

(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2016-533497

(P2016-533497A)

(43) 公表日 平成28年10月27日(2016.10.27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 D	2 G O 4 5
<b>GO 1 N 33/573 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 X	4 D O O 6
<b>GO 1 N 33/48 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/573 A	
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 V	
<b>BO 1 D 63/02 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 P	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-525470 (P2016-525470)  
 (86) (22) 出願日 平成26年7月9日 (2014.7.9)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年3月1日 (2016.3.1)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/046058  
 (87) 国際公開番号 WO2015/006515  
 (87) 国際公開日 平成27年1月15日 (2015.1.15)  
 (31) 優先権主張番号 61/844,365  
 (32) 優先日 平成25年7月9日 (2013.7.9)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501228071  
 エスアールアイ インターナショナル  
 SRI International  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94  
 025 メンロパーク レイベンスウッド  
 アベニュー 333  
 333 Ravenswood Avenue,  
 Menlo Park, California  
 94025, U. S. A.  
 (74) 代理人 100114188  
 弁理士 小野 誠  
 (74) 代理人 100119253  
 弁理士 金山 賢教

最終頁に続く

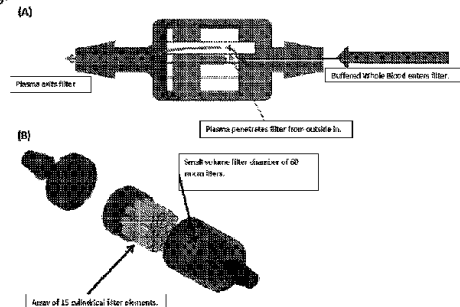
(54) 【発明の名称】 放射線傷害の線量評価のためのバイオマーカーパネルおよびマイクロ血漿フィルター

(57) 【要約】

バイオマーカーの量を測定することによって、電離放射線への人の被曝の定性的評価のための材料、システム、および方法が提供され、バイオマーカーの対応する非照射コントロール基準範囲と比較した変化が、評価を提供し、バイオマーカーが、(i) アルファ-1-抗キモトリプシン (ACT) (ii) Fms 関連チロシンキナーゼ3リガンド (Flt3L)、および (iii) 1つ以上のさらなるタンパク質を含む。

【選択図】 図1

Fig. 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

入口、それぞれが、血球ではなく血漿を通過させるのに十分な、ポアサイズを有する内腔および壁を含む、複数の細長い中空アフレーシスファイバー、チャンバー、および出口を含み、前記入口が、前記内腔と大部分が流体接続しており、前記ファイバーが、前記チャンバー内に含有され、前記チャンバーが、前記出口と大部分が流体接続しており、操作中に、血液が前記入口から前記内腔に入り、血漿が、前記ファイバーの前記壁を通過して前記チャンバーの中に入り、その後、前記出口から出る、血液フィルターデバイス。

## 【請求項 2】

4 ~ 100 もしくは 5 ~ 25 本の細長く平行なファイバーを含む、100  $\mu$ l 未満のデッドボリュームを有する、または 2 P S I 未満の作業圧力を必要とする、請求項 1 に記載のデバイス。

10

## 【請求項 3】

4 ~ 100 もしくは 5 ~ 25 本の細長く平行なファイバーを含み、100  $\mu$ l 未満のデッドボリュームを有し、かつ 2 P S I 未満の作業圧力を必要とする、請求項 1 に記載のデバイス。

## 【請求項 4】

電離放射線への人の被曝の定性的評価のためのキットであって、

- (a) キャピラリー血液収集デバイス、
- (b) 血球から血漿を分離する、請求項 1 に記載の血液フィルターデバイス、
- (c) 前記血漿およびバッファー溶液の混合物を形成するミキサー、
- (d) 単一のカセットケース中に保持されたラテラルフローストリップまたは 1 組のストリップに前記混合物を適用するアプリケーター、ならびに
- (e) 1 または複数の前記ラテラルフローストリップをスキャンし、結果を出力して、バイオマーカーの量または電離放射線への人の被曝の評価を報告するコンパクトリーダーシステムを含む、キット。

20

## 【請求項 5】

血球から血漿を分離し、前記血漿のバイオマーカーを検出するための血液フィルターデバイス、基質中にまたは上に含有される、前記バイオマーカーに特異的なアフィニティ捕捉分子を含み、前記基質が、複数のラテラルフローストリップを含み、それぞれが、異なる所定のタンパク質捕捉特異性を有し、前記バイオマーカーが、(i) アルファ - 1 - 抗キモトリプシン (ACT) (ii) F m s 関連チロシンキナーゼ 3 リガンド (Flt3L)、および (iii) 血清アミロイド A イソフォーム 1 または 2 (SAA1 または SAA2)、C 反応性タンパク質 (CRP)、唾液アルファアミラーゼ (AMY1A)、アルファ - 1 - 抗トリプシンイソフォーム 4 (SERPINA1)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (NGAL)、アルファ - 1 - 酸性糖タンパク質 1 または 2、ロイシンリッチアルファ - 2 - 糖タンパク質 (LRG1)、テネニン - C (TNC)、クラスタリン (CLU)、ヘモペキシン (HPX)、ハプトグロビン (HP)、アポリポタンパク質 A - IV (APOA4)、インターロイキン 15 (IL15)、インターロイキン 18 (IL18)、および単球走化性タンパク質 1 (MCP1) からなる群から選択される 1 つ以上のさらなるタンパク質を含む、電離放射線への人の被曝の定性的評価のためのキットに統合された、請求項 1 に記載のデバイス。

30

40

## 【請求項 6】

前記さらなるタンパク質が、AMY1A、NGAL、APOA4、IL15、IL18、MCP1、および HPX からなる群から選択される、請求項 5 に記載のデバイス。

## 【請求項 7】

前記バイオマーカーが、

- (i) ACT、Flt3L、AMY1A、および IL15 または
- (ii) ACT、Flt3L、NGAL、および AMY1A
- (iii) ACT、Flt3L、NGAL、および MCP1

50

を含む、請求項 5 に記載のデバイス。

【請求項 8】

電離放射線への人の被曝の定性的評価のための方法であって、

( a ) 前記人の血液サンプルのバイオマーカーを分離するステップおよび  
 ( a ) 前記分離されたバイオマーカーの量を測定するステップを含み、前記バイオマーカーの対応する非照射コントロール基準範囲と比較した量の変化が、評価を提供し、  
 前記バイオマーカーが、( i ) アルファ - 1 - 抗キモトリブシン ( A C T ) ( i i ) F m s 関連チロシンキナーゼ 3 リガンド ( F l t 3 L )、および ( i i i ) 血清アミロイド A イソフォーム 1 または 2 ( S A A 1 または S A A 2 )、C 反応性タンパク質 ( C R P )、  
 唾液アルファアミラーゼ ( A M Y 1 A )、アルファ - 1 - 抗トリブシンイソフォーム 4 ( S E R P I N A 1 )、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン ( N G A L )、アルファ - 1 - 酸性糖タンパク質 1 または 2、ロイシンリッチアルファ - 2 - 糖タンパク質 ( L R G 1 )、  
 テネイシン - C ( T N C )、クラスタリン ( C L U )、ヘモペキシン ( H P X )、ハプトグロビン ( H P )、アポリポタンパク質 A - I V ( A P O A 4 )、インターロイキン 1 5 ( I L 1 5 )、  
 インターロイキン 1 8 ( I L 1 8 )、および単球走化性タンパク質 1 ( M C P 1 ) からなる群から選択される 1 つ以上のさらなるタンパク質を含む、方法。

10

【請求項 9】

測定ステップが、ラテラルフローイムノアッセイ、E L I S A、マイクロスフェアベースのイムノアッセイ、ウェスタンブロット、免疫ドットブロット、または定量的質量分析を含む、請求項 8 に記載の方法。

20

【請求項 10】

放射線被曝が、 $> 2 \text{ Gy}$  である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

測定ステップが、放射線被曝の 1 ~ 14 日後に行われる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

所定の被曝閾値以上または以下という評価に基づいて、放射線照射曝露または非曝露として人を分類するステップをさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

放射線被曝について前記人を処置するステップをさらに含み、前記処置が、療法、モニタリング、またはさらなる評価の指示である、請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 14】

請求項 8 に記載の方法に適合され、基質中にまたは上に含有される、バイオマーカーに特異的なアフィニティ捕捉分子を含むキットであって、前記基質が、複数のラテラルフローストリップを含み、それぞれが、異なる所定のタンパク質捕捉特異性を有するキット。

【請求項 15】

請求項 8 に記載の方法に適合され、

( a ) キャピラリー血液収集デバイス、  
 ( b ) 血球から血漿を分離する血液フィルター、  
 ( c ) 前記血漿およびバッファー溶液の混合物を形成するミキサー、  
 ( d ) 単一のカセットケース中に保持されたラテラルフローストリップ、または 1 組のストリップに前記混合物を適用するアプリケーター、ならびに  
 ( e ) 1 または複数の前記ラテラルフローストリップをスキャンし、結果を出力して、バイオマーカーの量または電離放射線への人の被曝の評価を報告するコンパクトリーダーシステム

40

を含むキットであって、

前記リーダーシステムが、励起レーザー、ウィックセレクター、放射フィルター、収集光学装置類、および強度センサーを含み、特に、前記センサーが、光電子増倍管、電荷結合素子 ( C C D )、または相補性金属酸化膜半導体 ( C M O S ) を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

## 【0001】

本発明は、厚生省の契約番号HHSO100201000007Cの下で政府の支援によりなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

## 【関連出願の相互参照】

## 【0002】

本出願は、2013年7月9日に提出された米国特許出願公開第61/844,365号明細書に対する優先権を主張し、本開示は、その全体が参照によって本明細書において組み込まれる。

## 【0003】

発明者らは、放射線/核イベントの間に電離放射線(IR)に曝露されたかもしれない個人の迅速なトリアージのための簡易迅速(point-of-care)(POC)放射線量評価ツールを開発したまたこれを開示する。発明者らのアプローチは、BARDA必要条件を満たす生体線量計(biodosimeter)ツールの迅速な開発のために、アップコンバーティング蛍光体-レポーター技術(upconverting phosphor-reporter technology)(UPT)に基づく、成熟した手持ち型検出技術プラットフォームを、単純で高感度の高速(<15分間)アッセイフォーマットおよびバイオマーカーパネルと組み合わせる。発明者らは、初期の放射線被曝を予測する際の精度の強化を提供するための、複数のプロテオミクス標的(proteomic target)の使用を実証する。このシステムは、個人のIRに対する照射線量の定性的および定量的測定を提供することができる、非侵襲的に収集された血液サンプルのバイオマーカーを検出する。

10

20

## 【背景技術】

## 【0004】

Guipaudo et alは、マウスモデルにおいてアミラーゼ、Flt3-リガンド、およびシトルリンを含むパネルを提案したのに対して[Guipaudo and Benderitter, 2009]、GADD45(Growth arrest and DNA damage inducible gene 45)、インターロイキン6(IL-6)、および唾液アルファアミラーゼ(AMY1A)が、Ossetrova et al[N.I. Ossetrova and Blakely, 2009]によって記載されるマウスパネルに含まれる。他の放射線応答性タンパク質が、報告された：血清アミラーゼA[Blakely et al., 2010; N. Ossetrova et al., 2011; N.I. Ossetrova and Blakely, 2009; N.I. Ossetrova et al., 2010; N.I. Ossetrova et al., 2007; Barrett et al., 1982; Junglee et al., 1986; Junglee et al., 1986; Dubray et al., 1992; Brattstrom et al., 1991; Akashi et al., 2001]; Fms関連チロシンキナーゼ3リガンド(Flt3L)[Zhang et al., 2009; Prat et al., 2005; Prater et al., 2006; Blakely et al., 2011; Bertho et al., 2001; Bertho and Roy, 2009]; リボカリン-2(LCN2)[Cowland and Borregaard, 1997; Noto et al., 2013; Roudkenar et al., 2007; Shiba et al., 2013; Sugihara et al., 2013]; アルファ-1-抗キモトリプシン(ACT)[Christensson et al., 1993; Lilja et al., 1991; Hong et al., 1995; Patel et al., 1998; Sharma and Moulder, 2013]; インターロイキン15(IL15)[Lai et al., 1999; Lugerling et al., 1999; Reinecker et al., 1996; Cao et al., 1998a; Cao et al., 1998b]。

30

40

## 【先行技術文献】

50

## 【非特許文献】

## 【0005】

- 【非特許文献1】Guipauid and Benderitter, 2009]、  
 【非特許文献2】N.I.Ossetrova and Blakely, 2009  
 【非特許文献3】Blakely et al., 2010  
 【非特許文献4】N Ossetrova et al., 2011  
 【非特許文献5】N.I.Ossetrova et al., 2010  
 【非特許文献6】N.I.Ossetrova et al., 2007  
 【非特許文献7】Barrett et al., 1982  
 【非特許文献8】Junglee et al., 1986 10  
 【非特許文献9】Dubray et al., 1992  
 【非特許文献10】Brattstrom et al., 1991  
 【非特許文献11】Akashi et al., 2001  
 【非特許文献12】Zhang et al., 2009  
 【非特許文献13】Prat et al., 2005  
 【非特許文献14】Prat et al., 2006  
 【非特許文献15】Blakely et al., 2011  
 【非特許文献16】Bertho et al., 2001  
 【非特許文献17】Bertho and Roy, 2009  
 【非特許文献18】Cowlan and Borregaard, 1997 20  
 【非特許文献19】Noto et al., 2013  
 【非特許文献20】Roudkenar et al., 2007  
 【非特許文献21】Shiiba et al., 2013  
 【非特許文献22】Sugihara et al., 2013  
 【非特許文献23】Christensson et al., 1993  
 【非特許文献24】Lilja et al., 1991  
 【非特許文献25】Hong et al., 1995  
 【非特許文献26】Patel et al., 1998  
 【非特許文献27】Sharma and Moulder, 2013  
 【非特許文献28】Lai et al., 1999 30  
 【非特許文献29】Lugering et al., 1999  
 【非特許文献30】Reinecker et al., 1996  
 【非特許文献31】Cao et al., 1998a  
 【非特許文献32】Cao et al., 1998b

## 【発明の概要】

## 【0006】

本発明は、バイオマーカーの量を測定することによって、電離放射線への人の被曝の定性的評価のための材料、システム、および方法を提供し、バイオマーカーの対応する非照射コントロール基準範囲と比較した、量における著しい増加もしくは減少または相対的な差異のパターンであってもよい変化が、評価を提供する。 40

## 【0007】

バイオマーカーは、(i)アルファ-1-抗キモトリプシン(ACT)(ii)Fms関連チロシンキナーゼ3リガンド(Flt3L)、および(iii)

【表 1】

血清アミロイド A7イソフォーム1または2(SAA1またはSAA2)、	クラスタリン(CLU)、
C反応性タンパク質(CRP)、	ヘパキシン(HPX)、
唾液アルファアミラーゼ(AMY1A)、	ハプトグロビン(HP)、
アルファ1-抗トリプシンイソフォーム4(SERPINA1)、	アポリポタンパク質A-IV(APOA4)、
好中球セラーチン関連リガジン(NGAL)、	インターロイキン15(IL15)、
アルファ1-酸性糖タンパク質1または2、	インターロイキン18(IL18)、および
ロインリッチアルファ2-糖タンパク質(LRG1)、	単球走化性タンパク質1(MCP1)、
トネイン-C(TNC)、	

10

## 【0008】

からなる群から選択される1つ、2つ、3つ、またはそれ以上のさらなるタンパク質を含む、またはこれ(ら)からなるまたはこれ(ら)から本質的になる(「から本質的になる」は、評価が、列挙されるバイオマーカーに由来するが、他のものが付随的に存在してもよいことを意味する)。

## 【0009】

好ましいさらなるタンパク質は、AMY1A、NGAL、APOA4、IL15、IL18、MCP1、およびHPXである。

## 【0010】

特定の実施形態では、バイオマーカーが、(i)ACT、Flt3L、AMY1A、およびIL15；または(ii)ACT、Flt3L、NGAL、およびAMY1A；(iii)ACT、Flt3L、NGAL、およびMCP1などのような、バイオマーカー、特に好ましいバイオマーカー、およびさらなるタンパク質の組み合わせを含む、またはこれからなる、またはこれから本質的になる。

20

## 【0011】

特定の実施形態では、方法が、測定ステップを容易にするために、人の血液サンプルのバイオマーカーを分離するステップを含む。

## 【0012】

特定の実施形態では、測定ステップが、ラテラルフロー免疫アッセイ(lateral flow immunoassay)、ELISA、マイクロスフェアベースの免疫アッセイ、ウェスタンブロット、免疫ドットブロット、定量的質量分析などのようなアフィニティアッセイによって達成される。

30

## 【0013】

典型的に、測定ステップは、放射線被曝の1~7または1~14日後に行われる。

## 【0014】

特定の実施形態では、放射線被曝が、>2 Gyである。

## 【0015】

特定の実施形態では、方法が、評価、特に、2 Gyなどのような所定の照射線量閾値以上または以下に基づいて、放射線照射曝露または非曝露として人を分類するステップをさらに含む。

40

## 【0016】

特定の実施形態では、方法が、放射線被曝について人を処置するステップをさらに含み、処置が、療法、モニタリング、またはさらなる評価の指示であってもよい。

## 【0017】

本発明はまた、本発明の方法に適合されており、かつ基質中にまたは上に含有される、バイオマーカーに特異的なアフィニティ捕捉分子を含むキットであって、特に、基質が、複数のラテラルフローストリップ(lateral flow strip)を含み、それぞれが、異なる所定のタンパク質捕捉特異性を有するキットをも提供する。

## 【0018】

50

特定の実施形態では、キットが、本発明の方法に特別に適合されており、(a)キャピラリー血液収集デバイス、(b)血球から血漿を分離する血液フィルター、(c)血漿およびバッファー溶液の混合物を形成するミキサー、(d)単一のカセットケース中に保持されたラテラルフローストリップ(または1組のストリップ)に混合物を適用するアプリケーション、ならびに(e)(1または複数の)ラテラルフローストリップをスキャンし、結果を出力して、バイオマーカーの量または電離放射線への人の被曝の評価を報告するコンパクトリーダーシステムを含む。

【0019】

特定の実施形態では、キットのリーダーシステムが、励起レーザー、ウィックセレクター(wick selector)、放射フィルター、収集光学装置類、および強度センサーを含み、特に、センサーが、光電子増倍管、電荷結合素子(CCD)、または相補性金属酸化膜半導体(CMOS)を含む。

10

【0020】

本発明はまた、入口、それぞれが、血球ではなく血漿を通過させるのに十分な、約650nmなどのようなポアサイズを有する内腔および壁を含む、複数の細長い中空アフェレーシスファイバー、チャンパー、および出口を含む血液フィルターデバイスであって、入口が、内腔と大部分が流体接続しており(in bulk fluid connection with)、ファイバーが、チャンパー内に含有され、チャンパーが、出口と大部分が流体接続しており、操作中に、血液が入口から内腔に入り、血漿が、ファイバーの壁を通過してチャンパーの中に入り、その後、出口から出る、血液フィルターデバイスをも提供する。

20

【0021】

特定の実施形態では、本発明のデバイスが、4~100または5~25本の細長く平行なファイバーを含む、100ul未満のデッドボリュームを有する、および/または、細胞溶解を回避するために2PSI未満の圧力を必要とする。

【0022】

本発明は、あたかもそれぞれが入念に個々に記載されるかのように、詳述されるすべての実施形態の組み合わせを特に提供する。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1(a)】中空系管分離の実施形態の概略図を示す図である。LFAランニングバッファーと混合された全血は、中空系管を含有する直列のフィルターに押し込まれる。中空系管のポアサイズは約650nmであり、これは血漿を通すが、細胞は通さない。結果として生じる血漿は、出力先で収集される。

30

【図1(b)】フィルターアセンブリーの固体部分(solid works)の概略図を示す図である。チャンパー全体は、60ulのデッドボリュームを有する。

【図2】サンプルフィルタリングデバイスの内側の特徴を示す図である。挿入図は、ラテラルフローストリップに接続されたデバイス全体を示す。ランニングバッファーは、収集された全血を希釈し、阻止シール(foil seal)によって引き止められる。プランジャーは、チャンパーの下方へ移動し、阻止シールが貫通し、ランニングバッファーがサンプルを下方へ、を介して、中空系管分離デバイスまで移動するのを可能にする。中空系管は、血球から、血漿およびランニングバッファーの混合物を分離する。

40

【発明を実施するための形態】

【0024】

血液サンプルは、見込みのある放射線に应答性のマーカーを同定するために、イムノアッセイ技術およびLC-MS/MS技術の両方を使用して分析した。NHPモデルでは、発明者らは、放射線被曝に応じて変化する30種を超える血漿タンパク質を同定した-これらのうちの25種はアップレギュレートされ、5種はダウンレギュレートされる。これらのタンパク質のたった4つのパネル(Fms関連チロシンキナーゼ3リガンド-Flt3L、唾液アルファアミラーゼ-AMY1A、インターロイキン15-IL15、および

50

1 抗キモトリプシン - A C T ) が、 > 9 6 % の精度で N H P 照射研究サンプルを正確に分類することができる。 I L 1 5 を好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン ( N G A L ) に置き換えても、本質的に同一の結果がもたらされる。 4 つ ( またはそれ以上の ) タンパク質の他の組み合わせもまた、優れた分類スコアを実現し、これらは、放射線に曝露された動物および交絡条件を有する動物を識別するのに有用であると分かった。

【 0 0 2 5 】

N H P パネル由来のタンパク質のうち 3 つ ( F l t 3 L 、 I L 1 5 、 および A M Y 1 A ) は、現在まで分析された全身照射 ( T B I ) ヒトサンプルについて優れた分類指標になる。これらの 2 つのタンパク質のみで、 9 5 % の精度でヒトデータセットを分類することができ、軽度の ( または重篤な ) 感染症によっても外傷によっても交絡されない。

10

【 0 0 2 6 】

発明者らはまた、関心のある 4 つの異なる標的に対する、ラテラルフローアッセイをベースとしたアップコンバーティング蛍光体 ( U P T ) レポーターを開発し、それらを組み合わせ、 2 つのデュプレックスアッセイにした。調査した 4 つの標的は、 F l t 3 L 、 A M Y 1 A 、 C 反応性タンパク質 ( C R P ) 、 およびテネイシン - C ( T N C ) を含んだ。以前の政府出資の下で実証されたように、 U P T ラテラルフローシステムは、 1 5 分未満で E L I S A と同等の感度を実現することができ、そのため、 P O C 放射線生体線量計についての B A R D A のビジョンを実現するための理想的なプラットフォームとなる。

【 0 0 2 7 】

発明者らはまた、 U P T ラテラルフローアッセイと共にリーダーシステムをも開発した。従来のイムノアッセイと同等の感度は、 F l t 3 L および A M Y 1 A について実証された。指の刺し傷からわずかな血液量を収集し、血球から血漿を分離し、バッファーと血漿を混合し、ラテラルフローデバイスにある一定量を適用することができる、新規なサンプル収集ツールを開発した。

20

【 0 0 2 8 】

発明者らは、 5 つまでの異なる標的に対する製造可能なラテラルフローアッセイおよび 4 つの標的に対するマルチプレックスアッセイ、カスタマイズされたラテラルフローカセットに統合されたサンプル収集システム、ならびにリーダーシステムを開発した。

【 0 0 2 9 】

N H P ベースラインサンプル ( S R I 研究 A 2 4 6 - 1 2 ) : 発明者らは、 2 8 匹の N H P のコホートからベースラインサンプルを収集した ( N I H 契約 ( N I H - N I C H D 契約 H H S N 2 7 5 2 0 0 9 0 0 0 1 4 C ) に基づいて S R I で維持された 1 4 匹のオスおよび 1 4 匹のメスのアカゲザル ) 。 N I H からの承認に際して、これらの動物を B A R D A 生体線量測定 ( b i o d o s i m e t r y ) プロジェクトに移し、 S R I 研究 A 2 4 6 - 1 2 に登録した。これらの動物は、 1 1 ~ 1 6 歳の年齢の範囲にわたった ( 下記に記載した研究 M 9 1 8 - 1 2 において使用した約 4 歳の N H P よりもかなり年をとっている ) 。この研究の目標は、 M o n t r e a l 、 C a n a d a の C i T o x L A B で計画された放射線研究に由来する照射および偽処置 N H P サンプルにより、バイオマーカー検証研究に向けての、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法 ( L C / M S - M S ) および E L I S A 法の開発ならびに標的タンパク質基準範囲の確立のために、血漿サンプルを

30

40

【 0 0 3 0 】

サンプルは、 4 週間にわたってこれらの動物から収集した。オスの動物は、毎週 2 回サンプリングし、メスの動物は毎週 1 回サンプリングした。各週、平均 1 2 5 0 0  $\mu$  l の一定分量を、それぞれのオスの動物から集め、 8 5 0 0  $\mu$  l の一定分量をそれぞれのメスの動物から集めた。合計 4 8 および 3 2 の一定分量を、それぞれのオスおよびメスの動物からそれぞれ得られた。研究の終了時に、動物を N I H 契約先に返した。

【 0 0 3 1 】

N H P 照射研究 ( S R I 研究 M 9 1 8 - 1 2 ) : 試験的非 G L P 照射研究 ( S R I 研究 # M 9 1 8 - 1 2 、 C i T o x L A B 研究 # 2 0 1 2 - 0 8 8 3 ) を行い、完了させた。

50

研究の目的は、オスおよびメスの照射アカゲザルの血液および唾液におけるバイオマーカーパネルの開発のためのサンプルを提供することであった。

【0032】

2匹の予備の動物/性別を含む54匹のアカゲザル(27M/27F)を、2012年6月15日にPacific Resources(Kunming Biomed International)から受け取った。動物の年齢は、2.5~5.1歳の範囲にわたった。体重は、オスについて3.4~6kgおよびメスについて3.0~4.8kgの範囲にわたった。適切な健康状態の評価は、動物受け取りの前、後、および研究の全過程の間、動物を無作為化して行った。研究スケジュールはずらした。研究M918-12の計画を、表2に記載する。

10

【0033】

リアルタイム線量測定は、電位計を有するMarkus電離箱を使用して、研究の前に行い、加えられた線量の精度は、決められた放射線量の1%の範囲内にあることが決定された。ナノドットもまた、線量検証用の動物の胴体(前および後ろ)ならびに頭(前頭部および後頭部)に置いた。ナノドットからの半定量的結果は、±10%の精度の範囲内で加えられた線量を確認した。

【0034】

動物は、照射後7日間、観察した。動物は、非照射動物(グループ1)をグループ6に再度割り当てた以外、全身照射法後に観察された有害な臨床的なサインの前に、7日目に人道的に安楽死させた(表3における研究計画を参照されたい)。グループ6の動物もまた、照射後7日間、観察し、その後、人道的に安楽死させた。

20

【0035】

到着後、この研究の過程の全体にわたって、動物は、死亡率チェックのために毎日観察した。詳細な試験は、投与前、1、3、5、および7日目に実行した。臨床的なサインは、毎日2回観察した(感染症、出血、および粘膜炎ならびに下痢の評価に特に注意した)。体温および食欲を毎日モニターした。体重は、処置前、1、3、5、および7日目に記録した。血液採取(hematology)は、10回の時点:-3、-2、-1、1、2、3、4、5、6、および7日目ですべての動物に対して実行した。

【0036】

頬の細胞および全血サンプルを6回;照射前、照射後(4~12時間)、ならびに1、2、3、および7日目に動物から収集した。

30

【0037】

血液の結果は、すべての照射グループからの動物が、投与依存的な重症度で、1~7日目まで、リンパ球数を含む白血球の著しい減少を示したことを示す。好中球、白血球、リンパ球、および血小板数の低下ならびに体重の減少もまた、8および10Gyに曝露された動物において観察された。照射後に注目された臨床的なサインは、無食欲、活動レベルの減少;嘔吐および下痢を含み、最も高い照射線量でより頻繁に観察された。グループ6(10Gy)の1匹のメスは、低体温症、振戦、および活動レベルの重度の減少を示し、終了前6日目に安楽死させた。

【0038】

NHP照射研究(SRI研究M920-12):発明者らは、2、5.5、および6.5Gyの放射線に曝露されたまたは偽処置された32匹のNHP由来の血漿サンプルをCitoxLABから受け取った。これらのサンプルは、BARDAの契約の下でChromologicが行った研究に由来した。最終的な血液サンプルは、照射の7日後に収集された。SRI研究番号M920-12をこの研究に割り当てた。血液サンプルの収集にP100チューブが使用され、結果として生じた血漿量は、0.2mLの複数の一定分量に分配され、凍結して輸送された。

40

【0039】

ヒト患者研究:放射線治療患者:Stanford University Medical Center(SUMC)のDr. Susan Knoxと共同で、ヒト放射線

50

治療患者由来のサンプルは、全身（TBI）または部分（TLI）照射された39の新しい患者サンプルの追加により存続させた。患者はすべて、化学療法を以前に受けていたが、照射の30日以内に化学療法を受けた患者はいなかった。TBI患者は、全身にわたる線量を受けた。TLI患者は、彼らの体の中心部分にわたるが、頭部、首、および肝臓の大部分を除外した線量を受けた。患者の年齢、性別、医学的状態、放射線/医学的治療、線量分割、および血液採取などのようなデータは、発明者らに利用可能にした。

【0040】

SUMCで使用したTBIに対する標準的な治療計画は、3回の120cGy/日を含み、それぞれの線量は、3日間、約3時間ずつ分けた。StanfordでのTLI患者についての標準的な治療計画は、主なリンパ組織への約10日間の120cGy/日の局所照射線量を含むが、肺、肝臓、腎臓、およびできるだけ多くの腸などのような組織を遮蔽する。TLI照射線量は非骨髄破壊性であるのに対して、TBI照射線量は、骨髄破壊性であり、骨髄移植の成功率を増加させる。そのうえ、TLI患者は、T細胞を抑制するために、放射線被曝の直後に、ある用量のウサギ抗胸腺細胞グロブリン（ATG）を受け、移植の準備を患者に施す。ほとんどすべての患者は、様々なアルキル化剤による化学療法を以前に受けていた。

10

【0041】

発明者らは、TLI患者について、第1の放射線治療の前、その後、2または3回の収集時点、典型的に、各120cGy被曝の24時間後に、血液サンプルを収集した。TBI患者由来のサンプルは、処置前ならびに第1および第2の360cGy線量の約24時間後に収集した。

20

【0042】

ヒト交絡因子研究：交絡条件を有するヒト患者由来の血液サンプルの収集は、重篤な感染症を有する12の患者由来の血清サンプルを含んだ。軽度の感染症が、大量の死傷者の場合には、個人においてより可能性の高い交絡因子になってしまうという理由から、発明者らは、重篤な感染症を有する患者由来のサンプルの収集を中止し、軽度の感染症を有する患者から収集されたサンプルの評価に専念した。軽度の感染症を有する28人の患者由来のサンプルを収集し、分析した。67人のさらなる外傷患者由来のサンプルもまた、収集し、分析した。

30

【0043】

イムノアッセイ法：実行したイムノアッセイは、従来のシングルプレックスELISAまたはLuminoxマルチプレックスプラットフォームを利用した。両方のアッセイタイプは、サンドイッチ方式で実行する（測定されることになる分析物は、2つの一次抗体-捕捉抗体および検出抗体の間で結合する）。ELISAでは、興味のある抗原は、プレートに付加された捕捉抗体を介して固定される。次いで、抗原は、直接（標識一次抗体によって）または間接的に（標識二次抗体によって）検出される。この方法は、高感度で、頑健（robust）である。

【0044】

Luminoxにおいて、捕捉抗体を、蛍光マイクロスフェアに結合し、分析物の結合は、ビオチン化検出抗体およびフィコエリトリン（PE）カップルストレプトアビジンを使用し、フローサイトメーターによって測定する。複数の分析物に対する捕捉抗体を異なる蛍光特性を有するマイクロスフェアにコンジュゲートすると、単一のサンプル中で複数の分析物を同時に測定することが可能である。この有意な利点は、サンプル容量が限られている場合に役立つ。さらに、蛍光ベースの検出系は、典型的に、比色定量ELISAよりも優れた感度を提供する。

40

【0045】

それぞれのアッセイについて、発明者らは、標的タンパク質濃度（Y軸）に対してそれぞれの標準濃度のシグナル（X軸）をプロットすることによって、標準曲線を得る。それらの結果を使用して、発明者らは、4パラメーター（ELISA）または5パラメーター（Luminox）回帰分析を介して最良適合曲線を生成し、正確で（実際の値と比較し

50

た計算値)、再現可能な結果を提供する標準曲線の一部を使用して、興味のあるサンプルの値を計算する。標準曲線の範囲から脱落する吸光度を有するサンプルは、さらに希釈した後再び試験し、次いで、結果の分析後に標準曲線から得られた濃度に希釈係数をかけた。

#### 【0046】

UPT試薬&LFA法：ラテラルフローアッセイ(LFA)検出限界および変動係数(CV)を改善するために、発明者らは、2つの変えることができるものに焦点を当てることによって新しい蛍光体試薬を開発した：(1)様々なサイズ粒子の生成および(2)様々なリンカー化学作用の試験。発明者らは、UPT粒子を生成するために以前使用されたプロセスに改良を加えた、また、現在、UPT粒子のサイズを効果的にコントロールすることができる。これは、UPT粒子前駆物質を生成するために利用されるプロセスパラメーター、特に溶媒および全レアアースイオン(REI)濃度の操作によって達成される。発明者らは、3つの特有の色を有する9つのより小さな蛍光体を同定した(表4)。

10

#### 【0047】

いくつかの蛍光体-抗体コンジュゲーション戦略について調査した。プロセスは、架橋剤による粒子表面機能化、抗体コンジュゲーション、非結合抗体を除去するための洗浄、および蛍光体粒子濃度の最終的な調整を含む。小さな蛍光体に抗体をコンジュゲートするための最適な方法を決定するために、発明者らは、緑色の蛍光体を用い、4つの異なる架橋剤を介して抗体にそれらを付加した。そのうえ、発明者らは、それぞれのコンジュゲーション方法について3つの異なる蛍光体結合部位対抗体の比について試験した。発明者らの分析から、発明者らは、蛍光体に抗体をコンジュゲートするための最良の方法が、20xの抗体対結合部位の比で、カルボン酸末端シランを通してのものであることを決定した。

20

#### 【0048】

LFA感度は、選択される抗体ペア、用いられる材料、および利用されるバッファー構成成分に依存する。興味のある発明者らの標的について、発明者らは、民間の供給源から標的当たり10種までの異なる抗体を購入し、ELISAまたはドットプロットを介してそれらを試験した。発明者らの試験において、発明者らは、興味のある範囲内で、強く特異的なシグナルを産生し、かつ標的タンパク質の高および低濃度を発明者らが区別するのを可能にした、それぞれの標的に対する抗体ペアを選択した。

30

#### 【0049】

上記に記載される新しい蛍光体と共に最適に機能するLFAを作製するために、発明者らは、最良のアッセイ材料を選択するための研究を実行した。発明者らは、3つの新しいコンジュゲート放出パッドを検査し、最良の放出を提供し、最も高い材料稠性を有するとして、G028を選択した。

#### 【0050】

発明者らは、MilliporeおよびWhatmanからの8つの新しいニトロセルロース膜を試験し、蛍光体凝集を低下させるためにいくらか最適化した後に、発明者らの低感度アッセイにHF135をおよび発明者らの高感度アッセイにHF240を選択した。最終的に、発明者らは、7つの異なる吸収パッドを検査し、C048が15分間で最適に機能して、十分な標的ピークおよびより低いバックグラウンドノイズをもたらすことが分かった。

40

#### 【0051】

アップコンバーティング蛍光体を使用して開発されているアッセイはほとんどないので、発明者らは、コンジュゲート放出バッファーおよびランニングバッファーを含むアッセイの非材料的な条件を最適化した。主な問題のうちの1つがコンジュゲート放出パッドからの蛍光体の不十分な放出であるので、発明者らはそこに発明者らの努力を集中させた。発明者らの研究は、様々なバッファーの利用、コンジュゲート放出パッドの前処置、および蛍光体の直接的な超音波処理を含んだ。実行した多数の研究のうちで、発明者らは、蛍光体のパルスプローブ(pulsed-probe)超音波処理は、アッセイの最大の増

50

強をもたらし、より高い標的ピークに関連する、蛍光体の優れた放出およびクリアランスならびにより好適な稠性を提供することを発見した。

#### 【0052】

LC-MS/MS (&MRM)法：照射研究で収集されたサンプルは、LCおよびタンデム質量分析計 (Orbitrap (商標) MS/MS) を使用して分析した。サンプルの発明者らのLC-MS/MSの分析は、ゲルフリー (gel-free) 定量的ショットガン (ボトムアップ) LC-MS/MS プロテオミクスアプローチを利用する。このアプローチでは、特異的なプロテアーゼ酵素が、血漿サンプル由来のものなどのようなタンパク質の複雑な混合物を消化し、ペプチドの混合物を産生する。次いで、ペプチド混合物は、実クロマトグラフィー時間 (real chromatographic time) で、フルスキャンMSモードでペプチドの高解像度で正確な質量測定値を得、フラグメンテーションMS/MSモードでペプチドの配列情報を得る能力を有するハイブリッドOrbitrap質量分析計 (Thermo Scientific) にオンラインでつながれた逆相キャピラリー高速LC (HPLC) によって分離される。このように、何千ものペプチドを、自動化ソフトウェアパッケージを使用して、単一の分析で、同時にプロファイルし、同定することができる。ペプチド配列およびタンパク分析は、標準的な種特異的タンパク質配列データベースに対して、MS/MSにおいて検出されたトリプシンペプチドについて観察されたフラグメントイオンをマッチングするためのデータベース検索によって決定されるが (Byonic/ComByne、Protein Metrics)、相対的な定量的情報は、サンプルにわたってMSモードにおいて対応するペプチドイオン電流を比較することによって得られる (SIEVE、Thermo Scientific)。全体として、これは、効率的で偏りがないアプローチに相当し、血漿中の放射線応答性タンパク質バイオマーカー候補を同定し、定量化するために本明細書で適用される。有望な新しい標的は、イムノアッセイを使用して、さらに試験した。イムノアッセイのための抗体が入手可能でなかった場合、安定同位体希釈による多重反応モニタリング (MRM) として知られている、同位体標識ペプチド標準物質を用いる標的定量的質量分析法を検証のために適用した。

10

20

#### 【0053】

##### 結果

LC-MS/MS &MRM 結果：NHPサンプル LC-MS/MS分析：

30

サンプル調製法の開発：発明者らは、存在量がより低いタンパク質の濃縮を可能にする、血漿サンプルから非常に豊富なタンパク質を除去するための標準的な免疫除去技術が、NHPのために特別にデザインされた市販の製品がないにもかかわらず、NHP血漿において実行することに成功することができたことが分かった。ヒト血漿における豊富なタンパク質の除去のためにデザインされたいくつかの市販で入手可能な材料を試験した後、ヒト血漿において14種の最も豊富なタンパク質を標的にするようにデザインされたSepro鳥類IgY14除去カラム (Sigma) が、装填量を注意深くコントロールした場合、NHP血漿サンプルについて効率的に作動することが分かった。このカラムからの免疫除去された材料は、Supermixとして知られている免疫除去の第2のステージにつながることができたまたはその代わりに、さらなるタンパク質クロマトグラフィー分離もしくはトリプシン後ペプチド分画にかけ、発明者らがNHP血漿においておよそ500種のタンパク質をプロファイルするのを可能にし、現在までに、NHP血漿プロテオームの最も綿密な研究を実現することができた。決まって濃縮される、いくつかの存在量がより低いタンパク質の例を表5に示す。

40

#### 【0054】

放射線応答性タンパク質候補の同定：前のマウス研究およびNHPのために開発した方法において発明者らが用いた戦略に次いで、発明者らは、最終的な屠殺時に収集されたサンプルからの材料のプールを使用して、放射線応答性タンパク質同定のための発明者らの実験を始めた。このために、多くの一定分量が詳細な分析に利用可能である。発明者らが0 Gyコントロール、1 Gy、5.5 Gy、および6.5 Gyサンプル (オスのみからな

50

ったM920研究)の結果と直接比較することができるように、一定分量を、1 Gy、4 Gy、8 Gy、および10 Gy線量グループからの4匹のオスの動物(M918研究)のそれぞれからプールした。いくつかの放射線応答性タンパク質は、非除去血漿の分析用の3マイクロリットルほどから始めて、より掘り下げた除去/分画方法用の225マイクロリットルの血漿まで、様々に掘り下げた分析で発見された。アップレギュレートされたタンパク質の中で、AMY1A、CRP、ハプトグロビン、およびアルファ-1-抗キモトリプシンは、非除去血漿中に直ちに発見された。たとえば、アルファ-1-抗キモトリプシンに割り当てられる複数のペプチドからのシグナルは、7日目に、最終的に4倍の増加まで、線量の関数として、単調に増加した。さらなる、存在量がより低いタンパク質は、除去血漿において変化していることが発見されたが(たとえばアルファ-アミラーゼおよびロイシンリッチアルファ-2-糖タンパク質)、より掘り下げた除去が、他の潜在的に有望な新しいタンパク質候補を明らかにし、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL、リポカリン2としても知られている)、大唾液腺由来タンパク質、仮説上のタンパク質LOC695018(塩基性唾液プロリンリッチタンパク質2としても知られている)、およびインスリン様成長因子結合タンパク質4(IGFBP4)が有意に増加するように思われた。より掘り下げた血漿分画は、さらなる候補:再生島由来タンパク質3-アルファ様(regenerating islet-derived protein 3-alpha-like)(REG3A)およびGDH/6PGL内質二機能性タンパク質様(GDH/6PGL endoplasmic bifunctional protein-like)をもたらした。

10

20

#### 【0055】

個々の血漿サンプルの分析:様々な線量グループからの初期時点のサンプルのサブセットを、さらなる初期応答性放射線感受性タンパク質をスクリーニングするために処理し、分析した。発明者らは、1日目に、2つの唾液タンパク質アルファ-アミラーゼおよび塩基性唾液プロリンリッチタンパク質2が、強くアップレギュレートされた(>20倍)ことを観察した。

#### 【0056】

サル血漿における唾液タンパク質の同定:表6は、ヒトおよびサルについての全唾液において同定された主な唾液タンパク質を列挙する。NHP血漿サンプルにおける2つの唾液タンパク質の同定を確認した。

30

#### 【0057】

アイソフォーム特異的な変化の同定:血清アミロイドA(SAA)および唾液アミラーゼについて、発明者らは、アイソフォーム特異的な放射線応答を同定し、ELISAアッセイ開発のための詳細な情報をもたらした。

#### 【0058】

要約すると、発明者らは、開発した方法によるM920およびM918 NHPサンプルの発明者らのLC-MS/MSの分析に基づいて、血漿中で26種のアップレギュレートされた候補および5種のダウンレギュレートされた候補(倍数変化によるカットオフ>2倍で)を同定した。結果を表7に要約する。

#### 【0059】

MRM法を使用する確認/検証:発明者らは、同位体標識ペプチド標準物質による標的定量的分析法、MRMを使用して、多くの個々のサンプルをスクリーニングすることによって、バイオマーカー確定のためにELISA分析を補完するため、発明者らのLC-MS/MSの試みを広げた。発明者らは、マウスにおける唾液腺損傷に特異的な耳下腺分泌タンパク質(PSP)のマーカー検証/確認のためにこの方法の利用に以前に成功した。サル研究のためのMRMアッセイは、アミラーゼ、アルファ-1抗キモトリプシン、およびNGALなどを含む、タンパク質候補のために開発した(表8)。概念実証として、発明者らは、アルファ-1抗キモトリプシンからの発明者らのMRM結果を比較した。発明者らのデータは、2つのアッセイ測定値の間で良好な相関性を示す。ELISAの結果と同様に、線量の増加に伴うアップレギュレーションの明らかな傾向が観察された。発明者

40

50

らは、300のM918サンプルおよび30のM920サンプルならびにBioreclamationから購入したNHP血漿の大きなプールから作られた品質コントロールをすべて含むように、18バッチのサンプルを処理し、分析した。アッセイ再現性の例は、除去ステップについて3.8%のバッチ間CVおよび様々なMRMアッセイについて8~26%の全体としてのCVによって実証される。MRMアッセイ確認研究の一部として、6つのサンプルを、新しい一定分量のサンプルの分取からサンプル処理および質量分析法による分析まで全プロセスにかけ、全体的なアッセイ再現性を評価した。

#### 【0060】

ヒトサンプルLC-MS/MS分析：発明者らは、放射線治療患者(TLIおよびTBIの両方)由来の血漿サンプルのさらなるセットについてLC-MS/MS分析を完了させた。IgY上位14除去方法を使用して、発明者らは、いくつかの発明者らが以前に報告した重要な応答性タンパク質についてアップレギュレーションを確認した。これらのタンパク質は、TBI患者サンプルについてAMY1および唾液酸性プロリンリッチタンパク質1/2前駆物質(PRPC)を含んだ。

10

#### 【0061】

放射線による塩基性唾液プロリンリッチ2(PRB2)タンパク質レベルの劇的な増加が得られた。これらの結果により、唾液腺への放射線障害についてのマーカーとしての、以前に報告されたアルファ-アミラーゼ(AMY1)以外の、血漿における2つのさらなる唾液タンパク質の同定が確認された。発明者らはまた、患者のサブセットが、軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質(COMP)について放射線によるアップレギュレーションを示したことを発見した。ヒトTBIサンプルの分析からの結果を表9に要約する。

20

#### 【0062】

イムノアッセイ結果：NHPおよびヒトサンプルセットの両方を、本明細書において記載されるように、タンパク質の様々なパネルについてELISAまたはLuminexイムノアッセイに使用して分析した。

#### 【0063】

NHPサンプル：NHPサンプルセットは、33種までの異なるタンパク質についてイムノアッセイによって二通り分析した。最初のスクリーニング研究は、最も有望な放射線応答性タンパク質を同定するために、M920およびA246サンプルセットに対して実行した。この研究からのより有望なタンパク質は、M918サンプルセットの分析のために使用したパネル中に保持した。それぞれのNHPデータセットにおいて分析したタンパク質の全部のリストを、下記の表10に列挙する。

30

#### 【0064】

イムノアッセイはすべて、標準曲線を生成するために使用される通常のアッセイ較正標準物質とは別個に、標準物質として果たしたNHP血漿のプール(正常で健康な動物由来の)からなるコントロールサンプルを含んだ。これらの血漿コントロールサンプルについてのCVを、興味のある重要なタンパク質のうち2つ、Flt3LおよびACTについて表11および12に列挙する。コントロールサンプルについてのプレート間のCVは、Flt3Lについて約13%(15のプレートで平均して)およびACTについて約16%である。それぞれのプレート上での反復実験について計算した差異%は、典型的に、10%未満であったが、Flt3Lについての少数の実例において高かった(>20%)。

40

#### 【0065】

放射線応答性タンパク質(イムノアッセイによって測定)のうちのいくつかについてのボックスプロットを、AMY1A、ACT、IL15、およびFlt3Lについて調製した。24種の異なるタンパク質について5つの異なる放射線グループおよびコントロールグループの間で実行したt-検定の結果を示すヒートマップを作成した。t-検定は、所定の日のそれぞれの放射線グループのタンパク質濃度のlog10を、同じ日に測定したコントロールグループタンパク質値のlog10と比較することによって実行した。重要な放射線応答性タンパク質は、IL15、IL18、MCP1、ACT、Flt3L、血清アミロイドA、APOA4、ヘモペキシン(HPX)、NGAL、および唾液アミラー

50

ゼを含む。(APOA4、HPX、および唾液アミラーゼについて好適な市販のイムノアッセイキットがなかったため、これらのタンパク質は、イムノアッセイではなくMRMを使用して測定した)。

【0066】

ヒトサンプル：ヒトデータセットは、主として、Flt3L、CRP、クラスタリン、エラスターゼ、唾液アミラーゼ、IL15、ハプトグロビン、アルファフィブリノーゲン、TNC、MCP1、SAP、GCSF、およびIL18を含んだ13種の異なるタンパク質について分析した。ヒートマップは、TBIサンプルセットに対して実行した対応および独立(コントロールに対して)t-検定を示し、放射線応答性である可能性の高いタンパク質を示す(p-値<0.01、1、2、または3日目)。TBI患者については、これらは、Flt3L、唾液アミラーゼ、IL15、ハプトグロビン、MCP1、およびTNCを含む。

10

【0067】

最も重要な放射線応答性タンパク質のうちの2つ、Flt3Lおよび唾液アミラーゼのボックスプロットは、左から右に、コントロールサンプル、軽度の感染症、重度の感染症、外傷、およびTBI患者についての血漿タンパク質濃度のlog10を示す。これらのデータは、両方がTBI患者について優れたマーカーとなることを明らかにする - Flt3Lは、2および3日目に明らかに上昇し、唾液アミラーゼは、照射後のすべての日で明らかに上昇する。Flt3Lは、おそらく、軽度の感染症患者ではなく外傷患者において穏やかに上昇する。軽度の感染症および外傷患者の両方における唾液アミラーゼレベルは、コントロールと有意には異なる。これらの結果は、下記に議論される様々な分類指標により得られた結果と一致して、Flt3Lおよび唾液アミラーゼがヒトにおける全放射線被曝の優れたマーカーとなるという発明者らの発見を補強する。

20

【0068】

LFA結果：発明者らは、非ヒト霊長動物および/またはヒトにおいて放射線被曝後に増加する4つの異なるバイオマーカーについてシングルプレックスおよびデュプレックスアッセイを開発した。これらは、AMY1A、TNC、CRP、およびFlt3Lを含む。AMY1AについてシングルプレックスUP-T-LFAを最初に開発した。このアッセイについて、健康なレベル(10%血漿中10ng/mL)から照射レベル(10%血漿中100ng/mL)まで、シグナルが5.5倍増加する。

30

【0069】

CRPの血漿濃度は、通常、0.5~10ug/mLであり、放射線被曝により1000ug/mLに上がる(TLI患者において)。発明者らのCRP LFAを開発するために、発明者らは、放射線被曝によって引き起こされる高レベルのCRPで必然的に生じるであろうフック効果(hook effect)を回避するために阻害型アッセイを構築した。

【0070】

健康なヒトは、113pg/mLの平均Flt3L血漿濃度を有し、これは、放射線被曝により1000pg/mLまで増加し得る。したがって、Flt3L LFA開発のために、発明者らは高感度アッセイを作り出すことを目指した。これをするために、発明者らは、サンドイッチ型アッセイを選択し、800nmで明るいシグナルを有するYb/Tm Y2O2S蛍光体を用いた。

40

【0071】

そのうえ、発明者らは、AMY1A/CRPおよびFlt3L/TNCについてデュプレックスアッセイを開発した。発明者らは、5%血漿中健康なおよび照射患者に適用可能な濃度の範囲にわたる6つの異なる濃度のAMY1Aおよび6つの異なる濃度のCRPを有する格子状の36のサンプルに対して発明者らのAMY1A/CRPデュプレックスアッセイを試験した。発明者らは、デュプレックスアッセイが、低および高レベルのAMY1AおよびCRPの間の好適な区別をもたらし、AMY1AおよびCRPの測定値が、比較的、互いに無関係であることを発見した。さらに、発明者らは、デュプレックスAMY

50

1 A および C R P 測定値の C V を計算した。A M Y 1 A 測定値の C V は、8 % 未満であったが、C R P 測定値はより変動し、13 % 未満の C V を有した。最初の研究で、発明者らは、C R P、A M Y 1 A、T N C、および F l t 3 L の測定について4つの機能する L F A ならびに C R P / A M Y 1 A および F l t 3 L / T N C について2つのデュプレックスアッセイを開発し、最適化した。

#### 【0072】

データ分析：N H P サンプル。発明者らの照射研究 ( M 9 1 8 - 1 2 ) は、合計 3 0 0 の血漿サンプルについての5つの時点でのそれぞれのグループに10匹の動物を有する6放射線量グループを含有した。300のサンプルのうち、180は4 Gy 未満であり、120のサンプルは4 Gy または4 Gy 超であった。そのうえ、発明者らは、0、2、5、5、または6.5 Gy の照射に曝露された動物の30の政府提供サンプル ( M 9 2 0 - 1 2 ) を得た。サンプルは、照射後7日目に収集された。発明者らは、330のサンプルのそれぞれにおいて、E L I S A、L u m i n e x、またはM R M を使用して、24種の異なるタンパク質の濃度レベルを決定した。

10

#### 【0073】

それぞれのグループおよび時点 ( 合計 1 0 匹の動物 ) について、発明者らは、グループ平均、標準偏差、最大値、および最小値を決定した。表13は、単一時点 ( 7 日目 ) での1つのタンパク質 ( F l t 3 L ) の代表的な日を示す。そのうえ、発明者らは、すべてのグループおよび時点にわたって単一のタンパク質の放射線応答を視覚化するためにボックスプロットを作り出した。最終的に、発明者らは、すべての時点について、それぞれの照射グループおよび0 Gy コントロールグループの間の対数底10のタンパク質濃度に基づいてt - 検定を実行した。発明者らは、すべてのタンパク質が、分位数 - 分位数プロットを使用して、対数正規分布によって十分に説明されることが分かった。表14は、同じ時点の0 Gy グループと比較した、それぞれのグループおよび時点についてのp - 値を示す。

20

#### 【0074】

単一のタンパク質応答を見ることに加えて、発明者らは、被曝分類指標を得るために複数のタンパク質を互いに組み合わせ、高い ( 4 Gy ) または低い ( < 4 Gy ) 被曝クラスの予測因子として、タンパク質の様々な組み合わせを試験するために、5分割交差確認を7回繰り返した。発明者らは、3つの異なる統計学習アルゴリズムを主として使用した：(1) 条件推測木 ( c o n d i t i o n a l i n f e r e n c e t r e e )、(2) サポートベクターマシン ( S V M )、または(3) ロジスティック回帰分析。定性的に、分類指標は、全般的な精度、正解率に対する特定のタンパク質の重要性の点から同等に機能し、類似するサンプルを決まって誤って分類した。表15は、ロジスティック回帰分析、S V M、または条件推測木統計学習アルゴリズムを使用する、タンパク質の様々な組み合わせについての精度、偽陰性率、および偽陽性率を示す。

30

#### 【0075】

分類指標が同じように十分に機能したので、発明者らは、主として、アウトプットが、高線量または低線量グループに属するサンプルの確率であるという理由から、さらなる分析にロジスティック回帰分析を選択した。表15は、高スコアタンパク質パネルの代表的なセットについてのロジスティック回帰分析による分類指標結果を示す。F l t 3 L および A C T が最も良く機能するパネルに概して含まれることに気づくことは重要であるが、多くの他のタンパク質 ( C R P、I L 1 5、M C P 1、N G A L、A M Y 1 A、および H P ) を、同等の結果がもたらされるよう区別なく使用することができる。このさらなるタンパク質は、発明者らの補足的な交絡研究のように、リスク軽減として果たすであろう。

40

#### 【0076】

上位のパネルのうちの1つは、A C T、A M Y 1 A、I L 1 5、および F l t 3 L であった。表16は、30%の被曝カットオフの確率と共に5分割交差確認を使用する、300のサンプルについてのパネルの精度、感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率、偽陽性率、および偽陰性率を示す。発明者らは、線量の関数として被曝の確率をプロットし、曝

50

露分類についてのカットオフ確率を100%から0%に調整して、データセットについての受信者動作特性曲線を示した。このパネルについての曲線下面積(AUC)は、0.985である。平均して、このパネルは、300のサンプルのうちの290を正確に分類する。表17は、4つの共通の偽陰性サンプルを示す。表18は、6つの共通の偽陽性サンプルを示す。発明者らのやり方を確認するために、発明者らは、初期の照射研究(M918)に基づいて分類モデルを開発し、異なる研究由来の政府によって提供された30のサンプル(M920)のクラスを予測した。これらの動物は、第2の研究において、異なる高線量(5.5および6.5 Gy)ならびに異なる全プロトコールに曝露された。M918研究からのモデルは、30サンプルのうち27を正確に分類し、0の偽陰性および3つの偽陽性を伴った(30%の被曝の確率)。発明者らは、偽陰性に対して偽陽性にバイアスがかかるために30%の被曝の確率を選んだ。そのうえ、発明者らは、発明者らのA246研究からのサンプルに対して発明者らのモデルのサブセット(ACT、FLT3L、およびIL15)を検証することができた。A246研究では、4週間の期間にわたって28匹のより高齢のNHPから採血した。これらの動物は、いかなるガンマ線照射を受けず、そのため、コントロール動物と等価である。発明者らは、これらの動物についてAMY1Aのデータを持っていなかった。練習用に、バイオマーカーパネルのサブセットおよびM918サンプルを使用すると、発明者らは、74のサンプルが曝露されていないと100%予測することができた。これらの74のサンプルについての被曝の最も高い確率は、0.3%であり、放射線バイオマーカーとしてのACT、FLT3L、およびIL15の発明者らの使用を再び確認することができた。

10

20

#### 【0077】

ヒトサンプル。以前に議論されたように、ヒトサンプルイムノアッセイデータに対して実行したt-検定は、TBI患者サンプルにおける重要な放射線応答性タンパク質を示し、主としてFLT3L、AMY1A、IL15、ハプトグロビン、MCP1、およびTNCを含んだ。データにより、いかなる分類指標も使用することなく、ただ2つのタンパク質、FLT3LおよびAMY1Aを使用して、TBIおよびコントロールサンプルの間で得ることができるという区別が示された。ただこれらの2つのタンパク質により、TBI(2.4 Gy)およびTBI(0 Gy)+コントロールグループの間の優れた判別もたらされる。

#### 【0078】

ロジスティック回帰分析においてAMY1A、FLT3L、およびIL15を使用して、5分割交差確認の10回の繰り返しを使用する分類指標により、95.7%の分類精度がもたらされ、偽陰性率および偽陽性率は、それぞれ7%および3.2%である(50%のカットオフ閾値を使用)。同様の精度は、MCP1をIL15またはFLT3Lと交換することによって得ることができる。発明者らは、AMY1A、FLT3L、IL15タンパク質パネルを使用して、ロジスティック回帰分析によって計算したサンプルの5つのグループのそれぞれについての被曝確率をプロットした(コントロール、軽度の感染症、外傷、TBI非曝露、およびTBI照射2.4 Gy)。カットオフ閾値を連続的に変え、それぞれのケースについてTP、FP、TN、およびFN(したがって感度および特異度)を計算することによって、受信者動作特性(ROC)曲線を得ることができる。NHPデータでのケースのように、これは非常に優れたROC曲線であり、曲線下の総面積は、0.98である。これらの結果の確かな特徴は、ヒトパネルが、NHPパネルにおける同じ4つのタンパク質のうちの3つを使用することである。

30

40

#### 【0079】

ヒトTBIデータおよびNHP(およびCRPの場合、マウス)モデルの間の相違は、CRPもACTも放射線応答性であるようには観察されないということである。文献の報告によると、CRPレベルの上昇が、チェルノブイリ事故の犠牲者において(以前はおそらく健康であった)観察されたこと[Mal'tsev et al., 2006]およびTBI患者におけるCRPレベルが、放射線治療の間に上昇するようには思われないこともまた[van der Velden et al., 2010]示される。発明者

50

らは、動物およびヒト T B I モデルの間で 4 つの重要な差異があることを知っている：( 1 ) 照射プロトコル ( 高い単一の急性線量に対して、T B I 患者は、より低い、分割された線量を受けた )、( 2 ) 健康状態 ( 健康な動物に対して、T B I 患者は、重篤である )、( 3 ) 前の処置による被曝 ( 未処置に対して、T B I 患者は、癌細胞を破壊するための化学療法を受けた )、および ( 4 ) サンプル収集時間 ( 動物モデルが急性被曝の 1、2、3、および 7 日目にサンプルを収集するのに対して、T B I 患者サンプルは、常に、分割放射線療法の日後に収集される )。モデルの間の著しい差異を考慮すると、差異について多くの説明が可能であり、発明者らは、N H P モデルが発明者らの診断デバイスについてより代表的なものとなると考える。

#### 【 0 0 8 0 】

リーダーシステム：発明者らは、U P T ラテラルフローアッセイを読み取るための 3 つのリーダーデバイスを構築し、試験した。アルファシステムは、ファイバブラッググレーティングによってロックされた 9 8 0 n m のレーザーからなる。9 8 0 n m ビームは、球面レンズを使用して、3 0 0 μ m のスポットに焦点を合わせる。2 つの微小電気機械システム ( M E M S ) ミラーは、L F A ホルダーにおいて分析されることとなるウィック ( w i c k ) および全 3 0 m m の選択されたウィックを横切るラスターを選択するために使用される。ウィックは、T h o r L a b s から  $f / 2 . 8 \quad 5$  m m 有効焦点距離レンズを使用して画像化される。センサーは、9 8 0 n m の励起レーザー光線をはね返すための帯域フィルターを有する電荷結合素子 ( C C D ) カメラである。発明者らは、M E M S ミラーの任意アクセス制御 ( D A C )、レーザードライバー、および熱電冷却機 ( T E C ) ドライバーを実装するためにカスタムプリント回路板を開発した。システム全体は、タッチスクリーン液晶ディスプレイ ( L C D ) と共に G u m s t i x プロセッサによってコントロールされる。そのうえ、g u m s t i x プロセッサは、ウィックケース上に印刷された Q R コードから標準曲線をロードする高速応答 ( Q R ) コードリーダーをコントロールする。

#### 【 0 0 8 1 】

発明者らは、最後のオプションであるリーダーシステムおよび L F A の再現性について試験した。発明者らは、A M Y 1 A および F l t 3 L 用に L F A を開発した。アッセイの再現性を試験するために、発明者らは、A M Y 1 A 捕捉抗体を有する 1 2 のウィックおよび F l t 3 L 捕捉抗体を有する 1 2 のウィックに縞をつけた。発明者らは、4 つの異なる濃度：5、2 5、5 0、および 1 0 0 n g / m l の A M Y 1 A 分析物ならびに 4 つの異なる濃度：0 . 0 0 2、0 . 1、0 . 5、および 1 n g / m l の F l t 3 L 分析物を試験した。発明者らは、三通りそれぞれの濃度を試験した；そのうえ、発明者らは、それぞれの分析物について合計 3 6 試験について異なる 3 日間、ストリッピングおよび L F A プロセス全体を繰り返した。発明者らは、すべてのサンプルについて日内および日間変動係数 ( C V ) を決定した。表 1 9 は、結果として生じる C V を示す。全体として、C V は、A M Y 1 A アッセイ ( すべての実例において 1 3 % 未満 ) についてよりも、発明者らの F l t 3 L L F A ( すべての実例において 1 0 % 未満 ) についてより好適であった。典型的に、C V は、低濃度よりも高濃度でより悪かった。発明者らはまた、2 つの A M Y 1 A ウィック ( 5 および 5 0 n g / m l ) を 1 5 回測定した、各回でウィックを除去し、再挿入した。これらの 2 つのウィックについての器機 C V は、0 . 8 4 % および 1 . 6 % であった。結果を表 2 0 に示す。

#### 【 0 0 8 2 】

発明者らはまた、従来のフラットなフィルターデバイスよりも低い圧力でクリーナー ( より少ない細胞溶解およびより優れた細胞除去 ) を提供する、中空系フィルターアプローチを含むサンプル収集デバイスを開発した。図 1 は、中空系フィルター機能の概略図を示す。図 2 は、最終的な統合デバイスの概念を示す。発明者らは、マウス血液のサンプルに対して最終的なプロトタイプフィルターデザインについて 1 0 回試験した。サンプルは、2 1 0 μ L のリン酸緩衝食塩水 ( P B S ) により希釈し ( 5 % 血漿濃度の発明者らの最終的なランニングバッファーに似せるために )、2 1 0 n g / m l 濃度でヒト F l t 3 L を

10

20

30

40

50

加えた。結果として生じる血漿における回収容量、細胞継代、細胞溶解、および F l t 3 L 濃度を表 2 1 に示す。細胞継代、細胞溶解、および F l t 3 L の実例では、発明者らのデバイスは、血漿を従来の遠心分離法によって収集したコントロールよりも好適に機能した。

#### 【 0 0 8 3 】

##### 議論

発明者らの研究は、2 Gy ( N H P モデルにおいて 4 Gy ) 超および未満の等価なヒト放射線被曝を識別するための、NHPモデルにおける血漿タンパク質バイオマーカーパネルの実現可能性を実証した。発明者らの最も良い結果は、4つのタンパク質のパネル：A C T、F l t 3 L、A M Y 1 A、および I L 1 5 により得られた。これらの4つのタンパク質を使用して、発明者らの M 9 1 8 ベースライン研究セットにおける 3 0 0 サンプルのそれぞれに対する被曝確率を割り当てるロジスティック回帰分析分類指標は、7回繰り返す5分割交差確認を使用して 9 6 . 5 % の平均分類精度を実現する。練習セットとして M 9 1 8 データを使用して、発明者らはまた、2つの別々の研究から得られた N H P サンプルに基づいて分類指標を試験し、優れた分類精度を実現し、偽陰性はなく、偽陽性は3つのみであった。

10

#### 【 0 0 8 4 】

このパネルのサブセット、すなわち3つのタンパク質 F l t 3 L、A M Y 1 A、および I L 1 5 は、1 0 4 のヒト T B I サンプル ( 3 6 の照射前および 2 . 4 Gy 累積線量の 6 8 の被曝後 ) プラス 8 2 のヒトコントロールサンプルを含有するデータセットを分類するために使用することができ、精度は、9 5 . 7 % であり、偽陰性率および偽陽性率は、それぞれ 7 % および 3 . 2 % である ( 5 0 % のカットオフ閾値を使用 ) 。さらに、分類精度は、外傷および軽度の感染症患者からのサンプルがデータセットに含まれても、有意に低下しない。TBI患者が重症である ( 多くが白血病または他の白血病を有する ) 、免疫無防備状態である ( 患者らは前の化学療法処置の一部として多くの免疫抑制薬を受けた ) 、かつ分割された ( 急性単一ではなく ) 放射線量を受けたという事実を考慮すると、ヒトおよび N H P タンパク質パネルの間の部分的な一致は、注目すべき結果である。これらの結果を考慮して、発明者らは、4つのタンパク質、A C T、F l t 3 L、A M Y 1 A、および I L 1 5 のパネルを好ましいベースラインバイオマーカーパネルと見なす。

20

#### 【 0 0 8 5 】

発明者らはまた、2つの他の放射線応答性タンパク質 ( T N C および C R P ) に加えて、上記のパネルからの標的のうち2つ ( A M Y 1 A および F l t 3 L ) を検出するのに十分に感受性であるラテラルフローアッセイをも実証した。発明者らはまた、A M Y 1 A / C R P および F l t 3 L / T N C による二重アッセイをも実証した。アルファプロトタイプリーダーシステムをデザインし、3つのユニットを構築し、試験した。発明者らは、L F A 試験ストリップの複数の読み取りで < 2 % の再現性を実証した。そのうえ、新規なサンプル収集ツールを開発し、指刺し傷の血液サンプルを収集し、ある一定量の血液をバッファー溶液と混合し、二重ラテラルフローストリップカセットにサンプルを加える、2構成成分のデザインを生み出した。

30

#### 【 0 0 8 6 】

##### 参考文献

A k a s h i , M . , e t a l . ( 2 0 0 1 ) , I n i t i a l s y m p t o m s o f a c u t e r a d i a t i o n s y n d r o m e i n t h e J C O c r i t i c a l i t y a c c i d e n t i n T o k a i - m u r a , J R a d i a t R e s , 4 2 S u p p l , S 1 5 7 - 1 6 6 .  
B a r r e t t , A . , A . J a c o b s , J . K o h n , J . R a y m o n d , a n d R . L . P o w l e s ( 1 9 8 2 ) , C h a n g e s i n s e r u m a m y l a s e a n d i t s i s o e n z y m e s a f t e r w h o l e b o d y i r r a d i a t i o n , B r M e d J ( C l i n R e s E d ) , 2 8 5 ( 6 3 3 6 ) , 1 7 0 - 1 7 1 .

40

50

- Bertho, J.M., and L.Roy (2009), A rapid multiparametric method for victim triage in cases of accidental protracted irradiation or delayed analysis, *Br J Radiol*, 82 (981), 764 - 770.
- Bertho, J.M., et al. (2001), Level of Flt3-ligand in plasma: a possible new bio-indicator for radiation-induced aplasia, *Int J Radiat Biol*, 77 (6), 703 - 712.
- Blakely, W.F., D.J.Sandgren, V.Nagy, S.Kim, and N.Ossetrova (2011), Murine partial-body radiation exposure model for biodosimetry studies - preliminary report, *Radiation measurements*, 46, 898 - 902. 10
- Blakely, W.F., N.I.Ossetrova, M.H.Whitnall, D.J.Sandgren, V.I.Krivokrysenko, A.Shakhov, and E.Feinstein (2010), Multiple parameter radiation injury assessment using a nonhuman primate radiation model - biodosimetry applications, *Health Phys*, 98 (2), 153 - 159. 20
- Brattstrom, C., J.Tollemar, O.Ringden, K.Bergstrom, and G.Tyden (1991), Isoamylase levels in bone marrow transplant patients are affected by total body irradiation and not by graft-versus-host disease, *Transpl Int*, 4 (2), 96 - 98.
- Cao, S., A.B.Troutt, and Y.M.Rustum (1998a), Interleukin 15 protects against toxicity and potentiates antitumor activity of 5-fluorouracil alone and in combination with leucovorin in rats bearing colorectal cancer, *Cancer Res*, 58 (8), 1695 - 1699. 30
- Cao, S., J.D.Black, A.B.Troutt, and Y.M.Rustum (1998b), Interleukin 15 offers selective protection from irinotecan-induced intestinal toxicity in a preclinical animal model, *Cancer Res*, 58 (15), 3270 - 3274.
- Christensson, A., T.Bjork, O.Nilsson, U.Dahlen, M.T.Matikainen, A.T.Cockett, P.A.Abrahamsson, and H.Lilja (1993), Serum prostate specific antigen complexed to alpha 1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer, *J Urol*, 150 (1), 100 - 105. 40
- Cowland, J.B., and N.Borregaard (1997), Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans, *Genomics*, 45 (1), 17 - 23.
- Dubray, B., T.Girinski, H.D.Thames, A.Beccio 50

- lini, S. Porciani, C. Hennequin, G. Socie, M. Bonnay, and J. M. Cosset (1992), Post-irradiation hyperamylasemia as a biological dosimeter, *Radiother Oncol*, 24(1), 21-26.
- Guipaudo, O., and M. Benderitter (2009), Protein biomarkers for radiation exposure: towards a proteomic approach as a new investigation tool, *Ann Ist Super Sanita*, 45(3), 278-286.
- Hong, J. H., C. S. Chiang, I. L. Campbell, J. R. Sun, H. R. Withers, and W. H. McBride (1995), Induction of acute phase gene expression by brain irradiation, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 33(3), 619-626. 10
- Junglee, D., A. Katrak, J. Mohiuddin, H. Blacklock, H. G. Prentice, and P. Dandona (1986), Salivary amylase and pancreatic enzymes in serum after total body irradiation, *Clin Chem*, 32(4), 609-610.
- Lai, Y. G., V. Gelfanov, V. Gelfanova, L. Kulik, C. L. Chu, S. W. Jeng, and N. S. Liao (1999), IL-15 promotes survival but not effector function differentiation of CD8+ TCRalpha beta+ intestinal intraepithelial lymphocytes, *J Immunol*, 163(11), 5843-5850. 20
- Lilja, H., A. Christensson, U. Dahlen, M. T. Matikainen, O. Nilsson, K. Pettersson, and T. Lovgren (1991), Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin, *Clin Chem*, 37(9), 1618-1625. 30
- Lugering, N., T. Kucharzik, C. Maaser, M. Kraft, and W. Domschke (1999), Interleukin-15 strongly inhibits interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 production in human colonic epithelial cells, *Immunology*, 98(4), 504-509.
- Mal'tsev, V. N., A. A. Ivanov, V. F. Mikhailov, and V. K. Mazurik (2006), [The individual prognosis of the gravity and of the outcome of acute radiation disease based on immunological indexes], *Radiatsionnaya biologiya, radioecologiya / Rossiiskaia akademiia nauk*, 46(2), 152-158. 40
- Noto, A., F. Cibecchini, V. Fanos, and M. Musap (2013), NGAL and Metabolomics: The Single Biomarker to Reveal the Metabolome Alterations in Kidney Injury, *Biomed Res Int*, 2013, 612032.
- Ossetrova, N., D. J. Sandgren, and W. F. Blakel 50

- y (2011), C-reactive protein and serum amyloid A as early phase and prognostic indicators of acute radiation exposure in nonhuman primate total-body irradiation, *Radiation Measurements*, 46, 1019 - 1024.
- Ossetrova, N.I., and W.F. Blakely (2009), Multiple blood-proteins approach for early-response exposure assessment using an in vivo murine radiation model, *Int J Radiat Biol*, 85(10), 837 - 850. 10
- Ossetrova, N.I., D.J. Sandgren, S. Gallego, and W.F. Blakely (2010), Combined approach of hematological biomarkers and plasma protein SAA for improvement of radiation dose assessment triage in biodosimetry applications, *Health Phys*, 98(2), 204 - 208.
- Ossetrova, N.I., A.M. Farese, T.J. MacVittie, G.L. Manglapus, and W.F. Blakely (2007), The use of discriminant analysis for evaluation of early-response multiple biomarkers of radiation exposure using non-human primate 6-Gy whole-body radiation model, *Radiation Measurements*, 42, 1158 - 1163. 20
- Patel, S., F.H. Wang, T.L. Whiteside, and U. Kasid (1998), Ionizing radiation and TNF- $\alpha$  and stimulated expression of alpha1-antichymotrypsin gene in human squamous carcinoma cells, *Acta Oncol*, 37(5), 475 - 478.
- Prat, M., C. Demarquay, J. Frick, D. Thierry, N. C. Gorin, and J.M. Bertho (2005), Radiation-induced increase in plasma Flt3 ligand concentration in mice: evidence for the implication of several cell types, *Radiat Res*, 163(4), 408 - 417. 30
- Prat, M., C. Demarquay, J. Frick, N. Dudoignon, D. Thierry, and J.M. Bertho (2006), Use of flt3 ligand to evaluate residual hematopoiesis after heterogeneous irradiation in mice, *Radiat Res*, 166(3), 504 - 511.
- Reinecker, H.C., R.P. MacDermott, S. Mirau, A. Dignass, and D.K. Podolsky (1996), Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin 15, *Gastroenterology*, 111(6), 1706 - 1713. 40
- Roudkenar, M.H., Y. Kuwahara, T. Baba, A.M. Roushandeh, S. Ebishima, S. Abe, Y. Ohkubo, and M. Fukumoto (2007), Oxidative stress induced lipocalin 2 gene expression: addressing its expression under the harmful conditions, *J Radiat Res*, 48(1), 39 - 44. 50

Sharma, M., and J. E. Moulder (2013), The urine proteome as a radiation biodosimeter, *Adv Exp Med Biol*, 990, 87-100.

Shiiba, M., et al. (2013), Lipocalin-2 is associated with radioresistance in oral cancer and lung cancer cells, *Int J Oncol*, 42(4), 1197-1204.

Sugihara, T., H. Murano, M. Nakamura, and K. Tanaka (2013), In vivo partial bystander study in a mouse model by chronic medium-dose-rate gamma-ray irradiation, *Radiat Res*, 179(2), 221-231.

van der Velden, W. J., A. H. Herbers, T. Feuth, N. P. Schaap, J. P. Donnelly, and N. M. Blijlevens (2010), Intestinal damage determines the inflammatory response and early complications in patients receiving conditioning for a stem cell transplantation, *PLoS ONE*, 5(12), e15156.

Zhang, Y., C. Guo, H. Zhang, and S. Dong (2009), Synergistic protecting effect of cord blood CD34+ cells over-expressing both interleukin-3 and Flt3 ligand on lethally irradiated mice, *Int J Hematol*, 90(1), 64-73.

10

20

本発明は、詳述される特定の好ましい実施形態の組み合わせをすべて包含する。本明細書において記載される実施例および実施形態は、説明的な目的のみのためのものであり、それを考慮した様々な修飾または変更は、当業者らに示唆され、本出願の精神および範囲ならびに添付される請求項の範囲内に含まれることが理解される。本明細書において引用される刊行物、特許、および特許出願はすべて、その中の引用文を含めて、すべての目的のために、それらの全体が参照によってこれによって組み込まれる。

30

表1. この研究において観察された重要な放射線応答性タンパク質についての要約データ

【表 2】

タンパク質	通常の発現	調節	機能	放射線応答	参考文献	潜在的な交絡因子
唾液7p77 ミラーゼ (AMY1A)	唾液腺において高度に発現され、また唾液腺、膵外分泌部、および甲状腺にも存在し得る。	1-αナシバ <sup>®</sup> 、レジミン、FGF19、MBO2、PSEMI、SATI、アロゲステロンによって調節される	炭水化物代謝	放射線被曝の約1日後、7p77レベルは低下し、耳下腺への損傷を示す照射マウス、NHP、およびヒトにおいて7p77レベルは上昇している	(1) Kashima, H.I.K., Kirkham, W.R., Andrews, J.R., 1965. Am. J. Roentgenol. 94, 271-291. (2) Blakely et al. Radiation Measurements 42 (2007) 1164 - 1170 (1) Kenins, et al. Journal of Experimental Medicine, Vol. 205, No. 3, March 17, 2008 523-531 (2) Blakely et al. Radiation Measurements 46 (2011) 898e902	耳下腺への損傷、サゴト <sup>®</sup> 、寄生虫の感染症、関節炎
fms関連因子 チラーゼ3リガンド (FHL3)	骨髄間質細胞によって発現される	発現はサイトカイン、IL-2、IL-7&IL-15によって調節されることが知られている	様々な血球前駆体、樹状細胞、骨髄性細胞、TおよびB細胞の増殖および分化をまねる	放射線被曝後約3日後に7p77レベルは上昇し、血球の産生を刺激する。骨髄マーカーおよび放射線誘発性の形成不全におけるマーカー		
好中球チラーゼ 関連因子 (NGAL, LCN2)	脾臓、骨髄におけるリンパ球、好中球および好中球の細胞質、頸部の細胞質内および脾臓細胞において高度に発現される。腎臓、心臓、肺、精巣、および肝臓実質細胞においても発現される	NFκBおよびその関連因子の活性化/そのプロモーター部位への結合を駆動して、その発現を7p77レベルするIL-7によるIL-1、TNFを含む炎症促進性のサイトカインによって調節される。αβ二量体もまた形成する。MMP9とシタグリド結合する。	自然免疫、7p77阻害剤は、および腎臓の発現に関与する鉄輸送タンパク質、細菌増殖を制限するために鉄を隔離する	放射線被曝後1-3日目に7p77レベルは上昇し、増加は炎症促進性のサイトカインの作用によるものとなり得る。照射初期正常肝臓、心臓、腎臓細胞において7p77レベルは上昇し、細胞株における放射線抵抗性に関係	(1) Karlson et al. Journal of Biological Chemistry, 285, 19, pp. 14088-14100, May 7, 2010 (2) Fukumoto et al., J. Radiation Res., 48, pp. 39-44, 2007.	NGALは腎臓傷害で上昇し、そのため、腎機能についての好適なマーカーであることが報告されている
7p77-1 抗キリンシ (ACT, SERPINA3)	肝臓において、また、大脳皮質の上皮細胞、肺マクロファージ、腎尿管において主に合成される血漿タンパク質	IL-6、TNF、IL-1、IL-22、およびSTAT3によって調節される	7p77-1阻害剤は、過剰なタンパク質分解、活性性から組織を保護する。炎症によって誘発される急性期応答タンパク質	放射線被曝後1-3日目に7p77レベルは上昇し、増加は炎症促進性のサイトカインの作用によるものであり得る	ACTは、7p77の全身または頭部のみの照射の後にマウスにおける大脳組織において7p77レベルは上昇した (1) Hong et al, JROBP, 1995	7p77-1病、ハンチントン病、バネキン病
インターロイキン15 (IL15)	上皮細胞、間質細胞、ならびに樹状細胞、単球、およびマクロファージなどのような免疫細胞によって広く発現されるサイトカイン	GM-CSF、IFNγなどのようなサイトカインまたはLPSなどのような毒素によって刺激される	Tおよびチェラリン <sup>®</sup> 細胞活性化および増殖を調節する	放射線被曝後17日目に7p77レベルは上昇し、増加は炎症促進性のサイトカインの作用によるものであり得る	(1) Fehniger, T. and Calligaris, M., Blood, 2001 97: 14-32 (2) Melenhorst JJ, et al., Haematologica 2012;97(6):867-873.	炎症性腸疾患、多発性硬化症、C型肝炎、T細胞白血病&リンパ腫

10

20

30

40

【表 3】

表2. M918-12 NHP 照射研究デザイン

グループ	目標放射線量 レベル (Gy)	近似放射線量率 (Gy/分)	動物の数	
			オス	メス
1	0	0.60	5	5
2	1		5	5
3	2		5	5
4	4		5	5
5	8		5	5

10

【表 4】

表3. グループ6 M918-12研究デザイン

グループ	放射線量 レベル (Gy)	近似放射線量率 (Gy/分)	動物の数	
			オス	メス
6	10	0.60	5	5

【表 5】

表4. アップコンバーティング蛍光体ナノ粒子セット

ID	材料	前駆物質	活性化 *C	サイズ、nm
P1	Yb/Er Y2O2S	BARDA-01	1350	300
P2	Yb/Er Y2O2S	BARDA-09	1350	190
P3	Yb/Er Y2O2S	BARDA-12	1350	250
P4	Yb/Er Y2O2S	BARDA-17	1350	150
P5	Yb/Er Y2O2S	BARDA-18	1350	190
P6	Yb/Er Y2O2S	BARDA-20	1350	180
P7	Yb/Er Y2O2S	BARDA-20	1450	180
P8	Yb/Er Y2O2S	BARDA-27	1450	150
P9	Yb/Er Y2O2S	BARDA-28	1450	190
P10	Yb/Er Y2O2S	BARDA-21	1400	150

20

30

## 【表 6】

表5. IgY抗体除去/分画技術を使用してプールされたサル血漿において  
 決まって濃縮されるいくつかの存在量がより低いタンパク質のリスト

グルタチオンペルオキシダーゼ	コレステリルエステル移入タンパク質様
マンナン結合レクチンセリンプロテアーゼ1	システインリッチ分泌タンパク質
膜貫通糖タンパク質NMB	インテレクチン(intelectin)-1様
細胞外マトリックスタンパク質1	フィラミン-A
チロキシン結合グロブリン	CD109抗原様アイソフォーム1
ヒアルロナン結合タンパク質2	カテプシンDアイソフォーム3
スルフヒドリルオキシダーゼ1様タンパク質	コアクトシン(coactosin)様タンパク質様アイソフォーム2
肝細胞成長因子活性化因子様タンパク質	神経細胞接着分子1
インスリン様成長因子結合タンパク質	カルボニックアンヒドラーゼ1
アディポネクチン	シスタチン-C
色素上皮由来因子様タンパク質	14-3-3タンパク質ゼータ/デルタ様アイソフォーム
ビオチニダーゼ	細胞間接着分子1(ICAM1)
フォンウィルブランド因子	ベータ-2-ミクログロブリン(B2MG)
ガレクチン-3-結合タンパク質	

10

20

## 【表 7】

表6. ヒトと比較して、NHPにおける唾液タンパク質配列の確定のために全唾液において  
 同定された主なタンパク質のリスト

NHP唾液において同定された上位タンパク質	ヒト唾液において同定された上位タンパク質
アルファ-アミラーゼ	唾液アルファ-アミラーゼ
シスタチン-S(シスタチン-4)、シスタチンD(シスタチン-5)、シスタチン-B	シスタチン-1、-2、および-4
仮説上のタンパク質LOC722356(ヒトの唾液酸性プロリンリッチリンタンパク質1/2に類似)	プロリンリッチタンパク質HaeIIIサブファミリー2(唾液酸性プロリンリッチリンタンパク質1/2としても知られている)
仮説上のタンパク質LOC695018(塩基性唾液プロリンリッチタンパク質2としても知られている)	塩基性唾液プロリンリッチタンパク質1および2
ムチン-19	ムチン-5B
短口蓋(short palate)、肺、および鼻粘膜上皮がん関連タンパク質2ならびに殺細菌性透過性増大作用(BPI)折り畳み(fold)含有ファミリーBメンバー1(長口蓋(long palate)、肺、および鼻粘膜上皮がん関連タンパク質1としても知られている)	プロラクチン誘発性タンパク質
カルボニックアンヒドラーゼ6	カルボニックアンヒドラーゼ

30

【表 8】

表7. 消化サル血漿サンプルを使用して、同定し、定量化した放射線応答性候補タンパク質 (ショットガンゲルフリー法)

タンパク質名称	線量	日	増加 または 減少	観察された 最大倍数 変化
アミロイドAタンパク質アイソフォーム1または2(SAA1またはSAA2)	10 Gy	7	増加	>200*
c-反応性タンパク質(CRP)	10 Gy	7	増加	>100*
再生島由来3アルファ(Reg3A)	8または10Gy	7	増加	>20*
インスリン様成長因子結合タンパク質4(IGFBP4)	8または10Gy	7	増加	>20*
アルファ-アマラーゼ	8または10Gy	1	増加	>20*
塩基性唾液プロリンリッチタンパク質	8または10Gy	1	増加	>10*
ハプトグロビン(HP)	10 Gy	7	増加	>10*
アルファ-1-抗キモトリプシン	10 Gy	7	増加	7.1*
アルファ-1-酸性糖タンパク質1または2	10 Gy	7	増加	5.6*
GDH/6PGL内質二機能性タンパク質様(GDH)	8または10Gy	7	増加	>5*
シスタチン-B(CSTB)	8または10Gy	7	増加	>5*
リンパ管内皮ヒアルロン酸受容体1(LYVE1)	6.5 Gy	8	増加	~5*
好中球セラチナーゼ関連リポカリン(NGAL、別名リポカリン2、LCN2)	8または10Gy	7	増加	~5*
リポ多糖結合タンパク質(LBP)	10 Gy	7	増加	~3.5*
アンジオテンシノゲン(AGT)	10 Gy	7	増加	3.2*
ロイシンリッチアルファ-2-糖タンパク質(LRG1)	10 Gy	7	増加	3.2*
ヘモベキシン様(HPX)	10 Gy	7	増加	2.9*
補体成分C9(C9)	10 Gy	7	増加	2.6*
フィブリノーゲン(FGA、FGB、FGG)	10 Gy	7	増加	2.3*
インター-アルファトリプシン阻害剤重鎖H4(ITIH4)	10 Gy	7	増加	2.3*
インター-アルファトリプシン阻害剤重鎖H3(ITIH3)	10 Gy	7	増加	2.1*
補体C5(C5)	10 Gy	7	増加	1.8*
補体C3、部分的(C3)	10 Gy	7	増加	1.8*
補体C4(C4A、C4B)	10 Gy	7	増加	1.9*
アルファ-1-抗トリプシンアイソフォーム4(SERPINA1)	10 Gy	7	増加	1.9*
カタラーゼアイソフォーム2(CAT)	6.5 Gy	8	増加	~2*
アポリポタンパク質A-IV(APOA4)	10 Gy	7	減少	~-10*
ガレクチン-3-結合タンパク質アイソフォーム3(LGALS3BP)	6.5 Gy	8	減少	-4*
ゲルゾリン(GSN)	10 Gy	7	減少	-3.1*
イズロネート2-スルファターゼアイソフォーム4(IDS)	6.5 Gy	8	減少	~-2*
プロペルジン様(別名補体因子P、CFP)	6.5 Gy	8	減少	~-2*

10

20

30

【表 9】

表8. NHPにおいてLC-MS/MSによる標的確認に使用される安定同位体ペプチドのリスト---ELISAアッセイが有効でない場合に補足。\*重同位元素標識アミノ酸

タンパク質	ペプチド#	ヘモベキシン	8
アルファ-アマラーゼ	1	GDH/6PGL内質二機能性	9
アルファ-アマラーゼ	2	GDH/6PGL内質二機能性	10
アルファ-アマラーゼ	3	NGAL	11
プロリンリッチ唾液塩基性タンパク質	4	シスタチンB	12
抗キモトリプシン	5	シスタチンB	13
抗キモトリプシン	6	A1AG1	14
ヘモベキシン	7	Reg3A	15

40

【表 1 0】

表9. 消化ヒト血漿サンプル(TBI放射線治療患者)を使用して、同定し、定量化した放射線応答性候補タンパク質(ショットガンゲルフリー法)

タンパク質名称	線量/処置	日	増加 または 減少	観察された 最大倍数 変化
AMY1_HUMAN アルファ-アミラーゼ1 (唾液アルファ-アミラーゼ)	240-720 cGy /TBI	1-2	増加	>10**
PRPC_HUMAN 唾液酸性プロリンリッチリン タンパク質1/2前駆物質 (PRP-1/PRP-2)	240-720 cGy /TBI	1-2	増加	>10**
PRB2_HUMAN 塩基性唾液プロリンリッチタンパク質 2前駆物質(唾液プロリンリッチタンパク質)	360-720 cGy /TBI	1-2	増加	>10**
COMP_HUMAN 軟骨オリゴマーマトリックス タンパク質前駆物質	360-720 cGy /TBI	1-2	増加	~3**

\*\* 処置前と比較

【表 1 1】

表10. NHP血漿サンプルセットにおいてイムノアッセイによって測定されたタンパク質

SRI 研究番号	タンパク質
M918-12	GCSF, GIP, IL15, IL18, MCP1, A1AGP, ApoC1, CDT, CRP, CST6, ACT, クラスリン, エラスターゼ, Flt3L, ハプトグロビン, IDS2, LYVE, 唾液アミラーゼ, TNC, およびトランスフェリン
M920-12	A1AGP, ApoC1, CDT, ACT, クラスリン, エラスターゼ, Flt3L, ハプトグロビン, 唾液アミラーゼ, TNC, TNFa, IL-6, IFNy, IL-18, IL-13, GM-CSF, VEGF, IL-1ra, IL-1b, IL-5, IL-12/23(p40), sCD40L, IL-15, MIP-1b, MIP-1a, TGFa, IL-8, IL-10, MCP-1, IL-17A, IL-4, IL-2, G-CSF
A246-12	ApoC1, CDT, ACT, クラスリン, エラスターゼ, Flt3L, ハプトグロビン, 唾液アミラーゼ, TNC, TNFa, IL-6, IFNy, IL-18, IL-13, GM-CSF, VEGF, IL-1ra, IL-1b, IL-5, IL-12/23(p40), sCD40L, IL-15, MIP-1b, MIP-1a, TGFa, IL-8, IL-10, MCP-1, IL-17A, IL-4, IL-2, G-CSF

【表 1 2】

表11. プレート間CVを示す11のACT ELISAプレートについてのコントロール血漿サンプルにおけるACTの反復実験値

プレート	反復実験値	平均	差異%
CYT_N_M918_2013_01_30_P1	172906.073 179355.468	176130.771	3.66%
CYT_N_M918_2013_01_30_P2	169251.393 154242.947	161747.17	9.28%
CYT_N_M918_2013_01_30_P3	159668.12 158470.231	159069.176	0.75%
CYT_N_M918_2013_01_30_P4	148736.277 147457.546	148096.912	0.86%
CYT_N_M918_2013_02_05_P1	144767.941 151323.591	148045.766	4.43%
CYT_N_M918_2013_02_05_P2	140224.426 138153.511	139188.969	1.49%
CYT_N_M918_2013_02_05_P3	141622.666 142416.062	142019.364	0.56%
CYT_N_M918_2013_02_05_P4	151292.676 155156.751	153224.714	2.52%
CYT_N_M918_2013_03_20_P1	163513.535 160974.121	162243.828	1.57%

CYT_N_M918_2013_03_20_P2	231863.844 232378.541	232121.193	0.22%
CYT_N_M918_2013_03_20_P5	139811.525 141020.278	140415.902	0.86%
	プレート間平均 プレート間STD プレート間CV	160209.433 26344.9624 16.44%	

【表 1 3】

表12. プレート間CVを示す15のACT ELISAプレートについてのコントロール血漿サンプルにおけるFlt3Lの反復実験値

プレート	反復実験値	平均	差異%
FLT3L_N_M918_2012_09_11_P3	0.611 0.594	0.6025	2.82%
FLT3L_N_M918_2012_09_11_P3	0.699 0.599	0.649	15.41%
FLT3L_N_M918_2012_09_11_P4	0.635 0.658	0.6465	3.56%
FLT3L_N_M918_2012_09_18_P1	0.8 0.71	0.755	11.92%
FLT3L_N_M918_2012_09_18_P2	0.905 0.916	0.9105	1.21%
FLT3L_N_M918_2012_09_18_P3	0.845 0.859	0.852	1.64%
FLT3L_N_M918_2012_09_18_P4	0.895 0.825	0.86	8.14%
FLT3L_N_M918_2012_12_07_P1	0.841 0.922	0.8815	9.19%
FLT3L_N_M918_2012_12_07_P2	0.83 0.865	0.8475	4.13%
FLT3L_N_M918_2012_12_07_P3	0.803 0.874	0.8385	8.47%
FLT3L_N_M918_2012_12_07_P4	0.625 0.591	0.608	5.59%
FLT3L_N_M918_2012_12_12_P1	0.815 0.81	0.8125	0.62%
FLT3L_N_M918_2012_12_12_P2	0.791 0.756	0.7735	4.52%
FLT3L_N_M918_2012_12_12_P3	0.909 0.691	0.8	27.25%
FLT3L_N_M918_2012_12_12_P4	0.779 0.724	0.7515	7.32%
	プレート間平均 プレート間STD プレート間CV	0.773 0.102 13.18%	

【表 1 4】

表13. 単一の時点(7日目)の単一のタンパク質(FLT3L)についての代表的なデータそれぞれの放射線量グループは10匹の動物に相当する。すべての時点(0,1,2,3,および7日目)のすべてのタンパク質(合計24種)について、発明者らは、それぞれのグループについてng/mlで、平均、標準偏差、最小値、および最大値を計算する。下記のデータは、放射線量が7日目まで増加するとともに平均FLT3L濃度が著しく増加することを示す。

タンパク質	グループ	7日目			
		平均	SD	最小	最大
Flt3L	0 Gy	0.053111	0.020134	0.031	0.0875
	1 Gy	0.0556	0.028857	0.031	0.117
	2 Gy	0.1713	0.101167	0.054	0.352
	4 Gy	0.5481	0.10442	0.401	0.6685
	8 Gy	0.8579	0.387034	0.21	1.554
	10 Gy	0.60405	0.175363	0.433	0.954

【表 1 5】

表14. それぞれの日の照射グループを同じ日のコントロールグループ(0Gy)と比較するt-検定から結果として生じるp値の対数底10. 日ごとの比較は、発明者らが、それぞれの動物についての血液サンプリングの影響を排除することを可能にする。発明者らは、発明者らが調査した24種のタンパク質のそれぞれについてのp値を計算した。-2未満のlog10(p値)を有する値は、0.01未満のp値を有するサンプルに相当する。

線量	1 Gy				2 Gy				4 Gy				8 Gy				10 Gy								
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3					
GCSF	-0.2	-0.7	-0.3	-0.2	0.0	-0.3	-0.9	-0.2	-0.1	-0.1	0.0	-0.3	-0.6	-0.6	-1.4	-0.1	-1.1	-1.3	-1.0	-2.5	0.0	-1.0	-1.2	-2.4	-5.1
GIP	0.0	-0.4	-0.2	-0.3	-0.9	-0.1	-0.3	-0.2	-0.2	-0.9	-1.3	-0.1	-0.6	-0.8	-1.4	-0.4	-0.2	-0.6	-0.5	-2.2	-0.8	-0.9	-0.3	-0.3	-3.6
IL15	-0.8	-0.6	-3.8	-2.0	-0.9	-0.2	-2.6	-3.2	-2.5	-1.8	-0.6	-4.6	-6.9	-5.3	-2.8	0.0	-4.0	-8.3	-5.2	-4.0	0.0	-4.8	-5.9	-6.2	-3.0
IL18	-0.5	-0.9	-1.3	-2.2	-0.4	-0.3	-1.4	-3.1	-4.9	-1.7	-0.3	-1.2	-8.1	-9.7	-4.7	-0.1	-2.4	-9.9	-9.0	-4.8	-0.1	-2.1	-6.0	-11.7	-3.7
MCP1	-0.4	-0.2	-1.5	-0.5	-0.6	-0.9	-0.3	-0.9	-1.0	-0.8	-0.3	-0.1	-2.1	-2.4	-1.5	-0.5	-2.2	-7.8	-4.7	-3.2	-0.2	-4.0	-4.5	-7.8	-2.5
AIAGP	0.0	-0.3	-0.1	-0.2	-0.4	-0.3	-0.8	-1.5	-1.1	-0.9	-0.2	-0.6	-0.9	-1.5	-0.1	-0.6	-2.2	-2.4	-3.8	-2.8	0.0	-0.8	-4.0	-3.0	-3.2
APOC1	-0.5	0.0	-0.1	-0.7	-1.5	-0.1	0.0	-0.3	-0.1	-1.5	-0.1	-0.3	-0.1	-0.1	-0.2	-0.3	-0.7	-0.1	-0.3	-1.1	0.0	-0.7	-1.5	-0.1	-0.2
CDT	-0.1	-0.7	-0.4	-0.1	-0.9	-0.1	0.0	-0.2	-0.5	-0.3	-0.1	-0.1	-0.5	-0.3	-0.5	-0.1	-1.1	0.0	0.0	0.0	-0.2	-2.6	-1.1	-0.2	-0.1
CRP	-0.2	-1.7	-2.2	-0.9	0.0	-0.3	-2.1	-2.4	-0.6	0.0	-0.5	-2.4	-3.1	-1.2	-0.5	0.0	-3.9	-3.7	-1.3	-1.1	-0.8	-3.0	-3.6	-2.2	-1.7
CST6	-0.4	-0.2	-0.5	-0.5	-0.4	0.0	-0.3	-0.5	-0.2	-0.6	-0.6	-0.2	-0.1	-0.4	-0.3	-1.0	-0.2	-0.3	-0.5	-1.7	-0.1	-0.3	-0.3	0.0	-2.0
CYT	0.0	-0.7	-2.1	-1.7	-0.1	-0.1	-2.1	-3.2	-1.8	-0.4	-0.1	-4.4	-6.1	-4.3	-1.8	-0.3	-5.8	-6.5	-4.5	-3.1	0.0	-5.7	-7.7	-6.3	-5.1
CLU	-0.6	-0.3	-1.0	-0.5	-0.4	-0.1	-0.1	-0.1	-0.8	-0.6	0.0	-0.2	-0.7	-0.9	-0.7	-0.1	-0.1	-0.1	-0.4	-0.4	0.0	-0.1	-0.3	-0.7	-1.3
ELANE	-0.6	0.0	0.0	-0.5	-1.0	-0.6	-0.3	0.0	-0.2	-1.1	-0.2	-0.1	-0.2	-0.1	-0.8	-0.4	0.0	-0.4	0.0	-3.8	-0.1	0.0	0.0	-0.1	-1.9
FLT3L	-0.4	0.0	-0.3	-1.0	0.0	0.0	-0.3	-1.3	-3.6	-3.8	0.0	-2.4	-6.6	-8.6	-12.5	-0.2	-3.4	-10.0	-6.9	-11.0	-0.5	-2.4	-9.4	-11.6	-12.1
HP	0.0	-0.3	-0.8	-0.9	-0.8	-0.1	-1.1	-1.2	-1.7	-1.7	-0.4	-0.9	-2.1	-2.2	-2.0	-0.1	-0.2	-2.5	-3.0	-5.4	-1.0	-0.8	-3.3	-3.9	-7.8
IDS2	-0.4	0.0	-0.7	-0.1	-0.4	-0.2	-1.4	-1.3	-1.5	-0.4	0.0	-1.6	-1.6	-1.3	-0.3	-0.1	-2.5	-2.2	-1.0	-0.8	-0.2	-1.4	-1.7	-0.7	-1.1
LYVE	-0.5	-0.1	-0.6	-0.2	0.0	-0.1	-0.4	-1.1	-0.1	-0.3	-0.2	-0.4	-2.2	-0.2	-0.1	-0.5	-1.4	0.0	0.0	0.0	-0.1	-0.5	-0.1	0.0	0.0
SAA	-0.5	-1.0	-1.5	-1.1	-0.6	-0.5	-2.1	-2.3	-2.1	-6.4	-0.1	-3.4	-3.0	-3.4	-6.6	-1.0	-3.5	-3.6	-3.1	-4.6	0.0	-3.7	-3.6	-3.7	-5.7
TNC	-0.2	-0.7	-0.4	-0.3	0.0	-0.4	-0.3	-0.3	-0.3	-0.5	-0.2	-0.9	-0.6	-0.4	-0.3	-0.3	-1.8	-1.1	-0.4	0.0	-0.3	-0.3	-0.7	-1.3	-1.2
TF	-0.4	-0.6	-0.2	-1.0	-0.6	-0.2	0.0	-0.1	0.0	-0.2	-1.4	-0.4	-0.3	0.0	-1.5	-1.6	-0.2	-0.5	-0.6	-2.5	-0.9	-0.2	-1.6	-1.1	-1.3
APOA4	-0.3	-0.9	0.0	-0.2	-1.2	-0.6	-0.7	-1.3	0.0	-3.3	0.0	-0.8	-1.3	-0.5	-3.2	0.0	-3.3	-2.6	-1.3	-4.7	-1.1	-1.9	-4.3	-1.6	-8.0
HPX	-0.1	-0.3	-0.7	-1.2	-0.1	-0.1	-1.3	-1.4	-2.5	-0.7	-0.5	-1.6	-2.3	-4.0	-1.5	-0.7	-2.0	-3.6	-4.7	-2.6	-0.9	-1.1	-3.0	-4.1	-4.4
NGAL	-0.4	-1.5	0.0	-0.6	-0.1	-0.4	-2.2	-0.8	-1.9	-0.1	-0.8	-3.4	-3.9	-2.7	-1.2	-0.3	-3.8	-3.1	-4.0	-1.9	-0.2	-4.0	-3.5	-3.5	-2.3
AMY1A	-0.3	-1.0	-0.2	-0.3	-0.1	-0.3	-2.4	-0.2	-0.4	-0.2	-0.1	-4.8	-0.4	-1.2	-1.0	-0.2	-6.8	-1.6	-0.2	-0.2	-0.6	-6.6	-0.9	-0.1	0.0

10

20

【表 1 6】

表15. 5分割交差確認に基づく、12の異なるタンパク質パネルについての精度(Acc)、偽陰性率(FNR)、および偽陽性率(FPR)。

モデル	ロジスティック回帰分析			SVM			CI木		
	Acc	FNR	FPR	Acc	FNR	FPR	Acc	FNR	FPR
タンパク質パネル									
CYT;FIt3L;IL18;NGAL	93.2%	4.9%	8.0%	93.9%	6.1%	6.1%	89.2%	12.3%	9.8%
CYT;FIt3L;HPX;NGAL;APOA4	95.2%	3.7%	5.5%	93.9%	5.1%	6.8%	89.4%	12.3%	9.5%
CYT;FIt3L;NGAL;SAMY	94.2%	4.6%	6.7%	94.5%	4.0%	6.5%	89.7%	11.7%	9.3%
CYT;FIt3L;IL15;NGAL;APOA4	94.5%	4.9%	5.9%	94.5%	4.7%	6.1%	88.3%	13.4%	10.2%
CYT;FIt3L;NGAL;APOA4	94.1%	3.8%	7.3%	94.8%	5.0%	5.3%	88.7%	12.2%	10.7%
CYT;FIt3L;NGAL;SAMY;APOA4	94.1%	4.4%	6.8%	95.0%	3.5%	6.1%	90.3%	10.3%	9.3%
CYT;FIt3L;IL18;NGAL;APOA4	93.1%	6.7%	7.1%	94.0%	4.2%	7.2%	88.1%	12.6%	11.2%
CYT;FIt3L;HPX;NGAL	94.3%	5.3%	5.9%	93.2%	3.8%	8.8%	89.1%	12.4%	9.8%
CYT;FIt3L;MCP1;NGAL;APOA4	93.6%	4.2%	7.9%	94.2%	7.7%	4.6%	88.6%	13.6%	9.6%
CYT;FIt3L;IL15;NGAL	94.5%	4.6%	6.1%	93.9%	5.3%	6.6%	88.9%	13.7%	9.4%
CYT;FIt3L;NGAL	94.8%	4.1%	6.0%	93.2%	3.6%	8.9%	88.7%	12.2%	10.7%
CYT;FIt3L;MCP1;NGAL	95.2%	4.4%	5.0%	94.1%	7.1%	5.1%	88.3%	14.2%	9.7%

30

## 【表 17】

表16. 4つのタンパク質 (ACT、FLT3L、AMY1A、およびIL15) のパネルを使用する5分割交差確認の7回の繰り返しについての平均および標準偏差。発明者らは、高い線量 ( $\geq 4\text{Gy}$ ) 被曝としてサンプルを分類するために、カットオフとして被曝の30%の確率を使用した。全体として、モデルは十分に機能し、データの様々なランダム分割 (random split) の間の低い標準偏差は、結果に対する信頼を向上させる。

属性	平均	標準偏差
精度	96.5%	0.3%
感度	98.1%	0.6%
特異度	95.5%	0.4%
PPV	93.5%	0.5%
NPV	98.7%	0.4%
FPR	4.5%	0.4%
FNR	1.9%	0.6%

10

## 【表 18】

表17. AT、FLT3L、IL15、およびAMY1Aを使用する5分割交差確認の7回の繰り返しからの50%未満の被曝の平均確率を有する4つのサンプル

サンプル	線量 (Gy)	日	曝露した確率	#繰り返し 偽陰性
F5505B	8	3	0.29%	7
F4501C	4	1	20.6%	7
M4005B	4	1	33.5%	7
F4503C	4	2	44.3%	4

20

## 【表 19】

表18. AT、FLT3L、IL15、およびAMY1Aを使用する5分割交差確認の7回の繰り返しからの50%未満の非被曝の平均確率を有する4つのサンプル

サンプル	線量 (Gy)	日	曝露されていない確率	#繰り返し 偽陽性
F3505B	2	3	0.03%	7
M3005B	2	2	3.2%	7
M3005B	2	3	7.2%	7
F3501C	2	3	46.1%	7
F3501C	2	1	47.6%	7
M3001A	2	2	48.2%	7

30

【表 2 0】

表19. 2つの標的バイオマーカー、唾液アルファアミラーゼ (AMY1A)、および Fms 関連チロシンキナーゼ3リガンド (FLT3L) についてのLFA再現性アッセイからの変動係数 (CV) 結果。発明者らは、異なる3日間、三通り、4つの異なる濃度でそれぞれの分析物について同じLFAアッセイを実行した。下記の表に列挙されるCVは、異なる3日間、標準偏差の平均についての各日のおよび日間の3回の反復実験に相当する。

タンパク質&濃度	1日目	2日目	3日目	日間
AMY1A (5 ng/mL)	6.6 %	4.3 %	3.2 %	4.9 %
AMY1A (25 ng/mL)	6.1 %	8.5 %	10.4 %	9.9 %
AMY1A (50 ng/mL)	8.5 %	5.8 %	12.4 %	9.5 %
AMY1A (100 ng/mL)	12.4 %	8.1 %	9.2 %	11.6 %
FLT3L (0.002 ng/mL)	2.7 %	0.7 %	9.1 %	5.1 %
FLT3L (0.1 ng/mL)	2.5 %	1.8 %	2.0 %	5.1 %
FLT3L (0.5 ng/mL)	4.6 %	2.9 %	2.3 %	7.5 %
FLT3L (1 ng/mL)	5.9 %	7.0 %	0.2 %	6.8 %

10

【表 2 1】

表20. 2つの異なる濃度の2つの分析物 (FLT3LおよびAMY1A) についての同じウィックの15回の測定値についての平均シグナル対バックグラウンド比 (SBR) および標準偏差

タンパク質&濃度	平均SBR	標準偏差SBR	変動係数 (%)
AMY1A (5 ng/ml)	1.33	0.011	0.84 %
AMY1A (50 ng/ml)	6.11	0.098	1.60 %
FLT3L (0.1 ng/ml)	1.15	0.018	1.60 %
FLT3L (1 ng/ml)	1.39	0.039	2.79 %

20

【表 2 2】

表21. 遠心沈殿させた全血としたコントロールと比較した、同じ条件下の10回のRBCフィルターカートリッジ実行からの結果。発明者らは、1PSIおよび175ulのインプット容量を選んだ。発明者らは、412nmの吸収を使用して細胞充実度および溶解を測定する。FLT3Lは、210ng/mlでサンプルの中に加え、ELISAを使用して読み取った。結果は、1PSIで、残った細胞が有意に少なく、溶解が遠心分離法と同じくらい好適であるまたはそれよりも好適であり、発明者らが、標的210ng/ml濃度の10% (ELISAアッセイCV) の範囲内にあったことを示す。

30

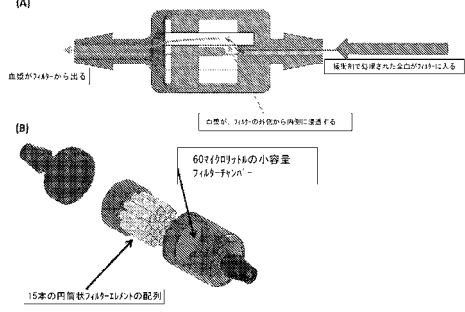
フェーズ	圧力 (PSI)	インプット容量 (μl)	回収容量 (μl)	細胞充実度 (412nm)	溶解 (412nm)	FLT3L 濃度 (pg/ml)
コントロール	N/A	N/A	N/A	0.35	0.35	176
1	1	175	74	0.00	0.31	234
2	1	175	50	0.02	0.35	223
3	1	175	108	0.01	0.32	205
4	1	175	61	0.01	0.31	219
5	1	175	133	0.01	0.28	207
6	1	175	64	0.02	0.40	232
7	1	175	47	0.02	0.36	222
8	1	175	45	0.00	0.31	197
9	1	175	135	0.03	0.32	224
10	1	175	113	0.01	0.39	222

40

50

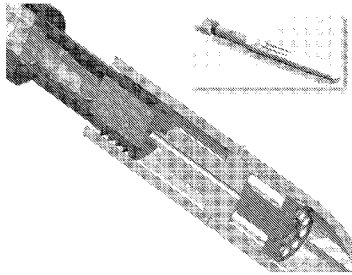
【 図 1 】

Fig. 1



【 図 2 】

Fig. 2



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/046058
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - G01N 33/68 (2014.01) CPC - G01N 33/558 (2014.09) 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) IPC(8) - C12 M1/34; G01N 31/00, 33/53, 33/68, 33/543 (2014.01) CPC - B01L 3/502707, 2400/0406; G01N 33/68, 33/545, 33/558, 33/566, 33/588, 33/54353, 33/56972 (2014.09) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - B01L 3/502707, 2400/0406; G01N 33/68, 33/545, 33/558, 33/566, 33/588, 33/54353, 33/56972 (2014.09) (keyword delimited) USPC - 435/7.1, 7.92, 287.1, 287.2; 436/501 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, PubMed Search terms used: radiation irradiation biomarker blood filter device apheresis fibers lateral flow strip		
<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	EP 0 112 173 B1 (DUGGINS et al) 16 August 1998 (16.08.1998) entire document	1-3
Y		4-7, 15
Y	US 2010/0055721 A1 (LAMBERT et al) 04 March 2010 (04.03.2010) entire document	4, 15
Y	US 4,576,185 A (PROUD et al) 18 March 1986 (18.03.2016) entire document	4, 15
Y	WO 2013/049455 A1 (BLAKELY et al) 04 April 2013 (04.04.2013) entire document	5-15
Y	US 2013/0052668 A1 (PAULOVICH et al) 28 February 2013 (28.03.2013) entire document	5-7, 14
Y	US 2009/0197280 A1 (BANGERT et al) 06 August 2009 (06.08.2009) entire document	7
Y	"Thermo Scientific Finnpiptette FinnTip: Product Catalog 2010," Thermo Scientific, 2009, Pgs. 1-40. Retrieved from the Internet: <www.tslabor.hu/depo/Finnpiptette_FinnTip_2010_Catalog.pdf> on 27 October 2014 (27.10.2014). entire document	4, 15
Y	PATEL et al. "Ionizing radiation and TNF-alpha and stimulated expression of alpha1-antichymotrypsin gene in human squamous carcinoma cells," Acta Oncol. 1998, Vol. 37, Pgs. 475-478. entire document	5-15
A	WARD et al. "Conventional apheresis therapies: a review," J Clin Apher. 31 August 2011 (31.08.2011), Vol. 26, Pgs. 230-238. entire document	1-3
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
* 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 27 October 2014		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">27 NOV 2014</div>
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. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver 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)
	G 0 1 N 33/48	H
	G 0 1 N 33/543	5 2 1
	B 0 1 D 63/02	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, TZ, UA, UG, US

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. QRコード

(74) 代理人 100124855  
弁理士 坪倉 道明

(74) 代理人 100129713  
弁理士 重森 一輝

(74) 代理人 100137213  
弁理士 安藤 健司

(74) 代理人 100143823  
弁理士 市川 英彦

(74) 代理人 100151448  
弁理士 青木 孝博

(74) 代理人 100183519  
弁理士 櫻田 芳恵

(74) 代理人 100196483  
弁理士 川崎 洋祐

(74) 代理人 100203035  
弁理士 五味淵 琢也

(74) 代理人 100185959  
弁理士 今藤 敏和

(74) 代理人 100160749  
弁理士 飯野 陽一

(74) 代理人 100146318  
弁理士 岩瀬 吉和

(74) 代理人 100127812  
弁理士 城山 康文

(72) 発明者 クーパー, デイヴィッド・イー  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94025、メンロ・パーク、レーベンスウツド・アベニュー  
・333、エスアールアイ・インターナショナル

(72) 発明者 パロツグ, ロバート  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94025、メンロ・パーク、レーベンスウツド・アベニュー  
・333、エスアールアイ・インターナショナル

(72) 発明者 チャン, ポリー  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94025、メンロ・パーク、レーベンスウツド・アベニュー

- ・ 3 3 3、エスアールアイ・インターナショナル  
 (72)発明者 シエイラー，トーマス・エー  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 4 0 2 5、メンロ・パーク、レーベンスウツド・アベニュー  
 ・ 3 3 3、エスアールアイ・インターナショナル
- (72)発明者 リン，ホワ  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 4 0 2 5、メンロ・パーク、レーベンスウツド・アベニュー  
 ・ 3 3 3、エスアールアイ・インターナショナル
- (72)発明者 ダンドレア，アンナリサ  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 4 0 2 5、メンロ・パーク、レーベンスウツド・アベニュー  
 ・ 3 3 3、エスアールアイ・インターナショナル
- (72)発明者 ハリソン，トラヴィス  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 4 0 2 5、メンロ・パーク、レーベンスウツド・アベニュー  
 ・ 3 3 3、エスアールアイ・インターナショナル
- (72)発明者 シュミット，ロジャー・エイチ  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 4 0 2 5、メンロ・パーク、レーベンスウツド・アベニュー  
 ・ 3 3 3、エスアールアイ・インターナショナル
- (72)発明者 スワンソン，クリスティーナ  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 4 0 2 5、メンロ・パーク、レーベンスウツド・アベニュー  
 ・ 3 3 3、エスアールアイ・インターナショナル
- (72)発明者 メンドーサ，エステバン  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 4 0 2 5、メンロ・パーク、レーベンスウツド・アベニュー  
 ・ 3 3 3、エスアールアイ・インターナショナル
- (72)発明者 スティール，マーク  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 4 0 2 5、メンロ・パーク、レーベンスウツド・アベニュー  
 ・ 3 3 3、エスアールアイ・インターナショナル
- (72)発明者 ガルシア，パブロ・イー  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 4 0 2 5、メンロ・パーク、レーベンスウツド・アベニュー  
 ・ 3 3 3、エスアールアイ・インターナショナル

F ターム(参考) 2G045 AA25 BA13 BB04 CA25

4D006 GA07 HA03 HA19 JA15A JA19A JA27A MA01 PA05 PB09 PB42

PB43 PC41

专利名称(译)	生物标志物小组用于辐射损伤和微等离子体过滤器的剂量评估		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016533497A</a>	公开(公告)日	2016-10-27
申请号	JP2016525470	申请日	2014-07-09
[标]申请(专利权)人(译)	斯坦福研究院		
申请(专利权)人(译)	ES伯爵国际眼		
[标]发明人	クーパー・デイヴィット・ディー バロツグ・ロバート チャン・ポリリー シエイラー・トーマス・エー リン・ホワ ダンドレア・アンナリサ ハリソン・トラヴィス シュミット・ロジャー・エイチ スワンソン・クリスティーナ メンドーサ・エステバン ステイール・マーク ガルシア・パブロ・イー		
发明人	クーパー,デイヴィット・ディー バロツグ,ロバート チャン,ポリリー シエイラー,トーマス・エー リン,ホワ ダンドレア,アンナリサ ハリソン,トラヴィス シュミット,ロジャー・エイチ スワンソン,クリスティーナ メンドーサ,エステバン ステイール,マーク ガルシア,パブロ・イー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/573 G01N33/48 G01N33/543 B01D63/02		
CPC分类号	G01N33/491 G01N33/6893 G01N2800/40 G01N33/5302 G01N33/558		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.X G01N33/573.A G01N33/53.V G01N33/53.P G01N33/48.H G01N33/543.521 B01D63/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/BA13 2G045/BB04 2G045/CA25 4D006/GA07 4D006/HA03 4D006/HA19 4D006/JA15A 4D006/JA19A 4D006/JA27A 4D006/MA01 4D006/PA05 4D006/PB09 4D006/PB42 4D006/PB43 4D006/PC41		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 安藤 健二 市川 英彦 青木 孝弘 五味 渊拓哉 近藤 俊 饭野 洋一		

摘要(译)

测量生物标志物的量提供了用于定性评估人暴露于电离辐射的材料，系统和方法，与相应的非辐照对照参考范围相比，生物标志物的变化。提供了评估，生物标记包括 (i)  $\alpha$ -1-抗胰凝乳蛋白酶 (ACT) (ii) Fms 相关酪氨酸激酶3配体 (Flt3L) 和 (iii) 一种或多种其他蛋白质。 [选型图]

图1

