 患者で有意に低かったことを示す。従って、I A I P レベルは予後の評価と治療決定を行う際に医師を導くために使用できる。競合 E L I S A は s C A P 患者の I A I P レベルの低下を示したが、ビオチン - コンジュゲート化ヘパリン及び / 又は L P S を特異的結合リガンドとして使用した「サンドイッチ型」E L I S A アッセイでは、より統計的に有意な結果が得られた ( p 値 = 0.0001、健康な対照と比較した 0、1、3 及び 7 日目の I A I P レベルの間 ) 。ビオチン - コンジュゲート化ヘパリン及び / 又は L P S を使用した「サンドイッチ型」E L I S A アッセイでも、s C A P 患者の I A I P 濃度は低く、s C A P 患者と健康な対照で測定した I A I P 濃度の間に大きな差が生じた。これらのデータは、標識 I A I P リガンドを使用する「サンドイッチ型」E L I S A アッセイが、競合 E L I S A アッセイよりも感度が高く、潜在的に精度が高いことを示す。

40

## 【0161】

R h o d e I s l a n d H o s p i t a l の集中治療室に入院した敗血症を有する対象由来のサンプルを評価するためにも、同じアッセイを用いた。これらのアッセイは類似した結果をもたらした。正常な健康な対照の I A I P 値は、競合 E L I S A ( 平均  $\pm$  S E M = 328.9 + 6.34  $\mu$  g / m L ) 及び両 L P S 又はヘパリン - I A I P アッセイ ( 337.7  $\pm$  9.05 及び 421.8  $\pm$  14.47  $\mu$  g / m L ) で類似しているが、肺

50

炎及び敗血症群における I A I P のレベルは、競合 E L I S A で有意に高く、これは疾病群と健康な対照との間で低い統計的有意差をもたらし、又は統計的有意差がなかった（図 8 A ~ 8 C）。

#### 【 0 1 6 2 】

実施例 4：I A I P に対するヘパリンの結合の分析

I A I P に対するヘパリンの特異的結合の評価を、ウェスタンブロット分析を用いて行った。高度に精製した I A I P ( 1  $\mu$  g )、正常ヒト血漿 ( 1  $\mu$  L )、精製ビクニン ( 注射用ウリナスタチン、T e c h p o o l、2  $\mu$  g ) 及び陰性対照としてのヒト血清アルブミン ( H S A、2  $\mu$  g ) を 7 . 5 % S D S - P A G E ゲル上で分離し、ニトロセルロース膜に転写した。5 % 無脂肪粉乳でブロッキングした後、ニトロセルロース膜をビオチン - コンジュゲート化ヘパリン ( T B S 中 1 : 5 0 0 ) と室温で一晩インキュベートした。T B S + 0 . 0 5 % T w e e n で数回洗浄した後、H R P - コンジュゲート化ストレプトアビジン ( 1 : 1 5 , 0 0 0 ) を加え、室温で 1 時間インキュベートした。洗浄後、基質金属増強 D A B ( P i e r c e ) を加えて反応性バンドを可視化した。

#### 【 0 1 6 3 】

ビオチン - コンジュゲート化ヘパリンは、レーン 2 ( 図 7 ) に示すように、M A b 6 9 . 2 6 ( ヒト I A I P に対するモノクローナル抗体 ) と同様、精製 I A I P ( 2 5 0 k D a I I 及び 1 2 5 k D a P I ) に特異的に結合した。軽鎖 ( ビクニン ) に結合した M A b 6 9 . 2 6 ( レーン 3 ) とは対照的に、ビオチン - コンジュゲート化ヘパリンは I A I P の軽鎖に結合せず、ヘパリンが重鎖を介して I A I P に結合することが示唆された。I A I P の重鎖はヘパリンに特異的に結合しているようである。

#### 【 0 1 6 4 】

ヒト血漿中のビオチンコンジュゲート化ヘパリンによって複数の反応性タンパク質バンドが検出され ( 図 7、レーン 1 )、H S A への結合は検出できなかった。

#### 【 0 1 6 5 】

更に、遊離ビクニンはヘパリン - I A I P 又は L P S - I A I P E L I S A では検出されず、インタクト重鎖を有する I A I P 複合体のみがヘパリン又は L P S - I A I P E L I S A を用いて測定されることが示唆された。これらのデータは、ヘパリン及び / 又は L P S ( 又は I A I P リガンド ) を使用したサンドイッチ型 E L I S A が、競合 I A I P アッセイ ( 図 2 A ) 等の他の既知の I A I P アッセイと比較して精度及び頑健性を高めた対象 ( 例えば、病的状態の対象 ) における循環 I A I P 複合体の評価を提供することを示す。

#### 【 0 1 6 6 】

実施例 5：固定化された血漿由来 I A I P に対するビオチン化 L P S の結合

I A I P に対する L P S の直接結合をインビトロで研究するために、I A I P 及び他の対照タンパク質 ( B S A = ウシ血清アルブミン ; ビクニン ( I A I P の軽鎖 ) ; 並びにモノクローナル抗体 M A b 6 9 . 2 6 の精製 I g G ) を 1 0 0 0  $\mu$  g / ウェルで 9 6 ウェルマイクロプレート ( G r e i n e r M i c r o l o n 6 0 0 ) 上に固定化し、無脂肪粉乳 ( T B S + 0 . 1 % T w e e n 2 0 中 5 % ) でブロッキングした。洗浄後、1 0 0  $\mu$  g ビオチン化 L P S ( 大腸菌 ( E s c h e r i c h i a c o l i ) O 5 5 : B 5 由来のリポ多糖、S i g m a から購入、C a t # L 2 8 8 0 ) を各ウェルに加え、T B S + 1 5 0 m M C a C l <sub>2</sub> 緩衝液中で室温で 1 時間インキュベートした。T B S + 0 . 1 % T w e e n で数回洗浄した後、H R P - コンジュゲート化ストレプトアビジンを加え、1 時間インキュベートした。最終的に、T M B 基質を加え、1 M H C l 溶液を加えることにより反応を停止した。色変化及び吸光度を 4 5 0 n M で分光測定により測定した。L P S に結合することが記載されているため ( D a v i d S A、e t a l . , I n n a t e I m m u n i t y 1 9 9 5 ; 2 ( 2 ) : 9 9 - 1 0 6 ) 陽性対照としての役割を果たした B S A 又は M A b 6 9 . 2 6 の I g G ( 陰性対照 ) と比較して、I A I P に対するビオチン化 L P S 分子の有意な結合が見出された ( 図 9 )。L P S は I A I P の軽鎖 ( ビクニン ) に有意に結合せず、I A I P の重鎖が L P S に対する結合を促進することが

示唆された。結合は又、グリコサミノグリカン鎖により介在され得る。

【0167】

実施例6：固定化LPSに対するビオチン化IAIPの結合

前の実験を逆にして、ビオチン化IAIP(4 $\mu$ g/ウェル)を加え、固定化LPS(100 $\mu$ g/ウェル)、BSA(2 $\mu$ g/ウェル)、陽性対照としてのMAb 69.26のIgG(2 $\mu$ g/ウェル)、及び陰性対照(ブランク)としての無脂肪粉乳(2 $\mu$ g/ウェル)に対して1時間固定化した。数回の洗浄後、HRP-コンジュゲート化ストレプトアビジンを加え、続いてTMB基質をマイクロプレートウェルに加えた。固定化LPSに対するビオチン化IAIPの有意な結合を検出した一方、固定化BSA又は無脂肪粉乳に対するIAIPの有意に低い結合が観察された(図10)。この実験で陽性対象としての役割を果たしたMAb 69.26(ヒトIAIPに特異的なモノクローナル抗体)のIgGは、ビオチン化IAIPに強く結合した。

10

【0168】

実施例7：IAIP-LPS結合に対するpH効果の分析

IAIPとLPSの結合を更に特徴付けるために、同様の固相結合実験を行った。ビオチン化IAIPを様々なpH条件下で固定化LPS、MAb 69.26のIgG(陽性対照)、又はBSA(陰性対照)と共にインキュベートした。低pH溶液(pH3~6)には酢酸塩緩衝液(50mM)を用い、中性又は高pH溶液(pH7~9)を得るためにTris-HCl緩衝液(50mM)を用いた。ビオチン化IAIPはpH5で強く結合したが、pH3又は4では結合は観察されなかった(図11)。pH5を超えて上昇したときにIAIPの結合の低下が観察された。IAIPのその特異的モノクローナル抗体MAb 69.26への結合は、pH7でピークに達したが、興味深いことに、pHをpH9まで上昇させても有意な変化はなかった。同様に、pH3及び4ではモノクローナル抗体へのIAIPの結合は無視できた。ビオチン化IAIPとBSAの間には結合は観察されなかった。結果は、IAIPとLPSの間の最適結合がpH4~7の範囲、特に約pH5で起こることを明らかに示唆する。

20

【0169】

実施例8：IAIP-LPS結合に対する塩濃度の効果の分析

ビオチン化IAIPとマイクロプレート上の固定化LPSとのインキュベーション中、増大する量の塩(NaCl)を緩衝液に加えることにより、塩濃度の効果を研究した。LPSに対するIAIPの結合は、塩濃度の増大に伴い減少したが、この減少は、塩濃度1200mMでも有意ではなく、LPSに対するIAIPの結合は、この実験で陽性対照として使用した、ヒトIAIPに対するモノクローナル抗体(MAb 69.26)に対するIAIPの特異的結合と同様に、比較的強く特異的であることが示唆された(図12)。

30

【0170】

実施例9：IAIP-LPS結合に対する非イオン性洗剤(NP-40及びTween-20)の効果の分析

固定化LPSに対するビオチン化IAIPの結合に対する、増大する濃度の非イオン性洗剤ノニルフェノキシポリエトキシエタノール(NP-40)(図13)及びTween 20(図14)の効果の研究するために、更なる検討を行った。0.05%(w/w)NP-40又はTween-20が、LPSに対するIAIPの結合反応に添加された場合、洗剤を添加しないTBS緩衝液単独と比較して、結合の増大が観察された。低い洗剤量は、LPSに対する結合を促進し得、LPS分子の脂質結合ドメインがこの相互作用に関与し得ることが示唆される。洗剤の量が1%まで増加された場合でも、殆どのIAIPが尚LPSに結合していたため、IAIPの結合は尚、比較的強く、インビトロでのIAIPとLPSの強い相互作用が示された。同様に、ビオチン化IAIPは高い特異性及び親和性でMAb 69.26に強く結合し、1%までの洗剤の添加は結合を有意に変化させなかった。対照的に、陰性対照(BSA)はIAIPに対する結合を示さなかった。

40

【0171】

50

### 実施例 10：迅速側方流動イムノアッセイ（LFI A）を用いた I A I P の定量化

本明細書に記載される方法は、側方流動イムノアッセイ（LFI A）を用いた I A I P の迅速定量化に使用することができる。実施例 1～3 に記載し及び用いた「サンドイッチ型」I A I P E L I S A を、重篤な炎症状態（例えば、新生児敗血症（NS）及び壊死性腸炎（NEC））の高い危険性を有する対象（例えば、乳児、青少年又は成人）の特定に使用できる LFI A、ポイントオブケア（POC）の、迅速な、信頼できる定量的及びユーザーフレンドリー試験に適合させることができる。LFI A は、a) 20～700  $\mu\text{g}/\text{mL}$  I A I P の線形範囲を測定し；b) 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  付近（例えば、約 100～約 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）で I A I P レベルの高い精度を示し（例えば、< 5% の可変性又は誤差）；c) 1 時間以下（例えば、15 分間以下、例えば 10、7、又は 5 分間以下）で結果が得られ；及び d) 血漿又は全血サンプルの少量のサンプル容積 < 150  $\mu\text{L}$ （例えば、150、100、75、50、25、15  $\mu\text{L}$  以下）を必要とすることができる。

10

#### 【0172】

試験は、対象（例えば、未熟児、乳児、青少年又は成人）における調節不全炎症性応答の迅速な特定に使用することができる。早期の介入は、炎症性疾病若しくは状態又は感染症を経験している患者の生存率を改善するのに重要であることが既知である。

#### 【0173】

新生児において、例えば、早期介入プロトコルを適用する能力は、多くの場合、そのような状態（例えば、NS 及び NEC）を重篤さが低い他の疾病から特定することの困難さにより制限される。I A I P の卓越した陰性予測値は、例えば、現在の試験では情報が得られなかった対象（例えば、乳児、青少年、又は成人）における抗生物質処置の早期終了のような、困難な決定を行うよう臨床医を導くことを助け得る。更に、治療的タンパク質として、I A I P は、臨床的に病気の対象（例えば、乳児、青少年、又は成人）に有益であり得、血液レベルは有用なセラノスティックマーカーの役割を果たして、医師が I A I P 又は他の付随的治療薬との代替療法に関する情報に基づく決定を行うこと及び疾病進行を監視することを助け得る。

20

#### 【0174】

短時間（例えば、15 分以下）で読み取り可能な性格な定量的結果を有する単純な、ユーザーフレンドリーな携帯型装置を使用して、処置（例えば、抗生物質処置）の開始及び期間等の治療的決定に影響を与えるのに使用できる、I A I P に基づく迅速ポイントオブケア試験は、革新的であるだけでなく、病的状態及び死亡率の低減を助けるのに臨床的に有用である。

30

#### 【0175】

LFI A は、対象由来のサンプルを試験片（例えば、セルロース、ガラス繊維、又はニトロセルロース）に加え、次いで緩衝液を使用してこれを試験片内に押し出すことを含む。試験片は、I A I P 結合剤（例えば、I A I P 特異的抗体又は I A I P リガンド）を含む。標識された検出剤（例えば、I A I P 特異的抗体又は I A I P リガンド）は、サンプルの前、後、又は同時に試験片に加えられ、I A I P の迅速定量化のための標準方法を使用して可視化され得る。

#### 【0176】

a) 金 - コンジュゲート化試薬：金ナノ粒子を、その優れたコロイド安定性により、（LFI A）フォーマットにおいて試薬を標識するのに使用し得る。ヒドラジドで機能化した金ナノ粒子の安定な製剤は、市販されている（Innova Bioscience）。通常、抗体は、検出剤としてのコロイド金に共有結合されるが、ヘパリン又は LPS は、Innova Coat 金ナノ粒子を使用して、それらの糖鎖を介して同様にコンジュゲート化され得る。LPS 及びヘパリンの金コンジュゲーションは、小規模で行われ、それらの安定性及び LFI A における性能を試験することができる。

40

#### 【0177】

b) LFI A の捕捉、検出、サンプル試薬及び条件の最適化：下記に説明する競合 LFI A 開発の経験を踏まえて、捕捉ライン上の MA b 69.26 の調製及びコーティング

50

条件、並びにブロッキング剤、界面活性剤及び炭水化物等の他の因子を、非特異的結合を低減し、フロー特性を改善するように選択し得る。干渉及び非特異的結合を低減する最適希釈因子及び好適な希釈剤も決定し得る。実験の多因子デザイン(D o E)を使用して以下のパラメータの相互作用を決定し得る：1) 結合剤濃度、2) コーティングpH及び緩衝液タイプ(範囲 = 4 ~ 10)、3) コーティング持続時間及び4) ブロッキング剤のタイプ(例えば、ウシ血清アルブミン、魚ゼラチン等)。

【0178】

c) 試験片構成要素、ハウジング及びリーダー：サンプルウェルを有するプラスチックカセット内に試験片を収容し、試験片の適切な範囲上に試験読み取り窓を配置し得る。様々な標準化された試験片の寸法構成を使用することができる。D e t e k t又はE S E Q u a n tリーダーに適合可能なもの等の好適なハウジングを選択し得る。サンプル及びコンジュゲートパッドの組成、並びにニトロセルロース膜の細孔サイズを、所望の毛細管現象速度を達成し、従って、検出試薬とのサンプルの反応時間を達成するように選択し得る。

10

【0179】

L F I A性能目標は、以下に記載するように、例えば、製剤及び試験ライン試薬のストライピング条件のためのプロセス、検出分子(例えば、L P S又はヘパリン)のコンジュゲーション方法、及び検出剤の滴定、並びにパッド及びウィックの最適材料及び寸法を変化させることにより最適化することができる：

20

【0180】

a. 試験及び対照ラインの最適化。膜ストリッピング条件は、試験片の試験ライン(M A b 69.26)及び対照ライン(L P S - 結合タンパク質又はヘパリン - 結合タンパク質(例えば凝固因子I Xに対する)の両方のために最適化することができる。L F I A膜の頑強な製造手順として、37 で30分間の乾燥期間を用いて試験及び対照ラインを固定化し得る。多因子D o Eを使用して、以下の膜ストリッピングパラメータの相互作用を決定し得る：1) 結合剤濃度、2) pH及び緩衝液タイプ(範囲 = pH 4 ~ 10)、3) 塩濃度及び4) ストライピング容積(1 ~ 3  $\mu$ L / 試験片)及びインクジェット速度。初期の最適化研究から膜ストライピングの改善を組み込む。多因子D o Eは、様々な濃度(0 ~ 1  $\mu$ g / 試験片)のタンパク質ブロッカー、界面活性剤、炭水化物、及び、金粒子非特異的結合を低減し又は膜のフロー特性を改善し得る他の薬剤を共被覆する膜の有効性の決定にも使用することができる。本発明者らの固相結合研究に基づいて、L P S及びヘパリン結合は、5未満のpHでI A I Pに対して有意により強かった。同様の条件をL F I Aにおいて使用することができる。

30

【0181】

b. 試験片パラメータの最適化。サンプルパッド及びコンジュゲートパッドの組成、並びにニトロセルロース膜の細孔サイズは、毛細管現象の速度、従ってサンプルと金検出試薬との反応時間に影響を与え得るため、所望の結果を達成するように選択することができる。本発明者らは、高流速NC(H F 090、M i l l i p o r e)が、感度及び結果までの時間に関して、設計仕様を満たすと判定した。D o Eを使用して、アッセイ用のフィルター、並びにパッド及びウィック材料のタイプを評価することができる。同様に、サンプルパッド及びコンジュゲートパッドのサイズ及び形状を、所望の結果を達成するように調整することができる。

40

【0182】

サンプルパッドを：1) 未希釈サンプルを受容し、2) 非特異的結合を最小限にするのに必要なフォーミュラを提供し、及び3) 全血サンプルを受容するように最適化し得る。下記に論じる競合I A I Pプロトタイプ迅速試験は、希釈サンプル(1 : 5)を使用し、これは生のサンプル容積が試験片に進入する必要性を軽減し、非特異的結合課題を軽減するブロッキングタンパク質及び界面活性剤を含有した。製剤ベースのサンプルパッド(例えば、乾燥フォーミュラ)は、成分(例えば、タンパク質ブロッカー、界面活性剤等)及びそれらの濃度に関して開発することができる。干渉及び非特異的結合を効果的かつ高い

50

信頼性で低減するのに使用できる、入手可能なイムノアッセイ添加物が存在する。候補薬剤のスクリーニング研究の次に多因子D o Eを行って、例えば、ブロッキング剤の最適濃度を決定することができる。

【0183】

L P S 及びヘパリンのコンジュゲーション技術は、金コロイド（ナノ粒子）及び染色ラテックス粒子ベースのコンジュゲーション技術との使用について評価することができる。

【0184】

c . 血液分離濾過膜及びプラスチックハウジングカセット。乾燥サンプルパッドフォーマミューラに加えて、赤血球細胞を排除するのに好適なインライン血液分離フィルター膜を全血サンプルのために操作し得る。目標は、プロセスを簡略化し、迅速試験フォーマットの試験を、特に例えば指の針から又は収集管を介して収集した全血に直接適用する際、ポイントオブケアにおける研究室外の適用のために、ユーザーフレンドリーとすることである。Vivid（商標）又はCytosep（商標）膜（Pall）又は他の製造業者（GELifesciences）等の、これら血液フィルターの多数のタイプが市販されており、LFIAに使用することができる。試験片のためのプラスチックハウジングの寸法は、リーダー（例えば、Detektリーダー）と共に使用するよう選択することができる。

10

【0185】

本発明者らは、ハンドヘルドDetekt（商標）リーダーモデルRDS - 150 PRO（Detekt Biomedical, Austin, TX）がLFIAに使用できると判定した。迅速試験リーダーのためのDetektの光側方流動リーダー技術は、現在、食物及び飲料安全性試験、生物学的脅威の検出、環境モニタリング及び動物健康の商業的診断装置に使用されている。リーダーは、試験片を光学的に走査し、試験及び対照ラインシグナル強度を、プログラムされた較正アルゴリズムと比較するハンドヘルド装置である。シグナル統合ソフトウェアをIAIP用量 - 応答曲線を解釈するためにカスタマイズすることができ、このアルゴリズムはDetekt（商標）ユニットに常駐することができる。Vision Suite Pro開発者のキットソフトウェアプログラムを製造業者、Detekt Biomedical LLC in Austin, TXと連携して使用して、DetektリーダーによるIAIP試験片の解釈を統合することができる。IAIP結合曲線形状及び内部対照に基づくソフトウェアアルゴリズムを開発して以下の機能を実行することができる：a）試験ラインシグナル強度に対するIAIP結合曲線の形状の確立；b）試験片の実行の日々の変動の修正のための、おそらく対照ラインシグナルに基づく内部対照の確立、及びc）リーダーに組み込むための（例えば、バーコード走査を介した）キットロット固有の情報のためのソフトウェアの確立。

20

30

【0186】

開発及び最適化されたサンドイッチ型IAIP迅速試験の性能（上記及び本明細書に論じたパラメータによる）は、前臨床設定で評価することができる。LFIAカセットは、以下のように試験することができる：

【0187】

a）分析感度、報告範囲及び精度 - 可能なIAIP濃度範囲（25 ~ 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）に及ぶ既知のIAIP濃度のサンプル/対照を、複数の操作者（N = 3 最小）により、複数の日に亘って（N = 10）複数の反復で試験することができる。データを分析して、アッセイカットオフ点（150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ に設定）の精度を含む、IAIP結合曲線の全スポットにおける精度を確立することができる。

40

【0188】

b）妨害物質 - 既知のIAIP濃度のサンプルプールを潜在的な妨害物質でスパイクして、用量回復に対する効果を決定することができる。Clinical and Laboratory Standards Institute（CLSI）EP - 07Aプロトコルを、参照に使用することができる。患者サンプル中で高い濃度にあることが見出され得る物質（例えばヘモグロビン、ビリルビン、ヒトIgG等）のストック溶液を、I

50

AI P サンプル中にスパイクし、試験することができる。

【0189】

c) ユーザーの堅牢性評価 - 既知の I A I P 濃度のサンプルプールを使用して、エンドユーザーにより生成される様々なシナリオ / エラーに対する試験片の堅牢性を検証することができる。試験されるパラメータには：1) 追加される不正確なサンプル容積 (+ 25%)、2) 研究室の環境条件 (温度 65 ~ 85 ° F ; 湿度 10 ~ 70 % R H ) 及び 3) 不正確な試験片読み取り時間 (+ 50 ~ 100 % 推奨) が含まれる。

【0190】

d) 製品の保管期間安定性 - I A I P 試験キットを異なる温度レジメン (例えば、周囲及び 37 ) 下で保管し、既知の I A I P 濃度の I A I P 対照の組を使用して製造後の様々な間隔 (> 1 年) で試験して、製品の安定性を決定することができる。

10

【0191】

e) 予備的臨床サンプルにおける感度及び特異性 - 製品は、対象 (例えば、NS 及び NEC が疑われ並びにそれらの診断が確認された乳児) 由来の臨床サンプルを使用して試験することができる。

【0192】

観察的臨床試験にて I A I P 迅速試験を評価するために、日常的な臨床評価及び管理を受けている対象 (例えば炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有し又はその危険性を有する対象) からサンプルを収集することができる。同じ炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有する対象の、幅広い異質集団を看護する多数の施設からのデータの獲得を用いて、十分な数の対象を提供し、I A I P と疾病又は感染症との間に関連性を強化することができる。I A I P レベルをリアルタイムで提供できるポイントオブケアベッドサイド装置は、不必要な介入の使用、又は不必要な処置 (例えば、抗生物質療法) の長期化の除去を補助することができ、入院の長さ / 費用を低減することができる。

20

【0193】

I A I P L F I A は、以下のように、対象の臨床評価に使用することができる：

【0194】

1) 血液サンプルの収集：サンプルは、様々な医療施設における炎症性疾病又は状態を有し又は発症する危険性を有する対象から収集することができる。年齢、体重、性別、及び研究室結果を含む全対象の臨床及び人口統計データを記録することができる。様々な時点 (例えば、0、24、48、72 時間) 及び 7 d) で収集した同じ対象からの連続サンプルも、L F I A に使用することができる。L F I A を使用して、I A I P レベルが疾病の重症度及び進行に相関するか否か、I A I P レベルが危険性又は続く疾病を予測するか否か、及び対象がより重篤な疾病を発症するか又は以後の治療法を改善するか否かを決定することができる。

30

【0195】

2) 検出力分析：炎症性疾病若しくは状態又は感染症を有する対象の予備データ及び確立された研究を、サンプルサイズ見積もりに使用することができる。

【0196】

3) 血液分析：収集した臨床血漿サンプルを研究バイアル内に移動し、標識し (非特定化)、試験まで凍結状態で保存することができる。I A I P レベルは室温で 24 時間、日常的な冷却臨床保存下で 14 日間まで、20 で無制限に安定である。

40

【0197】

I A I P レベルは、比較研究のために、L F I A 迅速 I A I P 試験及びサンドイッチ型 I A I P E L I S A を用いて分析することができる。I A I P 迅速試験 L F I A の概念実証の評価のために、本発明者らは、図 2 A に示すものと同様の競合 L F I A を用いて測定するよう設計した試験片カセットを生成した。下記に記載する、このイムノアッセイフォーマットを使用して生成したデータは、サンドイッチ型フォーマット (図 3 A に示すものと同様の) に基づく L F I A も使用できることを確認する。競合 L F I A を下記に記載する。

50

## 【0198】

新生児における敗血症及び全身炎症性応答症候群

集中治療における進歩は、対象の生存率の実質的な改善をもたらした（例えば、乳児、特に早産、非常に低出生体重（VLBW）（ $< 1,500\text{g}$ ）の乳児）。しかしながら、未熟児は、日和見感染症、並びに急性の重篤な状態新生児敗血症（NS）及び壊死性腸炎（NEC）に罹りやすい。最近の多施設検査では、21%までのVLBW乳児が遅発性の（生後 $> 72$ 時間）血液培養物により判明した敗血症の少なくとも1つの症状の発現に遭遇し、7%までのVLBWがNECを発症することが示唆されている。NS及びNECは、有害な神経発達転帰を含む重大な病的状態に関連し、NS（10~30%）及びNEC（16~42%）における比較的高い死亡率を有する。これらの新生児疾病の早期の前兆及び症状は、非特異的であり、目立たない場合が多く、気管支肺異形成症、未熟児の無呼吸、胃食道逆流、又は機能的腸管運動不全の悪化等の非感染性病因学に起因して容易に間違え得る。より憂慮すべきは両疾病における臨床的悪化が劇的に進行して、臨床症状の数時間以内にショック、播種性血管内凝血、及び死をもたらすことである。重篤な疾病及び死に進行する患者の危険性について医師をおおまかに導く迅速試験は現在存在しない。

10

## 【0199】

NECの正確な原因は未だ明らかではないが、NEC病態形成は、感染病原体が腸管上皮層を横切って移動し、自然免疫防御を逃れ、続いて炎症及び組織壊死を引き起こす際にもたらされると広く考えられている。NS及びNECの両方は、全身炎症性応答に関連している。非特異的であり、初期段階では微妙なそれらの臨床症状は、非常に類似している。更に、NS及びNECは、多くの場合、同じ疾病症状の発現において共存する（例えば、症例-対照研究において、敗血症を有するNECは、NECの症例の3分の1に生じた）。迅速な抗菌剤処置と支持療法による迅速な医学的管理が両状態に対する標準治療である。このように、これらの潜在的に致死的な状態の危険性を最も早い機会に特定することは実際的かつ臨床的に重要である。

20

## 【0200】

炎症性疾病又は感染症（例えば、NS及び/又はNEC）の早期かつ正確な特定のためのバイオマーカーは、従来試験では情報が得られなかった対象（例えば、乳児）における抗生物質処置の初期の使用及び継続、又は早期の終了に関する困難な決定を医師が行う上で非常に有用であろう。残念ながら、臨床的に有用であり、又これらの困難な疾病の管理に有効な、広く利用可能なバイオマーカーは現在存在しない。最近、プロカルシトニン（PCT）は、下気道感染症及び敗血症を有する患者の抗生物質処置の管理を助けるバイオマーカーとして認められているが、このマーカーは、細菌感染症のみに特異的であり、ウイルス又は他の非細菌感染症を原因とする全身炎症性状態の検出には感度を有さない。更に、PCT試験の使用は、小児患者、特に生後数日間の未熟児において依然として議論の余地がある。従って、炎症性疾病プロセスの重症度に関する情報を提供する高感度のバイオマーカーは、炎症性疾病又は感染症（例えば、未熟児におけるNS及びNEC）の管理において臨床的に有用であろう。これは依然として大きな課題である。

30

## 【0201】

全身炎症及びより「局在性」の疾病（特発性腸管穿孔）を有する乳児の検出における、IAIPの予測値の他のマーカーとの比較試験

本発明者らは、IAIPが卓越した重症度のバイオマーカーであり、NECをより限局性の炎症性疾病、特発性腸管穿孔（SIP）と区別できることを確認する。IAIP試験は、SIPからNECを区別して診断する上でCRPよりも優れている。

40

## 【0202】

IAIPは、疾病の重症度、例えば、局部炎症性応答（SIP）、対、全身及び潜在的に重篤な炎症性応答（NEC及びNS）を識別することができる。本発明者らは、Providence、RIのWomen & Infants' Hospitalの新生児敗血症（NS）、壊死性腸炎（NEC）及び特発性腸管穿孔（SIP）を疑われる95人

50

の乳児（64人の女児及び31人の男児）からの血液サンプルを収集した。個々の各患者から入手可能な場合、連続サンプルも収集した。殆どの乳児は<30週の妊娠期間（23~31週の範囲）であり、1235グラムの平均出生体重を有した。これらの収集サンプルから、本発明者らは、証明されたNECを有する8人の乳児、SIPを有する9人の乳児及びNSを有する20人の乳児を得た。本発明者らは以前にIAIPアッセイをNSに関する陽性及び陰性予測値の決定に使用したため、本発明者らは、NEC等の全身炎症性疾患状態と、SIP等のより「局在的」及び限局的な壊死性疾患状態におけるIAIPレベルの予測値を評価した。本発明者らは、性別、体重及び妊娠期間一致対照に対する、これらの乳児におけるIAIP及び他の炎症性バイオマーカーC-反応性タンパク質（CRP）のレベルも比較した。ヒトIAIP（MAb 69.26）に対して特異的な単一のモノクローナル抗体を使用する競合ELISAを用いて血液IAIPのレベルを測定し、CRP ELISAキットを使用してCRPレベルを盲検的に分析した。健康な乳児（ $p < 0.05$ ）及びSIPを有する乳児（X線写真NECはない、 $p < 0.005$ ）と比較して、NECと診断された乳児（修正されたBellのステージII以上）において、IAIPレベルの有意な低下が見られた。しかしながら、SIPを有する乳児と健康な対照との間に有意差は見出されなかった。対照的に、NEC及びSIPを有する両方の乳児においてCRPのレベルの増大が見出されたが、この増大は統計的に有意ではなかった（ $p > 0.05$ ）（図15A、15B参照）。更に、カットオフ値<4におけるCRPの受信者動作特性（ROC）は、感度100%、特異性64.7%、陽性予測値（PPV）18.7及び陰性予測値（NPV）100で0.65（ $p = 0.01$ 、95%CI；0.54~0.90）の曲線下面積（AUC）を生成し；一方、IAIPのROCは、カットオフ値<207mg/Lで堅牢なAUC0.98（ $p < 0.0001$ 、95%CI；0.84~0.99）を提供した。IAIPの予測値は、感度100%、特異性88.2%、PPV 41、及びNPV 100でCRPと比較して優れていた（図16A、16B）。

10

20

30

40

50

#### 【0203】

乳児由来の複数の連続サンプルは、NEC及びSIPの発症の前後に、数人の（全員ではない）乳児から入手可能であった。本発明者らは、更に、確立されたIAIP競合ELISAを用いてIAIPレベルを分析した。NECを有する乳児のIAIPレベルは、診断時及び処置の開始後、SIP患者に見出されるレベルと比較して有意に低かった（図17）。これらは、残留する血液収集物からのみ入手可能な好都合なサンプルであった。これら結果は、IAIPレベルがNEC（NSに加えて）等の重篤な全身炎症性状態を高い感度及び特異性で特定する有用なバイオマーカーであることを示し、IAIPレベルは又、SIP患者において、比較的軽微な状態ではないNECを区別するように思われる。IAIP試験は、NEC（100%）及びNS（98%）の両方で卓越したNPVを示した。IAIP試験を用いて、従来試験では情報が得られなかった乳児における早期停止等の、処置（例えば、抗生物質処置）決定を導くことができる。

#### 【0204】

血液IAIPレベルを測定し、NS及びNECを検出する、IAIPのための定量的競合側方流動イムノアッセイ（LFIA）のプロトタイプ開発

a) 試験フォーマット及びアッセイ構造の選択：側方流動イムノアッセイベースの試験を、IAIP迅速試験のフォーマットのために選択した（図18参照）。LFIAは、1)少量のサンプル容積を使用する；2)特徴付けられた動態に従い、試験結果に迅速インターバルを提供する；3)分析的に高感度及び正確である；4)通常、装置の適切な性能を検証する内部対照を含む；5)よく特徴付けられた及び広く入手可能な原料から作製される；並びに6)試験片リーダーを使用して定量的に分析できるシグナルを生成する：ように設計されているため、迅速ポイントオブケアアッセイを開発する際に多数の利点を提供する。従って、LFIAは、IAIP迅速試験として、例えばポイントオブケア設定にて使用することができる。

#### 【0205】

b) L F I A の捕捉、検出及びサンプル試薬、並びに条件の最適化：当初の尽力により、側方流動イムノアッセイの捕捉、検出、サンプル試薬及び条件の最適化によって、確立された競合 I A I P E L I S A を競合 L F I A フォーマットに首尾よく取り入れることができた。本発明者らは、更に、用量応答曲線を確立し、又シグナルのタイミング、精度、及び迅速 I A I P アッセイフォーマットの再現性を評価した。試験結果のリーダーベースのデータ分析を、Q i a g e n 試験片リーダーを使用して採用した。これらの初期試験に続いて、本発明者らは、試験片及びアッセイ条件の最適化に進み、入手可能であり、かつ本発明者らの試験片に好適なくつかの携帯型リーダーを試験した。

【0206】

c) 精製 I A I P 及び I A I P に対するモノクローナル抗体 ( M A b 69.26 ) : 10  
両方の試薬は、競合アッセイフォーマットで使用される重要な成分である。本発明者らは、高い収率及び高い純度をもたらす、ヒト血漿から I A I P を単離するための拡張可能なバイオプロセス方法を開発及び最適化した。抗体のインビトロでの大規模生産のために、ハイブリドーマ細胞を拡張可能な C E L ライン培養フラスコ ( I n t e g r a B i o s c i e n c e ) 内で増殖させた。親和性タンパク質クロマトグラフィーによりハイブリドーマ上清から I g G を単離した。

【0207】

d) 試験片：試験片の複数のパイロットロットを調製し、選択されたフォーミュラは、ヒト血漿中の I A I P の定量的測定のための安定なプラットフォームである：1) サンプルパッド：緩衝液及び界面活性剤を有するセルロースパッド；2) コンジュゲートパッド 20  
：抗 I A I P ( M A b 69.26 ) 金コンジュゲート及びウサギ I g G 金コンジュゲートを有するガラス繊維パッド ( 対照ライン ) ；3) ニトロセルロース：試験される I A I P 及び試験される山羊 - 抗ウサギ I g G を有する迅速流動 ( M i l l i p o r e H F 0 9 0 ) ニトロセルロース ( 試験ライン ) ( 対照ライン末端ウィック：セルロースパッド ( フォーミュラなし ) ) 。

【0208】

e) サンプル：少量の血漿 ( 15  $\mu$  l の 1 : 5 希釈サンプル ) を試験片に加えた後、15  $\mu$  l の追跡緩衝液を加えて試験片を通してサンプルを押し出した。追跡緩衝液は、最適化されていた：2 m M T r i s p H 8 . 0 + 1 0 0 m M N a C l + 0 . 5 % B r i j + 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 + 1 . 0 % ウシ胎児血清。緩衝液に B r i j 界面 30  
活性剤を加えて、試験片の上流部分からのコンジュゲートの迅速除去を促進した

【0209】

f) 実行時間：血漿サンプル又は I A I P 標準物質 ( 3 つの異なる濃度で ) で試験を実行し、次いで、サンプル添加から 1 0 、 1 5 、 2 0 、 2 5 、 3 0 、 4 5 及び 6 0 分後に Q i a g e n リーダーにより定量化した。試験片は約 7 分で走り ( 即ち、ニトロセルロースは、無関係の金を除去していた ) 、その後の任意の時間に読み取ることができた。本発明者らは、15 分後にシグナルは劇的に変化しないことを見出した。従って、本発明者らは、サンプルを添加した後、15 分において試験片を均一に読み取った。

【0210】

g) 標準物質及び対照：E L I S A 結果に基づいて既知のヒト血漿 ( R h o d e I s l a n d B l o o d C e n t e r ) を、標準物質及び内部標準対照として使用した。血漿を 1 % F C S 含有緩衝液で希釈することにより、異なる用量を形成した。携帯型 Q i a g e n 試験リーダー ( E S E Q u a n t L F R ) を使用して、本発明者らは、17 . 5 ~ 1 1 0 0  $\mu$  g / m L の範囲の標準曲線を確立した ( 1 : 5 サンプル希釈を用いて ) 。日々巨る較正曲線の再現性は、一組の標準物質を 1 日のうちの異なる時間に、13 回まで、5 日間反復及び実行することにより試験した。結果を図 19 に示す。値の各々の平均及び S D をプロットした。結果は、試験が 5 日間に亘って卓越した変異係数 ( 15 % 未満の C V ) で狭い広がりを示したことを示す。

【0211】

h) 試験片リーダー及びソフトウェア：本発明者らの I A I P 迅速試験は定量的である 50

ことが意図されるため、本発明者らは、試験片が生成するシグナルを捕捉するためにリーダーを注意深く選択した。様々なタイプの試験片リーダーが市販されている。リーダーの選択は、工学、人間工学、及びソフトウェアロボラスチック等の特徴及び仕様に基づいていた。これは迅速試験の重要な部分であるため、本発明者らは、I A I P 迅速試験片のための異なる技術及び特徴を有する3つの異なるリーダーを試験した：1) 携帯型卓上側方流動リーダー (Q i a g e n による E S E Q u a n t L F R) ; 2) P D A ベースのハンドヘルドリーダー D e t e k t R D S 1 5 0 0 P r o ( D e t e k t B i o m e d i c a l , A u s t i n , T X ) 及び 3) スマートフォン/タブレットベースのリーダーシステム ( i C a l q リーダー - i C a l q , S a l t L a k e C i t y , U T ) 。本発明者らは、試験した他のリーダーよりも D e t e k t リーダーが 5 ~ 7 0 0  $\mu$  g / m L の範囲のより良好な線形曲線を生じることを見出した。

10

【 0 2 1 2 】

最適化アッセイのインター及びイントラ - アッセイ精度の決定

迅速試験のインターアッセイ精度特性を、収集した血液サンプル ( n = 6 ) を使用して、6日連続で反復して実行して決定した。続いて、結果を3つの異なる携帯型及びハンドヘルドリーダーを使用して読み取り、変異係数 ( C V ) を個々の各サンプルから得た結果から計算した。E S E Q u a n t リーダーを使用した I A I P 迅速試験の C V は、4 ~ 1 6 % の範囲であり、平均 1 3 % であったが、D e t e k t リーダーは平均 C V 1 0 % ( 5 ~ 1 6 % の範囲 ) を示し、i C a l Q スマートフォンベースのリーダーは、平均 C V 1 6 % ( 1 0 ~ 2 3 % の範囲 ) をもたらした。D e t e k t リーダーは、本発明者らが試験した他の2つのリーダーよりも低い C V を有し、より良好に働いた。試験のイントラ - アッセイ精度を評価するために、本発明者らは、8つの血漿サンプルを実行し、最適プロトコルに基づいて I A I P レベルを分析した。各サンプルから得られるシグナルを様々なリーダーで3回読み取り、確立された標準曲線に基づいて I A I P 値を個別に計算した。続いて、三重の読み取りから C V を決定し、2 ~ 8 % の範囲であることが見出され、試験した3つの全てのリーダーに関して 5 % の平均 C V であった。

20

【 0 2 1 3 】

乳児血漿における迅速アッセイの性能評価

W o m e n & I n f a n t s ' H o s p i t a l の乳児から収集したサンプルを使用して、本発明者らは、上述した I A I P 試験片に関する最適条件に基づいて、I A I P の分析を行った。得られたシグナルを3つの独立したリーダーを使用して連続して読み取り、リーダーの各々の標準曲線に基づいて結果を計算した。迅速試験の結果を、確立された競合 E L I S A アッセイにより得られた結果と比較し、個々の各サンプルの値を、迅速試験の結果に対してプロットした ( 図 2 0 A ~ 2 0 C ) 。結果は、6時間の競合 E L I S A と、E S E Q u a n t リーダー ( 0 . 8 3 2 の相関係数  $R^2$ 、n = 3 1 1 ) 及び D e t e k t リーダー (  $R^2 = 0 . 8 4$ 、n = 3 3 9 ) を使用して 1 5 分以内に生成した迅速競合 L F I A 試験結果との間で卓越した相関を示した。しかしながら、i C a l Q スマートフォンベースのリーダーは、特に高いレベルの I A I P ( > 6 0 0  $\mu$  g / m l ) を含むサンプルにおいて、E L I S A 結果と比較的相当しない試験結果を生成した。

30

【 0 2 1 4 】

要約すれば、本発明者らは、6時間の研究室ベースの競合 E L I S A を、血中の循環 I A I P ( 1 0 ~ 8 0 0  $\mu$  g / m L の範囲 ) を正確に ( E L I S A 結果と比較して相関係数  $R^2 > 0 . 8$  ) 1 5 分以内で測定することができ、許容可能なイントラ - 及びインターアッセイ精度 ( 2 0 % 未満の C V ) を有するポイントオブケア I A I P 迅速試験に転換することに成功した。本発明者らは、血液 I A I P レベルが、高い感度 ( 1 0 0 % ) 及び高い特異性 ( 8 8 % ) で、N S のみでなく N E C の有用な予測的マーカーであることを確認した。I A I P 試験は、N E C の検出において C R P 試験よりも特異的であり、I A I P レベルは S I P 患者から N E C を区別するのに有用である。

40

【 0 2 1 5 】

競合アッセイを L F I A フォーマットに適合させることに成功したため、本発明者らは

50

、本明細書に記載される「サンドイッチ型」I A I P E L I S A（例えば、図3Aに示すような）もL F I Aフォーマットに適合させることができると予想する。I A I Pの迅速定量化は、炎症性疾患若しくは状態又は感染症（例えば、敗血症、NEC、細菌感染症、又は他の疾患若しくは状態）を有し又は発症する危険性を有する対象（例えば、乳児、小児、青少年、又は成人等のヒト対象）の早期特定、及び最適治療法の適時開始をもたらし得る。

#### 【0216】

実施例11：ヒアルロン酸 - I A I P 固体結合アッセイ

ヒアルロン酸、ナトリウム塩（Sigma - Aldrich）をdH<sub>2</sub>Oに溶解し（ストック濃度1mg/mL）、更にpH9.0で20mM NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>緩衝液中に希釈した。ウェル当たり50、100及び200ngヒアルロン酸を96ウェルマイクロプレート（Greiner BioOne、Microton 600）上に37で120分間固定化した。pH7.3のTBS-T（20mM Tris緩衝生理食塩水溶液+0.05% Tween-20（v/v））中の5%無脂肪粉乳で37で60分間ブロッキングした後、TBS-Tで3回洗浄し、I A I P（TBS中のヒト血漿及び高純度I A I P）を含む段階希釈溶液をマイクロプレートに加え、37で60分間インキュベートした。地元の血液バンクから得た新鮮な凍結血漿の寒冷沈降によりヒト血漿を調製した。寒冷上清をこの実験に使用し、250µg/mLのI A I P濃度を有した。精製I A I Pは、開始濃度1mg/mLであった。次いで、マイクロプレートをTBS-Tで3回洗浄し、TBS中の1:1000希釈のビオチン-コンジュゲート化MAb 69.26（ヒトI A I Pに対するモノクローナル抗体）を加え、37で30分間インキュベートした。

#### 【0217】

TBS-Tで3回の追加の洗浄後、TBS中で1:5000に希釈したセイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）-コンジュゲート化ストレプトアビジン（Inova Bioscience）を加え、37で30分間インキュベートした。TBS-Tで3回洗浄した後、50µL Enhanced K-Blue TMB基質（Neogen）を各ウェルに加え、50µL 1M塩酸（HCl）を加えることにより反応を停止した。分光光度計（Molecular Devices SpectraMax Plusマイクロプレートリーダー）を使用して650nm波長で色変化を読み取り、ヒト血漿又は精製I A I Pに関する標準曲線を、50、100及び200ng/ウェル固定化ヒアルロン酸でプロットした（図21A、21B）。これらのデータは、ヒアルロン酸を使用してI A I P複合体分子を捕捉し、I A I Pの軽鎖に特異的なモノクローナル抗体（例えば、MAb 69.26）を使用して捕捉I A I Pを検出することにより、I A I Pが生物学的混合物中で定量的に測定されることを示す。図21A、21Bに示すように、標準曲線は、既知のI A I Pの量を有する精製I A I P又はヒト血漿を使用して最適化及び確立することができる。その結果、このアッセイを用いて、生物学的対象由来のサンプル中の未知のI A I Pの量を定量化することができる。実施例1及び2で用いた手法と同様に、I A I P特異的モノクローナル抗体を使用してI A I Pを捕捉し、ビオチン-標識ヒアルロン酸を結合I A I Pを検出するリガンドとして使用する、この方法に対する代替的アプローチを使用することができる。

#### 【0218】

他の実施形態

上記明細書に記載されている全ての刊行物、特許及び特許出願は、それぞれの個々の刊行物、特許又は特許出願が、その全体が参照により組み込まれるように具体的かつ個別に示されているのと同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれる。米国仮特許出願第62/490,003号及び同第62/614,333号は、その全体が本明細書に具体的に組み込まれる。本発明の記載された方法、医薬組成物及びキットの種々の改変及び変形は、請求項に係る発明の範囲及び趣旨から逸脱することなく、当業者に明らかであろう。本開示は特定の実施形態に関連して説明されてきたが、本開示はさらなる修正が可能であ

10

20

30

40

50

り、特許請求の範囲に記載された本発明はそのような特定の実施形態に不当に限定されるべきではないことが理解されるであろう。

【 図 1 】

【 図 2 A 】

図 1

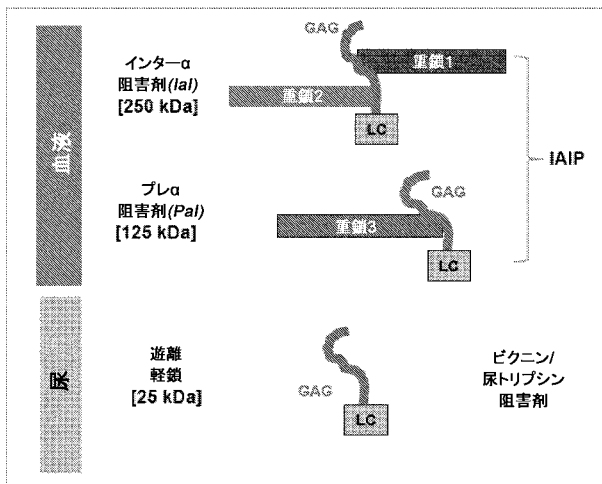
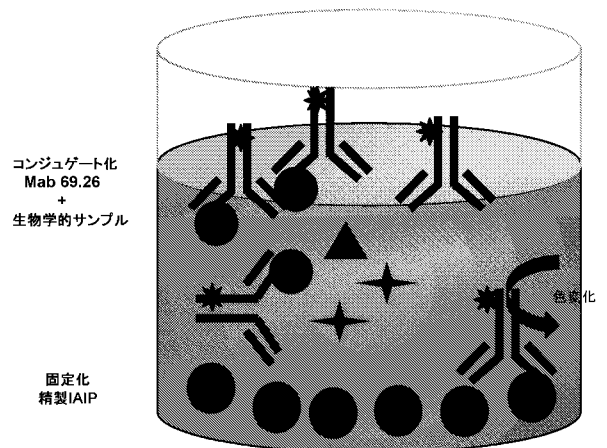


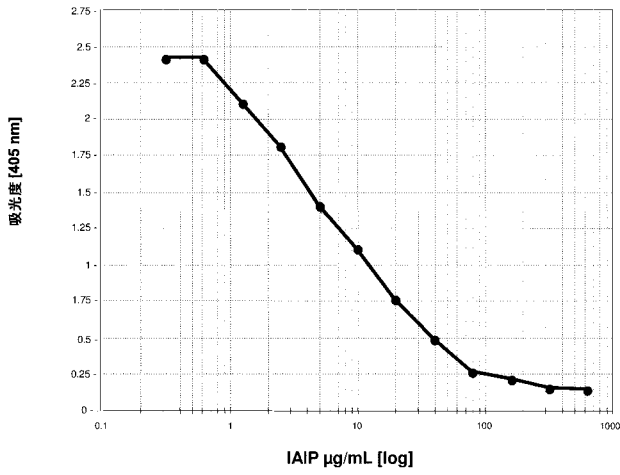
図 2A



【 図 2 B 】

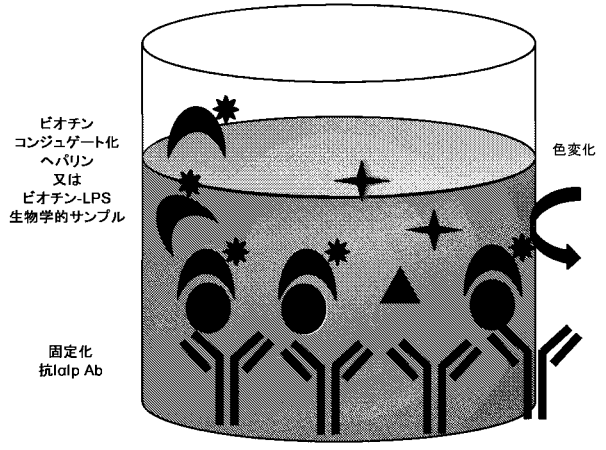
図 2B

標準曲線



【 図 3 A 】

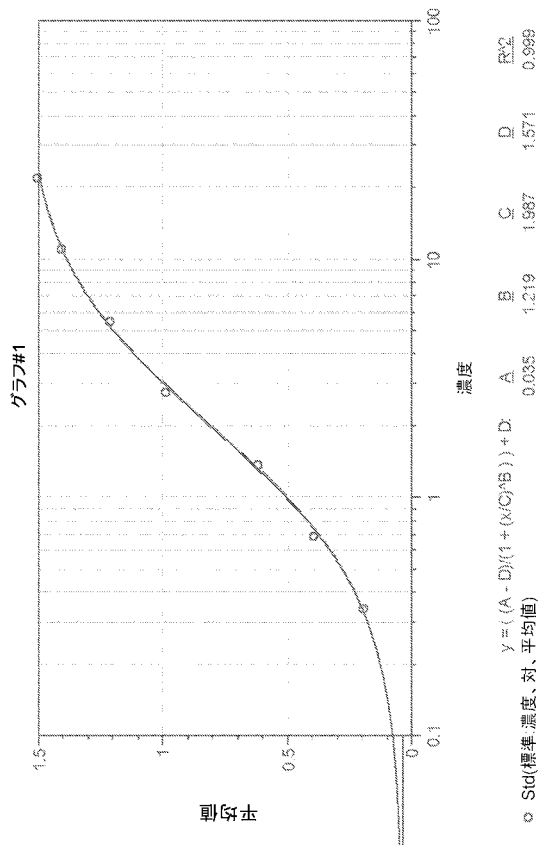
図 3A



【 図 3 B 】

ヘパリン-IAIP標準曲線

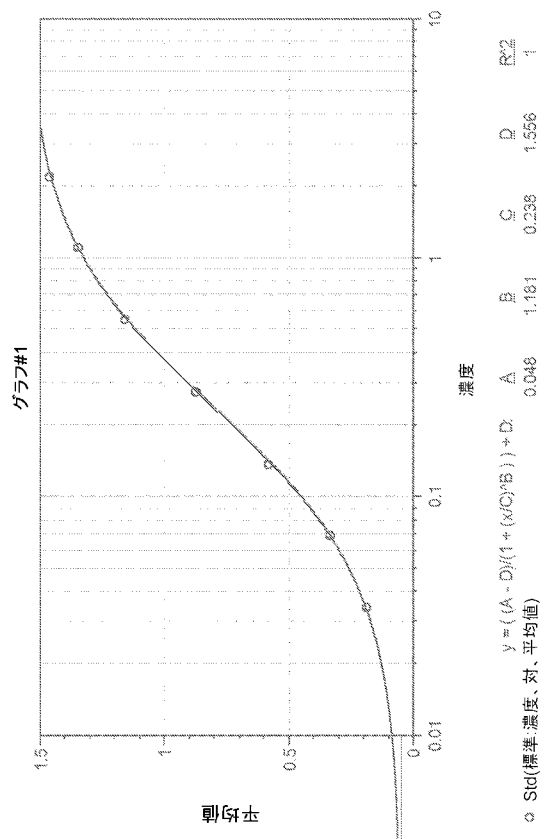
図 3B



【 図 3 C 】

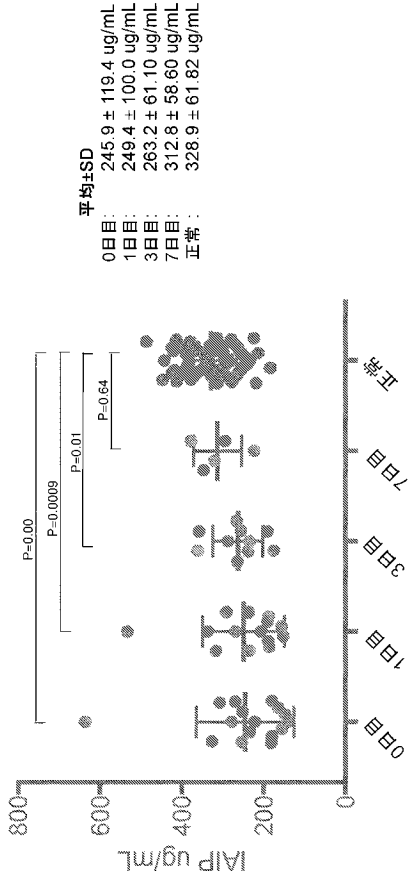
エンドキシン-IAIP標準曲線

図 3C



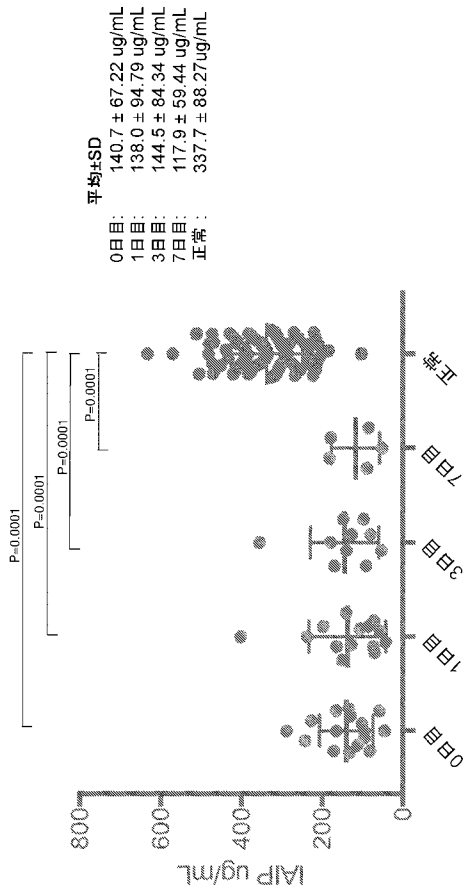
【 図 4 】

図 4



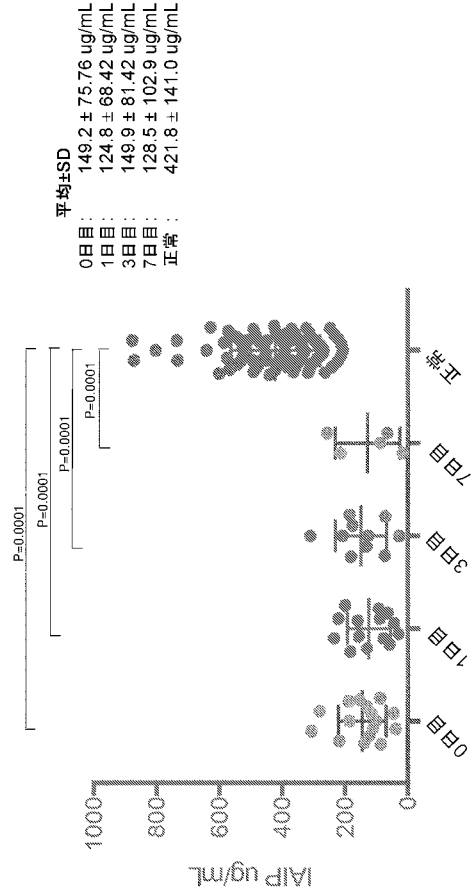
【 図 6 】

図 6



【 図 5 】

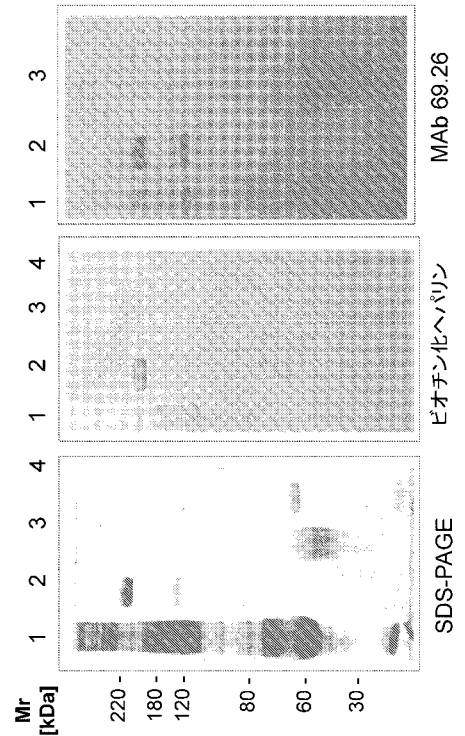
図 5



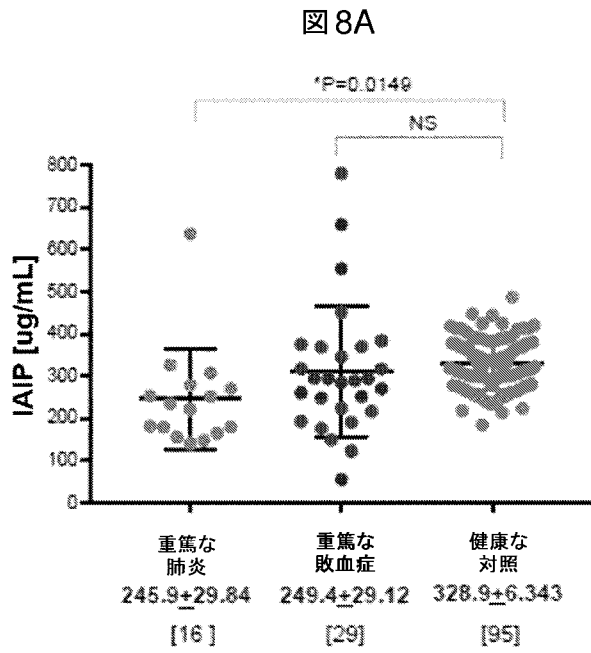
【 図 7 】

- 1=ヒト血漿
- 2=精製IAIP
- 3=ビクニン(IAIP軽鎖)
- 4=ヒト血漿アルブミン

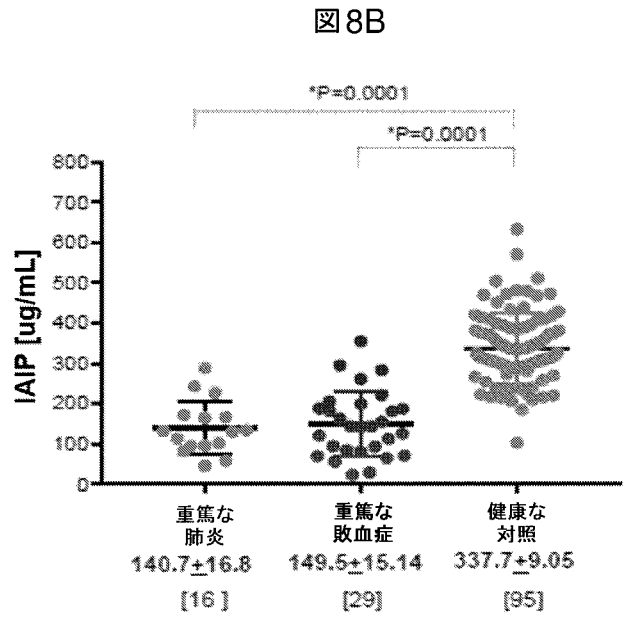
図 7



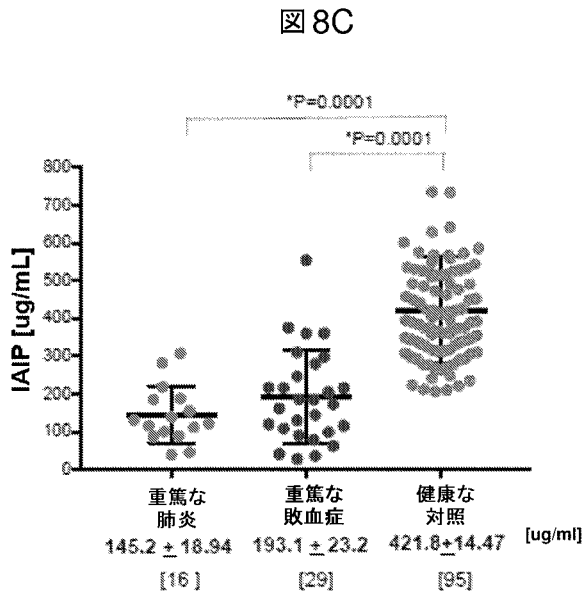
【 図 8 A 】



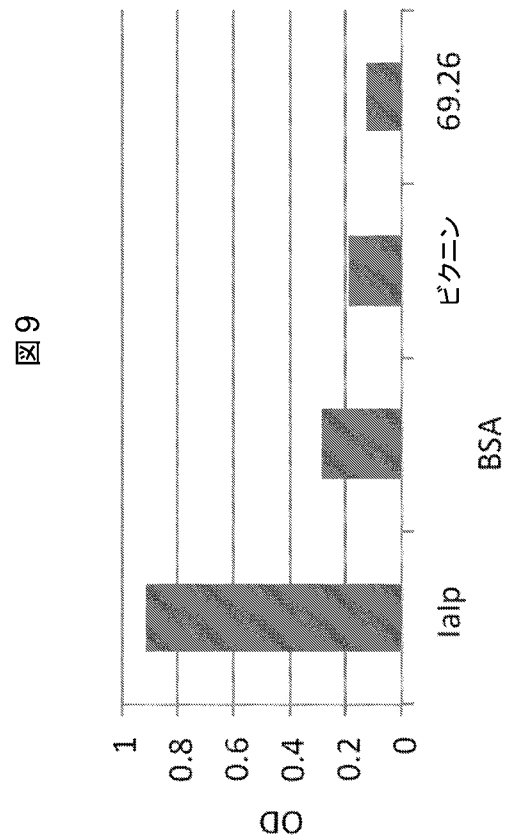
【 図 8 B 】



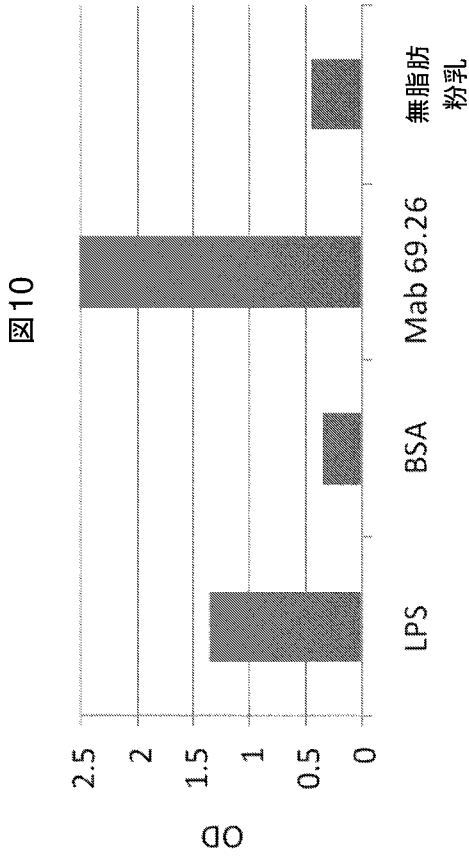
【 図 8 C 】



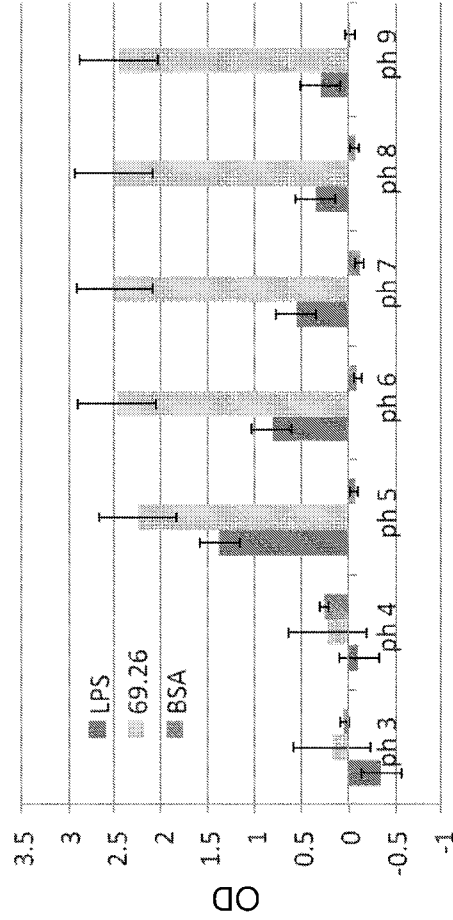
【 図 9 】



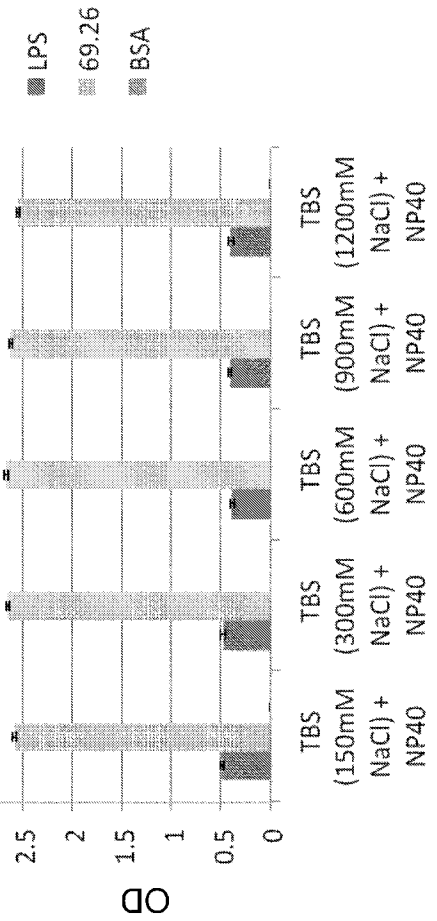
【 図 1 0 】



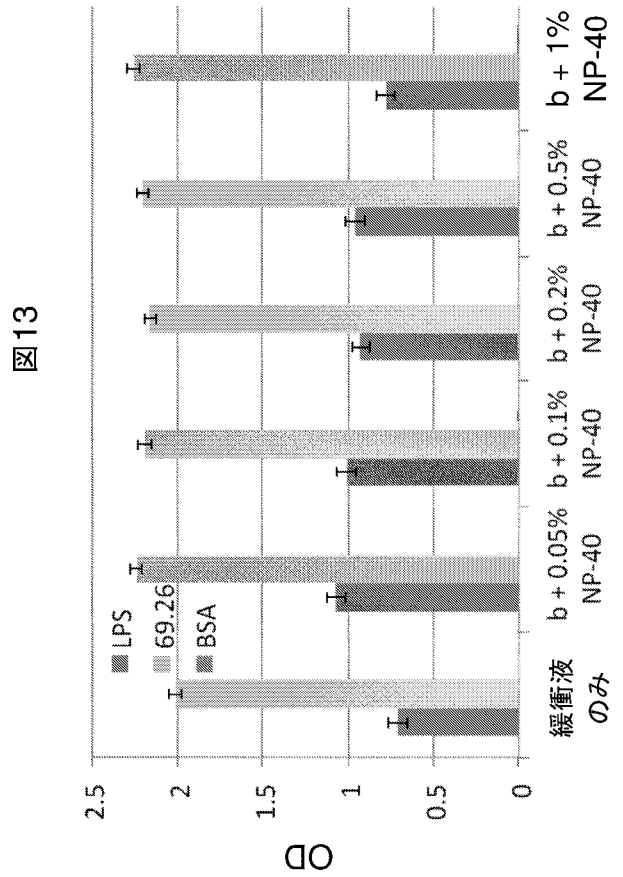
【 図 1 1 】



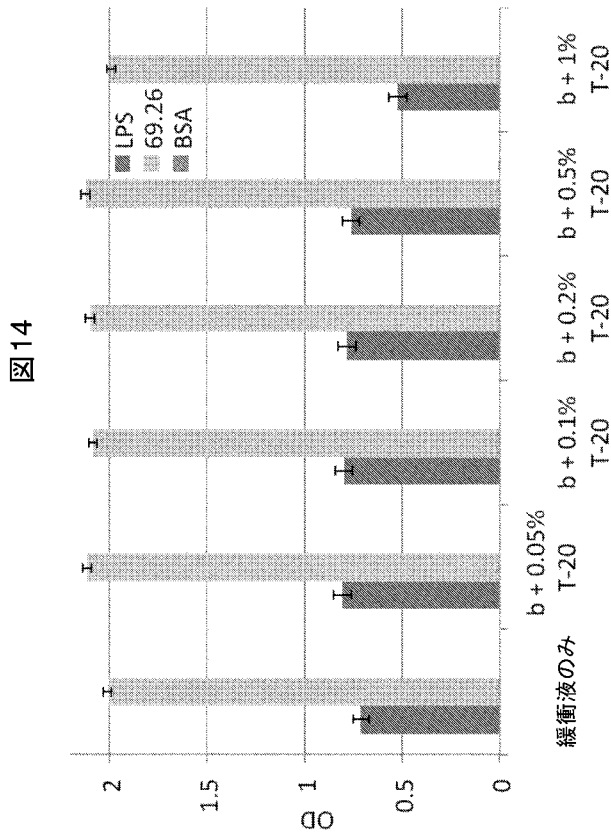
【 図 1 2 】



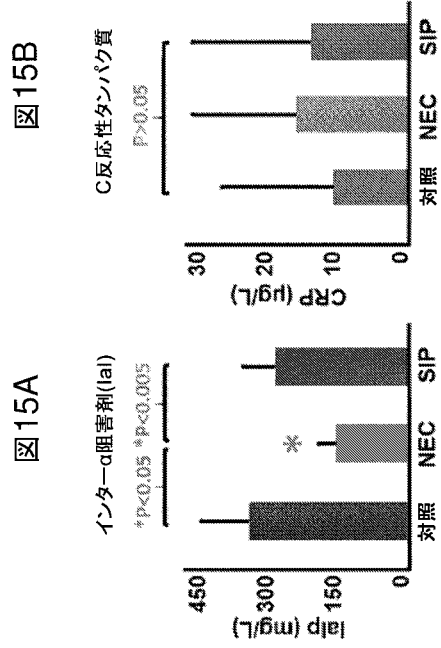
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】

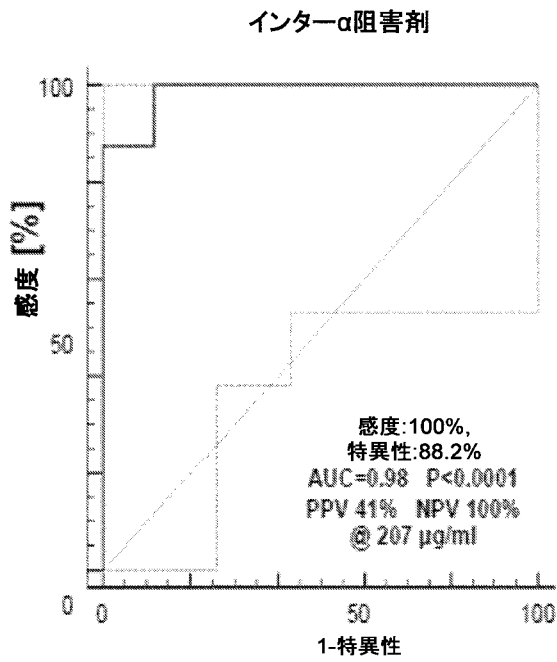


【 図 1 5 A - 1 5 B 】



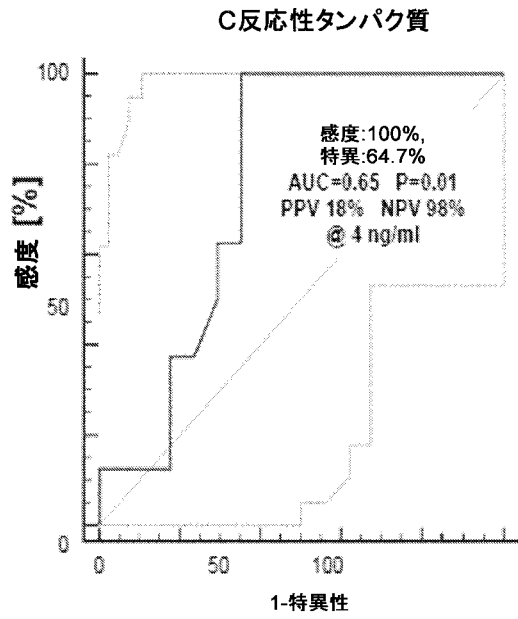
【 図 1 6 A 】

図16A



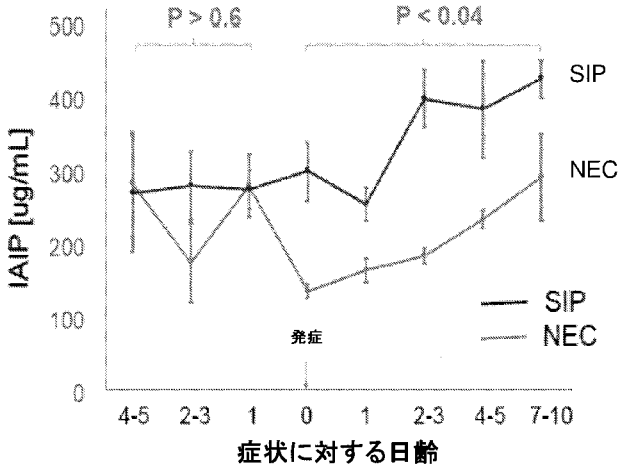
【 図 1 6 B 】

図16B



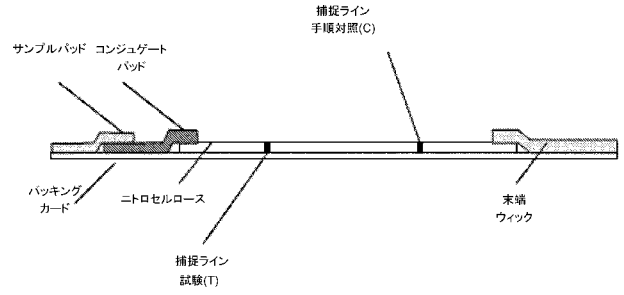
【 図 1 7 】

図17

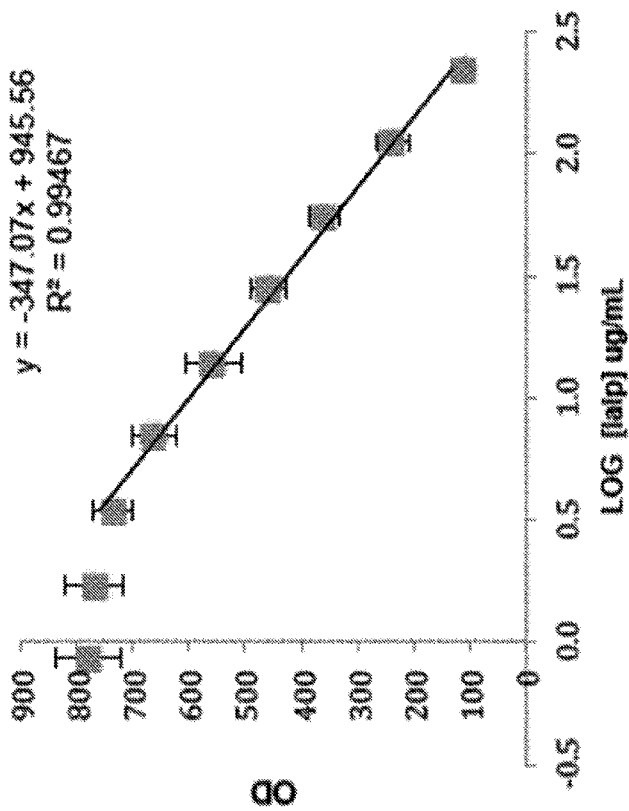


【 図 1 8 】

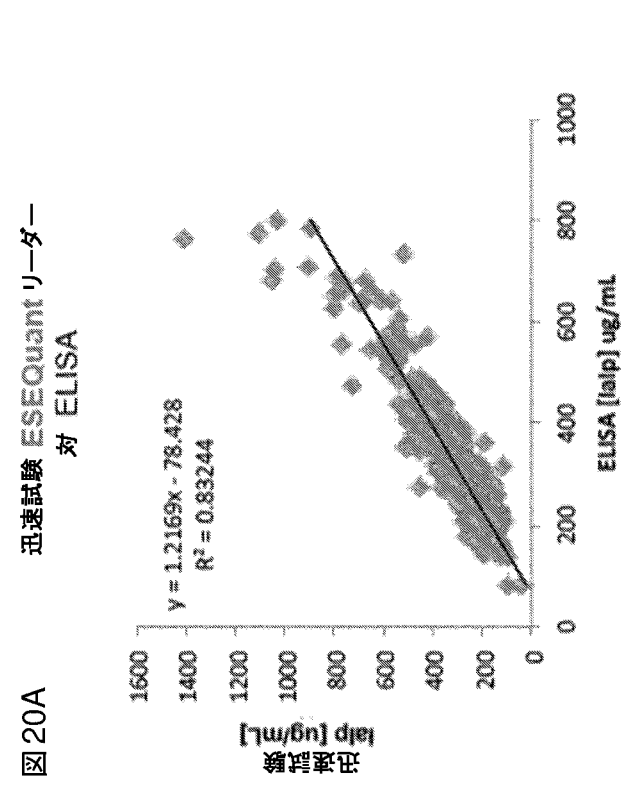
図18



【 図 1 9 】



【 図 2 0 A 】



【 図 2 0 B 】

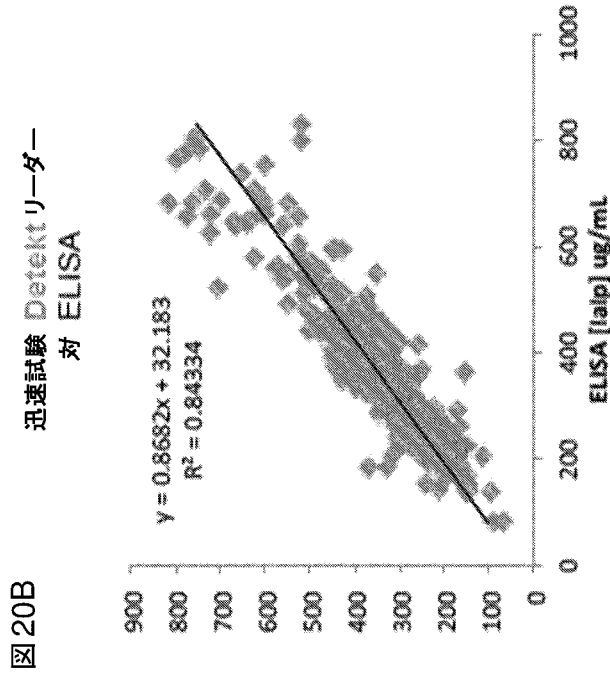


図 20B

【 図 2 0 C 】

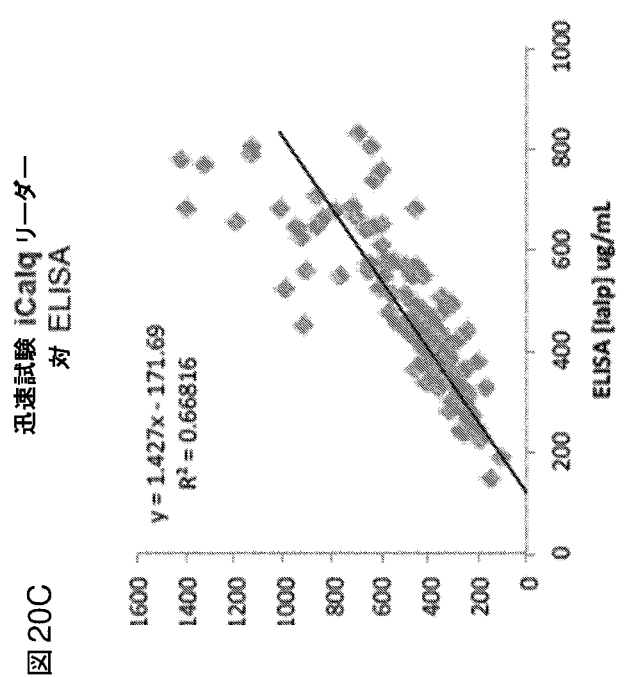
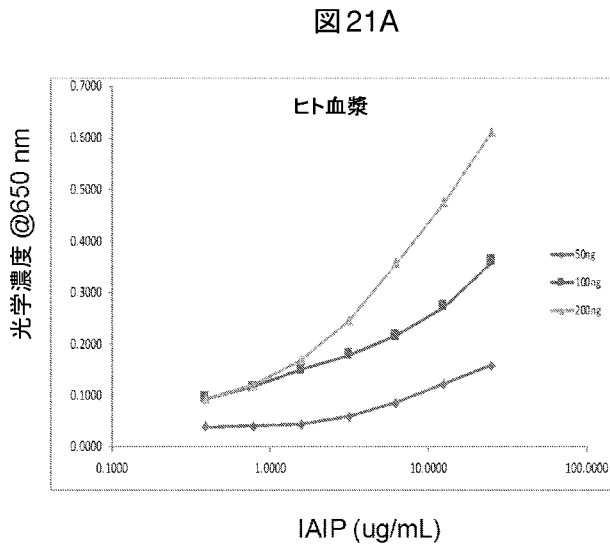
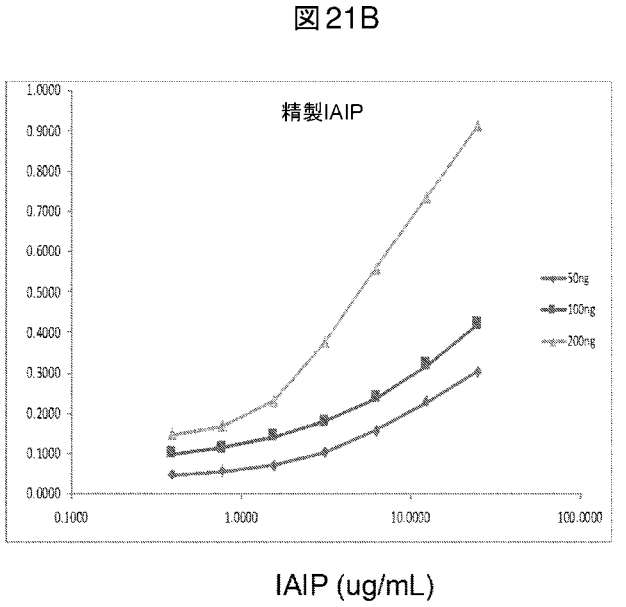


図 20C

【 図 2 1 A 】



【 図 2 1 B 】



【 国際調査報告 】

PCT/US2018/029436 31.08.2018

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AUS 18/29436

<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 5-7, 15, 18-80, 84-94, 118 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: ----Go to Extra sheet for continuation----	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. <input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: Claims 1-4, 8-14, 16, 17, 95-117, 119-177
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (January 2015)

**PCT/US2018/029436 31.08.2018****INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US 18/29436

**Continuation of Box III: Observations where Unity of Invention is lacking**

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-4, 8-14, 16, 17, 95-117, 119-177, drawn to a method for quantifying inter-alpha inhibitor protein (IAIP).

Group II: Claims 81-83, 178-188, drawn to a kit for quantifying IAIP.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

**Special Technical Features:**

Group I has the special technical feature of a method involving specific steps for quantifying IAIP in a sample, not required by Group II.

Group II has the special technical feature of a kit composition for quantifying IAIP, not required by Group I.

**Common Technical Feature:**

Groups I and II share the common technical feature of an IAIP binding agent and an IAIP detection agent.

However, said common technical feature does not represent a contribution over the prior art, and is anticipated by "Correlation between mortality and the levels of inter-alpha inhibitors in the plasma of patients with severe sepsis" by Lim et al. (hereinafter "Lim") [published in J Infect Dis 15 September 2003 Vol 188 No 6 Pages 919-926]

Lim teaches an IAIP binding agent (pg 920 col 2 para 3; "Determination of I.alpha.Ip levels by competitive ELISA. A competitive ELISA that used murine MAb 69.31 was used to measure I.alpha.Ip levels"; pg 920 col 2 para 2; "A panel of MAbs against human I.alpha.Ip was generated ... Individual clones were expanded in 96-well plates, and antibody-secreting hybridomas were screened for reactivity against human I.alpha.Ip in an ELISA or Western blot assay. The positive clone selected for the present study was designated as MAb 69.31") and an IAIP detection agent (pg 920 col 2 para 3; "The bound MAb 69.31 was detected by adding horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG").

As the common technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a common special technical feature that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Groups I and II lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Note concerning item 4: Claims 5-7, 15, 18-80, 84-94, 118, 189 are multiple dependent claims and are not drafted according to the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

PCT/US2018/029436 31.08.2018

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 18/29436

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - G01N 33/53; C12Q 1/37; C07K 14/81 (2018.01) CPC - G01N 33/573, 33/566 2333/81; C12Q 1/37; C07K 14/811		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History Document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History Document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History Document		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	CHAABAN et al. Inter-alpha inhibitor protein and its associated glycosaminoglycans protect against histone-induced injury. Blood, 2 April 2015, Vol 125, No 14, Pages 2286-2296. Especially pg 2286 col 2 para 1, PDF pg 15 para 1 of Supplemental Information: ELISA for IAIP-His complexes.	1-4, 8-14, 16, 17, 95-104, 106, 108, 109, 114-117, 119-129  105, 107, 110-113, 130-177
Y	US 6,660,482 B1 (LIM et al.) 9 December 2003 (09.12.2003) col 1 ln 1-5, col 1 ln 26-33, col 2 ln 18-22, col 2 ln 51-58, col 3 ln 40-52, col 3 ln 64-65, col 4 ln 20-22, col 4 ln 29, sheet 2 fig 2A,2B.	105, 107, 110-113, 130-177
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 2 August 2018	Date of mailing of the international search report <b>31 AUG 2018</b>	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: Lee W. Young  PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 7 5
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/57	
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 9/14 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 11/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 11/08 (2006.01)	A 6 1 P 9/14	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/08	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 33/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 15/06 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 P 35/04	
	A 6 1 P 37/02	
	A 6 1 P 43/00	1 1 1
	A 6 1 P 29/00	1 0 1
	A 6 1 P 29/00	
	A 6 1 P 15/06	

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

## (72)発明者 スペロ, デニス

アメリカ合衆国 0 2 9 0 3 ロードアイランド州, プロビデンス, エディ ストリート 3 4 9  
 Fターム(参考) 4C084 AA02 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 BA44 CA18 DC34 NA05  
 ZA021 ZA052 ZA341 ZA361 ZA432 ZA441 ZA451 ZA591 ZA612 ZA661  
 ZA751 ZA811 ZA891 ZA961 ZB072 ZB111 ZB112 ZB151 ZB261 ZB262  
 ZB311 ZB312 ZB322 ZB332 ZB351 ZB352 ZB372 ZC351 ZC412

专利名称(译)	定量α-间抑制剂蛋白的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2020517967A</a>	公开(公告)日	2020-06-18
申请号	JP2019558662	申请日	2018-04-25
发明人	リム,ヨウ-ピン スベロ,デニス		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 A61K38/57 A61K45/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/14 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/08 A61P13/12 A61P17/02 A61P19/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/02 A61P43/00 A61P29/00 A61P15/06		
CPC分类号	A61P31/00 C07K14/81 C07K14/8114 G01N33/6893 G01N2333/4704 G01N2800/7095 A61K38/57 A61K45/06		
FI分类号	G01N33/543.501.A G01N33/53.U G01N33/543.545.A G01N33/543.541.B G01N33/543.541.Z G01N33/543.575 A61K38/57 A61K45/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/14 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/08 A61P13/12 A61P17/02 A61P19/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/02 A61P43/00.111 A61P29/00.101 A61P29/00 A61P15/06		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/CA18 4C084/DC34 4C084/NA05 4C084/ZA021 4C084/ZA052 4C084/ZA341 4C084/ZA361 4C084/ZA432 4C084/ZA441 4C084/ZA451 4C084/ZA591 4C084/ZA612 4C084/ZA661 4C084/ZA751 4C084/ZA811 4C084/ZA891 4C084/ZA961 4C084/ZB072 4C084/ZB111 4C084/ZB112 4C084/ZB151 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZB311 4C084/ZB312 4C084/ZB322 4C084/ZB332 4C084/ZB351 4C084/ZB352 4C084/ZB372 4C084/ZC351 4C084/ZC412		
優先権	62/490003 2017-04-25 US 62/614333 2018-01-05 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本文描述了使用基于IAIP配体的测定定量样品(例如,来自受试者)中的IAIP水平的方法。还公开了用于测量IAIP-IAIP配体复合物的方法,以及使用上述IAIP定量方法评估,监测和治疗受试者的方法。[选择图]无

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 公表特許公報(A)	(11) 特許出願公表番号 特表2020-517967 (P2020-517967A) (43) 公表日 令和2年6月18日(2020.6.18)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考) 4C084
<b>G O I N 33/543 (2006.01)</b>	G O I N 33/543 5 O 1 A	
<b>G O I N 33/53 (2006.01)</b>	G O I N 33/53 U	
<b>A 6 1 K 38/57 (2006.01)</b>	G O I N 33/543 5 4 5 A	
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	G O I N 33/543 5 4 1 B	
<b>A 6 1 P 1/00 (2006.01)</b>	G O I N 33/543 5 4 1 Z	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 74 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号 特願2019-558662(P2019-558662)	(71) 出願人 519379190	
(86) (22) 出願日 平成30年4月25日(2018.4.25)	プロテラ バイオロジックス、インコーポレーテッド	
(85) 翻訳文提出日 令和1年11月6日(2019.11.6)	アメリカ合衆国 O 2 9 0 3 ロードアイランド州、プロビデンス、エディ ストリート 3 4 9	
(86) 国際出願番号 PCT/US2018/029436		
(87) 国際公開番号 W02018/200722	(74) 代理人 110002572	
(87) 国際公開日 平成30年11月1日(2018.11.1)	特許業務法人平本国際特許事務所	
(31) 優先権主張番号 62/490,003	リム, ヨウ-ピン	
(32) 優先日 平成29年4月25日(2017.4.25)	アメリカ合衆国 O 2 9 0 3 ロードアイランド州、プロビデンス、エディ ストリート 3 4 9	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(31) 優先権主張番号 62/614,333		
(32) 優先日 平成30年1月5日(2018.1.5)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 インターα阻害タンパク質を定量化する方法		